



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUITLAN

INGENIERÍA AGRÍCOLA

**“EL CULTIVO *IN VITRO* DE PAPA (*Solanum tuberosum*) CON
DIFERENTES PROPORCIONES DE AUXINA / CITOCININA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÍCOLA

P R E S E N T A:

FERNANDO ORTIZ SALGADO

**DIRECTOR DE TESIS:
M. C. JUAN ROBERTO GUERRERO AGAMA
JUNIO 2015**

Cuautitlán, Estado de México



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIO:
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

"El cultivo in vitro de papa (Solanum tuberosum) con diferentes proporciones de Auxina / Citocinina".

Que presenta el pasante: **FERNANDO ORTIZ SALGADO**
Con número de cuenta: **40902450-8** para obtener el Título de: **Ingeniero Agrícola**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	
VOCAL	M.C. Juan Roberto Guerrero Agama	
SECRETARIO	M.C. Oscar Horacio Guillén Ayala	
1er SUPLENTE	M.C. María Victoria Hernández Pimentel	
2do SUPLENTE	M.I. Martha Elena Domínguez Hernández	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

HHA/Vc

DEDICATORIAS

Este triunfo se lo dedico principalmente a mis padres, quienes lucharon día a día para hacer de mí una mejor persona, por su apoyo, confianza y amor. Me siento orgulloso de concluir esta etapa de mi vida y aunque no pudieron estar presentes algunas ocasiones, agradezco infinitamente el apoyo incondicional; tuvimos muchos problemas en el camino pero me enseñaron que estando unidos podemos salir adelante. Gracias por la vida que me han dado y la satisfacción de compartir este logro con ustedes. Mis raíces vienen del pueblo como ustedes y nunca las olvidaré...

A mi hermano Eduardo por ser un ejemplo a seguir, por educarme y darme ese consejo que nadie más puede ofrecer, por tantas experiencias y lecciones que me diste y finalmente por darme la dicha de ser tío y tener un par de motivos más para superarme. Estefi y Carlitos, va por ustedes...

A mi hermana Lucy, a quien admiro mucho, por su fuerza, entrega y perseverancia; por siempre estar conmigo y compartir momentos de risa, tristeza y alegría. Aunque lucifer se escuche mal siempre haremos la mejor mancuerna...

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento, dedicarle éste éxito a mi asesor y amigo Juan Roberto Guerrero, quien ayudo en mi formación y mostró entera disposición en todo momento, a quien le agradezco las atenciones y los consejos que marcaron mi vida y me hacen mejorar cada día, tanto en el ámbito personal como profesional. Por ser como un padre para mí y enseñarme a ofrecer siempre lo mejor, porque sin duda alguna siempre seré su hijito...

A mis profesores, por cultivar ese deseo de seguir aprendiendo, por compartir sus conocimientos y experiencias y por ofrecerme algo más que una relación académica, entre los que se deben mencionar: Yazmin Cuervo, Elva Martínez, Minerva Chávez, Edgar Ornelas, Francisco Cruz y Oscar Guillén...

Dicen que los amigos son la familia que uno escoge, y gracias a dios puedo presumir a muchos a quienes también dedico este logro, principalmente a Luis Mario Cruz Cortes, quién me acompañó desde el primer día de clases y tuve la dicha de gozar de su lealtad y compartir muchas vivencias. A mi ameeego Julio Cesar Valdez Castro por el apoyo que me ofreció en todo momento, con quien es todo un gusto trabajar y convivir y sin dejar a un lado a Consuelo López, Benjamín Martínez, Selene Ramírez, Modesto Islas, Oscar Blanco, Jaime Fernández, Omar Leyva, y Monserrat Sánchez...

Con mucho cariño a Diana Gloria Padilla Álvarez, con quien compartí momentos inolvidables a lo largo de mi estancia en la universidad y quien hasta la fecha me sigue ofreciendo la más sincera y leal de las amistades, gracias por darme ese abrazo cuando más lo necesite y por ofrecerme tú apoyo incondicional, no tengo palabras para describir lo mucho que significas en mi vida y lo agradecido que estoy de que el destino te haya puesto en mi camino... y alcanzar este triunfo a tu lado, es el broche de oro...

A mis amigos Ángel, Alma, Mire, el Arjona, Canito y Lupe que sin pensarlo nos aceptaron en su familia, nos abrieron sus puertas y nos permitieron disfrutar de buenos momentos y apoyarnos en los malos...

Finalmente quiero dedicar mi trabajo a la Universidad Nacional Autónoma de México, donde aprendí a ser un profesionalista y lucharé cada día por poner su nombre en alto...

¡Por mi Raza hablará el espíritu!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, por haberme dado la satisfacción de alcanzar una meta más en mi vida y ver reflejado el esfuerzo de muchas personas que me acompañaron en el camino.

Mi gratitud a nuestra máxima casa de estudios, la UNAM por la oportunidad que me brindo de cursar el nivel superior en la carrera de Ingeniería Agrícola, por llenarme de conocimiento, sabiduría y formarme como profesionista, ser mi segundo hogar y forjar en mí el orgullo de ser universitario.

A mi asesor de tesis, el M. C. Juan Roberto Guerrero Agama, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, transmitirme su conocimiento, por el apoyo brindado en todo momento y por sus valiosos consejos. También deseo agradecer a mis sinodales, la Dra. Rosa Navarrete Maya, el M. C. Oscar Horacio Guillén Ayala, la M. C. María Victoria Pimentel y la M. I. Martha Elena Domínguez Hernández, por su disposición, colaboración y recomendaciones para la redacción y presentación de este trabajo.

Al M. C. Francisco Cruz Pizarro, por proporcionar el material que se utilizó para la realización de este trabajo, y por brindarme su asesoramiento para la elaboración del medio de cultivo.

Mi más profundo agradecimiento a mis padres Fernando Ortiz Chávez y Herminia Salgado Murillo; que con valentía, esfuerzo y mucha dedicación han hecho de mí una mejor persona y me enseñaron a dar todo de mí a cada paso, el camino fue muy difícil, pero siempre estuvieron ahí para apoyarme y salir adelante.

A mis amigos, Luis Mario Cruz Cortes, Julio Cesar Valdez Castro, Modesto Islas Avechuco y Diana Gloria Padilla Álvarez, ya que sin su apoyo y atenciones no habría logrado la culminación de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Importancia de la producción de semilla de papa en México	4
3.1.1. Zonas de producción	5
3.1.1.1. Producción de papa	6
3.1.1.2. Producción de semilla-tubérculo	7
3.1.2. Demanda de semilla de papa	9
3.1.3. Volúmenes de producción	10
3.1.3.1. Volumen de producción de papa	11
3.1.3.2. Volumen de producción de tubérculo-semilla	12
3.1.4. Problemas Fitosanitarios	13
3.2. Métodos de Propagación de papa	15
3.2.1. Sistema tradicional	15
3.2.2. Micropropagación	16
3.3. Aplicación de la micropropagación en la producción de papa	18
3.4. Efecto de la relación hormonal durante la producción <i>in vitro</i>	19
3.4.1. Auxinas	20
3.4.2. Citocininas	21
3.4.3. Relación Auxina – Citocinina	22
3.5. Efecto del Fotoperiodo en la propagación <i>in vitro</i> de papa	24

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Ubicación del experimento	25
4.2. Material Vegetativo	25
4.3. Diseño Experimental	26
4.3.1. Parámetros a evaluar	27
4.4. Manejo Experimental	28
4.4.1. Desinfección del explante	28
4.4.2. Preparación del medio de cultivo	28
4.4.3. Siembra del material vegetativo	29
4.4.4. Proliferación	30
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS	31
5.1. Efecto de la luz en la formación de vitro-tubérculos de <i>Solanum tuberosum</i> L.	39
VI. CONCLUSIONES	41
VII. BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Superficie sembrada de papa en miles de hectáreas (2002-2011)	7
Tabla 2. Superficie y demanda de tubérculo/semilla a nivel nacional	10
Tabla 3. Volúmenes de producción de papa, miles de toneladas (2002-2011)	11
Tabla 4. Existencia de semilla calificada de papa en México	12
Tabla 5. Volumen de producción en toneladas de tubérculos-semilla de papa en México	13
Tabla 6. Relación Auxina/Citocinina del medio MS	26
Tabla 7. Datos de los parámetros a medir con la comparación entre tratamientos	32
Tabla 8. Comparación de medias entre los tratamientos en luz y oscuridad	39
Figura 1. Incremento del número de segmentos nodales obtenidos en plántulas producidas in vitro	31
Figura 2. Tasa de desarrollo de segmentos nodales in vitro-plantas de papa con diferente nivel de auxina-citocinina en el medio de cultivo	33
Figura 3. Incremento de altura de vitro-planta de papa, con diferente relación auxina/citocinina, durante la proliferación in vitro	35
Figura 4. Tasa de desarrollo de altura de vitro-plantas de papa con diferente relación de auxinas/citocininas	36

RESUMEN

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM. Se emplearon plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha producidas *in vitro* a partir de brotes emitidos por tubérculos sometidos a refrigeración, que desarrollaron yemas que sirvieron como material vegetal; estos brotes fueron colocados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) modificado con diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) y Ácido Indolbutírico (AIB), con lo que se modificó la concentración hormonal auxina /citocinina. Los parámetros a evaluar fueron número de segmentos nodales, altura de planta, volumen de la parte subterránea y número de vitro-tubérculos.

Se realizó un análisis de los cambios morfológicos que presentaron los explantes de papa al ser sometidos a diferentes proporciones de auxinas/citocininas y sometidas a diferentes fotoperiodos, donde los resultados obtenidos indican que no es necesaria la aplicación exógena de reguladores de crecimiento para generar mayor número de segmentos nodales, altura y número de vitro-tubérculos en condiciones de luz; sin embargo, la aplicación solo de auxinas (5 mL de Ácido Indolbutírico) al medio de cultivo genera una mayor cantidad de éstos en condiciones de oscuridad, donde no es recomendable la adición de citocininas, ya que disminuye el desarrollo de vitro-tubérculos en las mismas condiciones.

INTRODUCCIÓN

Para que una semilla realmente tenga impacto en la agricultura, es necesario que, además de ser de alta calidad y de una variedad mejorada, sea usada ampliamente por los agricultores, de esta manera aumentará la producción y productividad, ayudará a una utilización más eficiente de insumos debido a una mayor uniformidad de emergencia y vigor de plantas, especialmente si se trata de un cultivo como la papa que se multiplica en forma vegetativa a través de tubérculos-semilla. Si bien es cierto que esta forma de multiplicación es una ventaja pues permite mantener las características propias de la variedad por generaciones, también es cierto que es una fuente eficaz para la diseminación de plagas y enfermedades que afectan al cultivo (Velázquez, 2006); además, los programas de producción de tubérculos para semilla de forma convencional presentan una baja tasa de multiplicación y son altamente susceptibles a las enfermedades, las cuales se pueden transferir a la progenie a través de los tubérculos (Arellano *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos *in vitro* es una herramienta muy útil en la obtención de material sano en un corto período de tiempo y en un espacio pequeño; de tal forma, la utilización de microtubérculos como semilla tiene grandes ventajas, pues existen antecedentes de que este material soporta condiciones adversas de plantación y producen plantas más vigorosas en las generaciones sucesivas, también existen reportes de que es posible obtener mayor número de microtubérculos de plantas procedentes del cultivo de tejidos vegetales, que de las tubérculos en siembras convencionales. Por tanto, con el establecimiento de un sistema de producción de microtubérculos *in vitro*, se puede iniciar un proyecto de producción de semilla básica que permita a los productores de papa tener mayor disposición de material de calidad, asegurando con ello un buen rendimiento de este cultivo (Arellano *et al.*, 2010; CONPAPA, 2010).

Los microtubérculos son tubérculos de papa producidos *in vitro* cuando plántulas o explantes de la misma se colocan bajo determinadas condiciones inductoras de tuberización (Fuentes *et al.*, 2012). Este tipo de materiales han sido empleados como modelo de investigación, para la selección y mantenimiento de germoplasma, como explantes de transformación genética y, en algunos casos, como tubérculo-semilla de alta calidad.

Un aspecto muy importante en la propagación *in vitro* es la concentración hormonal, de tal forma, el presente trabajo busca promover la formación de tubérculos en mayor número a través de un balance hormonal, siendo las auxinas y citocininas las directamente involucradas en la proliferación de las plantas bajo la técnica de cultivo de tejidos vegetales, aunado a otros aspectos como temperatura, luz y humedad que también se controlan en el laboratorio.

Con este trabajo, se busca que el tubérculo-semilla realmente tenga impacto en la producción en campo, pues se espera contar con material de alta calidad que permita incrementar la producción y productividad, así como ayudar a una utilización más eficiente de insumos debido a una mayor uniformidad de emergencia y vigor de plantas, más si se trata de un cultivo como la papa que se multiplica en forma vegetativa a través de tubérculos-semilla.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

GENERAL:

Evaluar los cambios morfológicos que presentan explantes a partir de tallos de papa (*Solanum tuberosum*), por diferente relación auxina/citocinina, en el medio de cultivo durante la propagación *in vitro*.

PARTICULARES:

- Analizar los cambios morfológicos que presentan los explantes de papa por efecto de la variación de auxina/citocinina.
- Determinar la mejor relación auxina/citocinina que incremente la formación de microtubérculos bajo condiciones *in vitro*.

HIPÓTESIS:

La relación hormonal auxina/citocinina es importante para la formación de nuevos órganos durante la propagación *in vitro*; por tanto, al realizar una variación de la proporción de ambas hormonas, se generarán diferencias en los órganos que se formen durante la propagación *in vitro* de papa.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Importancia de la producción de semilla de papa en México

La papa es uno de los alimentos más importantes en México, ya que solo está por debajo de los cereales (maíz, frijol, trigo y arroz) en la dieta del mexicano; siendo la semilla el insumo más importante en todo cultivo; la disponibilidad de material sano y de buena calidad, es uno de los principales factores que limitan la producción de este tubérculo (Arellano, *et al.*, 2010). Para mantener un potencial genético de una variedad o clon de papa, se deben conservar las características deseadas con tubérculos-semilla libres de patógenos, ya que la calidad fitosanitaria repercute en el rendimiento del cultivo, por lo que la producción de semilla pre-básica es importante (Ranalli *et al.*, 1994).

Desde 1982, en el INIA, ahora INIFAP, se comenzaron a establecer proyectos de producción de semilla de papa; implementando el sistema de producción en laboratorio para generar grandes cantidades de plántulas, que posteriormente se aclimataban en invernaderos y finalmente se entregaban a los productores. A finales de los 80's e inicio de los 90's, la importación de semillas en México fue restringida debido en gran parte a problemas fitosanitarios, disminuyendo los proyectos encaminados a la producción de ellas, aunado a la crisis de la Productora Nacional de Semillas y la firma del tratado de libre comercio con América del Norte (Arellano *et al.*, 2010).

En 2009, el Centro Internacional de la Papa (CIP), señaló que durante los últimos años se intentó consolidar el sistema producto de papa mediante la creación de normas fitosanitarias para programas de producción de semilla de calidad; sin embargo, no se logró cubrir la demanda de semilla, por lo que se siguió importando grandes cantidades de éste insumo a precios altos. La producción de este tubérculo en México, aparentemente satisface el consumo de la población (10 Kg *per cápita*); sin embargo, para el año 2014 se importaron alrededor de 287 mil toneladas de papa al año, esto debido a la demanda de papas procesadas y en su mayoría a la demanda de semilla de calidad (CONPAPA, 2015).

Las principales variedades comerciales de papa de las que se ha generado semilla en México han sido variedades como: Adora, Alpha, Atlantic, Fianna, Caesar, FL-1867, Gigant, Mondial, Snowden, Vivaldi, Caesar y Felsina; así como algunas variedades mexicanas como: Norteña, Montserrat, Malinche y Tollocan (SNICS, 2012); entre todas ellas destaca la variedad Alpha, por sus altos rendimientos y buena aceptación en el mercado. A pesar de ello, la industria semillera nacional no abastece más que el 10% de la demanda; por lo cual, el precio de la semilla y el costo del cultivo por unidad de superficie son muy elevados para los agricultores de escasos y medianos recursos, considerándose un cultivo clave en la economía y en la generación de empleos directos, de hasta 60 jornales por hectárea, e indirectos a través de compañías productoras de agroquímicos, transportes, comercio e industria (Coria *et al.*, 2004).

Durante el ciclo de producción P-V 2008, el cultivo de papa tuvo grandes pérdidas debido a enfermedades, que en su mayoría eran diseminadas por semilla, por lo que se considera como un factor limitante de la producción de este cultivo en México (CONPAPA, 2009). Debido a esto, es importante buscar alternativas para producir material vegetativo de calidad y libre de patógenos para la siembra, logrando establecer un modelo de producción de micro tubérculos que ofrezca una alternativa viable para la producción de este cultivar.

3.1.1. Zonas de producción

En México la producción de papa se destina para el consumo humano y como materia prima en la industria de "frituras". Su alta demanda ha originado el aumento de la superficie cultivada y la gran variedad de climas dentro del territorio nacional hace posible la siembra de papa en diferentes regiones, por lo que todo el año, con ciertas deficiencias, se dispone de tubérculos frescos para el consumo humano y para la siembra (CONPAPA, 2012).

3.1.1.1. Producción de papa

En México se cultiva papa en casi todos los estados, excepto en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo; siendo las principales regiones productora las del norte del país, así como la región del Bajío; cuyas producciones son altamente tecnificadas, con acceso a tubérculo- semilla certificado, se practica bajo riego, contando con rendimientos promedio que se aproximan a las 30 ton·ha⁻¹ y los costos de producción a los \$60,000/ha (Coria *et al.*, 2004).

Otra zona de producción de papa es la temporalera, donde destacan particularmente los estados de México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz; donde los rendimientos no alcanzan las 15 ton·ha⁻¹ y los costos superan los \$35,000/ha., la carencia de semilla certificada obliga al uso continuo de semilla degenerada que encarece el cuidado sanitario de las siembras, dando como resultado una baja producción, además de mala calidad del producto (Coria *et al.*, 2004).

Como dato referencial de la importancia de este cultivo, se tiene que durante el periodo 2002-2011, la superficie sembrada fue de 63.2 miles de hectáreas, ubicando el 70% de dicha superficie en solo seis estados de la República, entre los principales se encuentran: Sinaloa con 20.6%, Sonora 17.2%, Chihuahua 9.4% y Estado de México 8.1% (Tabla 1). Destacando una tendencia a la baja a partir del año 2007, posiblemente por la fuerte presencia que se tuvo de la enfermedad de la punta morada de la papa (PMP); siendo hasta 2010 que se estableció por parte de la SAGARPA un programa para producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades, mediante el cual se logró un repunte significativo al año siguiente; de tal forma la superficie sembrada nacional pasó de 63.8 miles de hectáreas en 2002 a 69.1 miles de hectáreas en 2011, lo que representó un incremento de 8.3% (SIAP, 2012).

En el noroeste del país, se cuenta con la producción de semilla de alta calidad, lo cual permite que se tengan producción con alto rendimiento, en donde se ubica a los estados de Sinaloa y

Sonora, con una superficie sembrada por arriba de las 13000 ha, duplicando la producción de otros estados de la República que también cultivan papa.

Tabla 1. Superficie sembrada de papa en miles de hectáreas (2002-2011)

Entidad	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	TMCA 2002- 2006	TMCA 2007- 2011
Sinaloa	11.1	12.4	14.5	14.7	13.3	14.1	14.0	12.5	10.3	13.4	4.7	-1.2
Sonora	7.3	8.5	10.3	11.9	9.9	12.1	11.6	10.8	12.2	13.9	7.9	3.6
Chihuahua	7.6	8.3	7.6	6.6	6.4	6.3	5.3	3.5	4.1	3.9	-4.2	-10.9
México	4.2	4.5	4.4	6.0	5.7	5.6	4.6	4.6	4.0	7.5	7.9	7.4
Veracruz	5.0	5.3	4.5	4.3	4.4	5.0	3.9	4.2	4.4	6.4	-3.1	6.1
Puebla	6.5	4.2	4.1	4.0	4.6	3.9	4.9	3.6	4.4	5.4	-8.2	8.5
Subtotal	41.8	43.1	45.4	47.3	44.4	46.9	44.3	39.3	39.5	50.6	1.6	1.8
Otros Estados	22.0	23.9	22.4	18.7	17.5	18.7	16.8	14.9	16.1	18.5	-5.6	-0.2
Nacional	63.8	67.0	67.8	66.0	61.9	65.6	61.1	54.1	55.6	69.1	-0.7	1.3

Fuente: SIAP, con información de las delegaciones de SAGARPA en los estados, 2012.

3.1.1.2. Producción de semilla-tubérculo

En México, se había estado utilizando semilla de papa obtenida por selección masal, aprovechando que se reproduce de forma vegetativa y que las características genéticas son transmitidas a los nuevos cultivares, se escogían los tubérculos más limpios y de mejor calidad para la siembra. Este método sirvió durante muchos años, pero con el paso del tiempo y la presencia de enfermedades como la punta morada de la papa (PMP) y el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) se vieron drásticamente afectadas las producciones; fue entonces que se comenzó la investigación buscando alternativas para generar material vegetativo libre de patógenos, partiendo del hecho de que algunos organismos permanecen en los tubérculos de forma inerte y cuando se presentan las condiciones favorables desarrollan la enfermedad. Desde entonces se han desarrollado estrategias para la producción de tubérculo-semilla principalmente mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, donde los laboratorios comerciales deben estar dados de alta, contar con su registro fitosanitario y cumplir con la

Norma Oficial Mexicana NOM-041-FITO-2002 y con la Ley Federal de Producción y Certificación de Semillas SAGARPA-SNICS, para poder comercializar la semilla en calidad de certificada (Arellano *et al.*, 2010; CONPAPA, 2012).

Hernández (2008), señaló que se tenían establecidos 10 laboratorios y 17 invernaderos con una superficie útil de 60000 m², en los que se producía aproximadamente 25 millones de microtubérculos por año, con los que se abastece sólo el 1.3% de la superficie cultivada. Con ello no se puede satisfacer la demanda nacional, por lo que se veían en la necesidad de importar plántulas *in vitro* o vitro-tubérculos a precios altos (Arellano *et al.*, 2010). A partir de 2006, en la zona papera del noreste de México fue donde se tuvieron severas afectaciones por la enfermedad de la PMP, por lo que los productores de esta región establecieron para 2011, cuatro laboratorios y cinco invernaderos con una capacidad instalada de 11248 m² y una superficie de 8000 m² de superficie cultivable, donde se llegan a generar hasta tres cosechas de microtubérculos al año, obteniendo 1.5 millones de unidades de microtubérculos-semillas clasificados como semilla con categoría prebásica, mismos que se pueden utilizar para establecer 50 ha de cultivo, con lo que solo pueden cubrir el 1% de la superficie sembrada (SNICS, 2012).

Ante la necesidad de producción de material de siembra de calidad, fueron agregados más laboratorios al programa de producción de semilla de papa, resaltando la participación del Valle de Toluca, el norte del Estado de México y la zona papera del Noreste, como principales productores de semilla. De tal forma, para el 2010, se logró cubrir cerca del 10% de la superficie del país, un 10% más se importó, y el resto de la producción se continúa estableciendo en sistemas de producción con semillas seleccionadas de ciclos anteriores por los productores (Hernández, 2008).

3.1.2. Demanda de semilla de papa

A nivel de Latinoamérica, México fue el primer país certificador de semilla de papa en el año de 1957. La producción de semilla certificada de papa en México se inició con materiales importados de Europa, particularmente de Holanda, este hecho fue fundamental para establecer el programa mexicano de certificación, ya que se tuvieron importantes logros al ser reconocidos como exportadores de semilla certificada, hasta 1972, año en el cual se hizo oficial la presencia en el país del nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*), evitando con esto la continuidad de las exportaciones; por lo que para el siguiente año, México impidió la entrada al país de material para siembra. Años más tarde debido a intereses comerciales, se reanudó la importación de semilla de Europa y Canadá, pero se seguía presentando semilla contaminada con patógenos que no se habían presentado en el país. Al presentarse un riesgo potencial; al conocer el problema fitosanitario de la semilla importada, en 1988 los productores iniciaron la producción de tubérculo-semilla, en ambientes semi controlados, mediante el sistema laboratorio invernadero-campo (Flores *et al.*, 1997).

La producción de semilla de papa en México tuvo un conjunto de disposiciones legales para prevenir la introducción o diseminación de plagas al país, e implicó restricciones a la movilización y comercio nacional e internacional. Por una parte, eso implica una restricción al libre comercio y por otra, minimiza los riesgos de introducir organismos dañinos y causar pérdidas cuyo impacto económico va más allá de los beneficios (Patrón, 2014).

A partir de los sucesos presentados, fue que se estableció la NOM-025-FITO-2000, relacionada con la exportación de tubérculos-semilla producidos bajo condiciones controladas (invernadero) por parte de México a Canadá, la cual regula el manejo de las áreas geográficas, plagas cuarentenarias y todo el sistema de producción de este tubérculo desde el material vegetativo dedicado al consumo y siembra, hasta los sistemas de embalaje y transporte. De igual forma se establecieron la NOM-012-FITO-1995, en la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de papa; la NOM-069-FITO-1995, para el establecimiento y reconocimiento de zonas libres de plagas de papa; y la NOM-041-FITO-2002, tiene como objetivo establecer los requisitos y especificaciones

fitosanitarias que debe cumplir el material propagativo asexual de papa en el territorio nacional, para prevenir el establecimiento y diseminación de plagas cuarentenarias y plagas no cuarentenarias reglamentadas.

En México se siembran alrededor de 64000 ha de papa al año (Tabla 2), de las cuáles solo en el 20% se hace uso de semilla calificada (básica, registrada o certificada), para ello se utilizan 58702 toneladas de microtubérculos; del total de este material, únicamente alrededor del 35% (20545 ton) son producidos en el país y el resto se tiene que importar a precios elevados. En 2010 la mayoría de la superficie todavía fue cubierta por la selección del material de cosechas anteriores, debido en gran medida a la falta de recursos y la insuficiencia en la producción de semilla prebásica bajo las normas establecidas (CONPAPA, 2011).

Tabla 2. Superficie y demanda de tubérculo/semilla a nivel nacional

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Superficie Sembrada (Ha.)	67,848	66,016	61,900	65,617	61,070	54,141	55,646	69,054	68,928	62,201
*Demanda de Tubérculos/semilla (ton)	101772	99024	92850	98426	91604	81212	83468	103581	103392	93302
Nota: * Datos obtenidos de multiplicar 1.5 por la superficie sembrada, de acuerdo a lo señalado por CONPAPA (2009)										

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP, (2014)

3.1.3. Volúmenes de producción

Mientras la superficie cultivada ha tenido fluctuaciones a lo largo del tiempo, el volumen de la producción total ha aumentado, debido a un continuo incremento en el rendimiento por unidad de superficie, principalmente por la incorporación de innovaciones tecnológicas que contrarrestan los problemas fitosanitarios, así como el mejoramiento en las técnicas de manejo del cultivo (Santiago y García, 2001).

3.1.3.1. Volumen de producción de papa

En México, al año se producen en promedio aproximadamente entre 1500 y 1600 miles de toneladas de papa para consumo, de las cuales solo en los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Nuevo León, Estado de México y Guanajuato, se concentra por arriba del 70% de la producción nacional (Tabla 3). La producción en 2002 fue 1483 miles de toneladas y para el 2011 fue de 1433 miles de toneladas, lo que representó una disminución en la producción de 3.4%, aunque presentó un aumento en el valor de la producción, de aproximadamente el 139%, pasando de \$ 6,529.00 millones de pesos en 2002 a \$ 9,070.00 millones de pesos en 2011 (SIAP, 2012). El estado de Sinaloa contribuyó con 20.9% del total, seguido por Sonora 20.4%, Nuevo León 11.6 y Chihuahua con el 9%.

Tabla 3. Volúmenes de producción de papa, miles de toneladas (2002-2011)

Entidad	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Sinaloa	295	320	306	349	280	359	344	314	262	271
Sonora	168	219	172	392	297	341	387	347	377	267
Chihuahua	165	212	213	152	175	180	131	87	108	103
N. León	167	221	143	101	117	134	121	133	135	127
México	100	112	112	159	157	159	129	134	108	105
Guanajuato	111	85	113	95	82	109	91	50	46	44
Subtotal	1005	1169	1059	1248	1109	1281	1204	1065	1035	917
Otros Estados	477	493	447	386	414	470	467	436	502	516
Nacional	1483	1662	1507	1635	1523	1751	1670	1500	1537	1433

Fuente: SIAP, 2012

El rendimiento ponderado promedio a nivel nacional de papa en el periodo 2002-2011 fue de 26.1 toneladas por hectárea, destacando Zacatecas con 39.8 ton·ha⁻¹ y Coahuila con 34.7 ton·ha⁻¹; mientras que Sinaloa fue el estado con mayor producción, el cual se ubicó en el lugar 15 en rendimiento, con 24.3 ton·ha⁻¹ en promedio (SIAP, 2012).

3.1.3.2. Volumen de producción de tubérculo-semilla

La producción de tubérculo-semilla para la producción de papa en México, está reglamentada por la NOM-041-FITO-2002, la cual define a la semilla (microtubérculo o plántula) obtenida en el laboratorio *in vitro* bajo condiciones asépticas como semilla Prebásica I o prenuclear y el término de semilla Prebásica II o nuclear a la progenie de material prenuclear producida en un medio ambiente protegido en sustrato y diagnosticada libre de plagas.

Por otra parte, el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (2012), utiliza los términos de Básica, referida a la primera generación de campo, Registrada a la segunda generación de campo y Certificada a partir de la tercera generación y que siga cumpliendo con los requisitos que la norma exige. Para mayo de 2012 se tenía una existencia de 20,545 toneladas de semilla de papa en las diferentes categorías como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Existencia de semilla calificada de papa en México

CULTIVO VARIEDAD	BASICA	REGISTRADA	CERTIFICADA	TOTAL CATEGORÍA
PAPA	4929.803	15598.374	17.15	20,545
ADORA	27	270	0	297
ALPHA	248.7	1750	0	1,999
ATLANTIC	1152.92	2426.555	0	3,579
FIANNA	700.2	1840.764	0	2,541
FL-1867	1171.283	3212.385	0	4,384
GIGANT	660	1436.72	0	2,097
MONDIAL	155	1711.55	0	1,867
SNOWDEN	490	925	0	1,415
VIVALDI	257.2	1947	17.15	2,221
CAESAR	67.5	0	0	68
FELSINA	0	78.4	0	78

Fuente: SNICS, 2012

De acuerdo a lo señalado por SIAP (2014) para los últimos años, se observan altibajos en los volúmenes de producción a lo largo del tiempo, destacando un aumento considerable en 2010 (Tabla 5), año en que se dieron impulsos a la producción de papa en México por parte de SAGARPA, logrando establecer el sistema de laboratorio-invernadero-campo con base en la metodología que presenta el Dr. Marco Antonio Arellano García, con ayuda del gobierno federal (Arellano *et al.*, 2010).

Tabla 5. Volumen de producción en toneladas de tubérculos-semilla de papa en México

2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
2,400	2,374	1,260	4,366	3,174	4,413	735	12,233	7,900	6,234	14,527

Fuente: SIAP, 2014.

Considerando la relación entre las tablas 2 y 5, se puede determinar que a pesar del aumento que se ha tenido en la producción de tubérculos/semilla de papa aún no se logra satisfacer la demanda de semilla, ya que solo representa el 15% de lo que se necesita para satisfacer la superficie sembrada en el país en 2013.

3.1.4. Problemas Fitosanitarios

Existe una variada gama de enfermedades que afectan tanto a la planta como el tubérculo de papa. Los patógenos que provocan las numerosas enfermedades, por lo general están presentes en el suelo o bien pueden ser transmitidos por tubérculo-semilla. Todos los agentes patógenos se multiplicarán a medida que el hospedero sea abundante y permanente; de esta manera, cuando un suelo esté siendo utilizado como monocultivo y/o se use tubérculo-semilla de mala calidad, se aumentará el inóculo y también las pérdidas debidas a un bajo rendimiento (Castro y Contreras, 2011).

Debido a la cultura de producción y la condición socioeconómica de una buena parte de los productores, los tubérculos que se producen para al consumo son desviados clandestinamente para su uso como tubérculos-semilla, lo que representa un riesgo para la sanidad del cultivo de la papa en México, ya que de esta forma pueden ingresar y dispersarse

plagas de importancia cuarentenaria (CONPAPA, 2007). El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2012) menciona que una práctica regional común de algunos productores, es comprar el tubérculo-semilla a los grandes productores de la región u obtenerla de su propia cosecha del año anterior. Se estima que el desvío oscila entre el 5% y 10% de la papa que existe en el mercado para consumo, lo cual representa volúmenes que se han importado de Estados Unidos, a un mínimo de 10000 toneladas anuales que habiendo sido producidas en campos estadounidenses con presencia de las plagas cuarentenarias, llegaría a los campos mexicanos, incrementando el riesgo en la diseminación y establecimiento de plagas que también afectarían a la producción de tomate, chile y berenjena, entre otros cultivos, en los cuales México es ampliamente competitivo. Esta situación podría disminuir la competitividad de la horticultura mexicana; generando desempleo, disminución de ingresos y de divisas, desabasto y un consecuente incremento en el precio para el consumidor final (SENASICA, 2012).

El potencial de pérdidas económicas en la producción nacional de papa por el ingreso posible de plagas cuarentenarias, tomando como base la información oficial reportada por el SIAP (2012) considera una superficie sembrada que se podría afectar de 68,928 ha, con una producción total de 1,801,618.31 toneladas cuyo valor de producción total es de 10,679,026.9 miles de pesos, solo considerando la producción de papa, aunque estas enfermedades podrían afectar a los cultivos antes mencionados, llegando a afectar más de un 400% de dichas cifras. El uso de una parte vegetativa (tubérculo), que no esté en un proceso de certificación, del cual se desconoce su sanidad, genera un alto riesgo de convertir esta parte vegetativa en un diseminador de enfermedades, pues la planta, a través del tiempo, va acumulando enfermedades de todo tipo y la única forma de mantener una reproducción sana es aquella que usa material de reproducción sano.

El SENASICA en 2012, realizó un análisis de riesgo de plagas para la importación de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) a México, donde se categorizaron 83 plagas cuarentenarias para México, siendo estas: 24 virus, cinco fitoplasmas, tres bacterias, ocho hongos, 17 nematodos, 24 insectos y dos moluscos. De acuerdo con la categorización del riesgo, 63 de estas plagas son de riesgo alto, 18 de riesgo medio y dos de riesgo bajo

3.2. Métodos de Propagación de papa

La papa se puede propagar por medio de la reproducción sexual (semilla botánica) y asexual (tubérculo); aunque la sanidad fisiológica de los tubérculos-semilla está entre los factores más importantes que influyen sobre la producción (Arellano *et al.*, 2010). La papa generalmente se propaga vegetativamente por tubérculos-semillas, lo que asegura la conservación de características varietales durante generaciones sucesivas; sin embargo, debido a su forma de propagación asexual está sometida a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos, bacterias e insectos, durante el período de cultivo y almacenamiento; además de que al emplear el material vegetativo por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo por la acumulación de enfermedades, especialmente virales (Scherwinski y Luces, 2004). En cuanto a la semilla botánica se emplea fundamentalmente para fines de mejoramiento genético

Algunas de las ventajas de utilizar tubérculos-semilla para la multiplicación de la papa son: la producción de plantas sanas, la uniformidad de los tubérculos y el crecimiento vegetativo vigoroso (Arellano *et al.*, 2010). Existen técnicas de multiplicación dentro de las cuales se encuentra la producción *in vitro* o cultivo de tejidos. Esta técnica es muy flexible y produce una tasa de multiplicación alta, la cual proporciona vitroplántulas libres de enfermedades.

3.2.1. Sistema tradicional

El tubérculo de la papa se considera como la semilla unitaria tradicional y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo, incluyendo su estado fitosanitario (Igarza *et al.*, 2012).

La planta de papa está constituida por un juego sinérgico de tallos verdaderos y tallos modificados en estolones y tubérculos que estructuralmente definen las componentes de rendimiento del cultivo. Durante el crecimiento del tallo principal, también se produce

crecimiento de los brotes laterales subterráneos llamados estolones, que a partir de algunas señales ambientales específicas de luz, temperatura y madurez, se engrosan para formar los tubérculos, órganos de reserva y de almacenamiento principalmente de almidón y proteínas. (Cabezas, 2013).

El ciclo de la planta, contempla agotar las sustancias de reserva que se acumularon dentro de los tubérculos en la formación de flores y semillas, por lo que se realiza la defoliación, mecanismo que impide desviar las sustancias de reserva y permite que se conserven en los tubérculos (Cabezas, 2013). Una vez cosechados, requieren de un periodo de acomodación y regulación fisiológica denominado dormancia, para lograr activarse nuevamente y así generar nuevos brotes para continuar con la sobrevivencia de la especie; motivo por el cual, los productores seleccionan sus semillas a partir de tubérculos que después de transcurrido este periodo de dormancia generan los brotes que se utilizan para posteriores siembras. La maduración del tubérculo está en función del equilibrio hormonal, especialmente por el descenso de auxinas y giberelinas en las yemas, el incremento de ácido absísico y el descenso en los niveles de citocininas (Suttle y Banowetz, 2000).

Tradicionalmente, muchos agricultores han seleccionado como semilla las papas que no pueden comercializar; generalmente se incluyen tubérculos deformes, cortados o pequeños, lo cual origina plantas débiles, enfermas y con bajos rendimientos, ya que no se ha tomado en cuenta la sanidad del cultivo para establecer las siembras (Corzo, 2001).

3.2.2. Micropropagación

La micropropagación de plantas forma parte de la biotecnología moderna, en la cual se utiliza el cultivo de tejidos vegetales para multiplicar rápida y masivamente una especie de interés (Arellano *et al.*, 2010). Mediante esta técnica se pueden producir vitro-plántulas a partir de pequeños segmentos (yemas, tallos, hojas) que crecen dentro de un tubo o frasco en un medio aséptico, libre de microorganismos. El cultivo de tejidos permite manipular no sólo los mecanismos de diferenciación celular, sino también los factores físicos y químicos que

los regulan, por lo que en papa las técnicas de micropropagación pueden utilizarse para producir en un tiempo corto una gran cantidad de vitro-plántulas y microtubérculos *in vitro*, ambos con calidad fitosanitaria.

La micropropagación es el método más rápido para producir plántulas manteniendo su calidad fitosanitaria; además, la técnica del cultivo de tejidos vegetales ha solucionado algunos de los problemas asociados al sistema convencional de producción de tubérculos-semilla, como son la obtención de una gran cantidad de vitro-plántulas sin virus (Khurana *et al.*, 2003).

El término cultivo *in vitro* se define como el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (semillas, embriones u órganos superiores) dentro de recipientes de vidrio en condiciones estériles de ambiente controlado (Pierik, 1987). De tal forma es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Los principales factores no biológicos que afectarán al desarrollo del cultivo *in vitro* son: 1) La composición del medio y el pH (ambiente químico) y 2) la temperatura, luz y fotoperiodo, a los cuales serán sometidos los explantes (ambiente físico).

El cultivo de tejidos permite manipular los mecanismos de diferenciación celular, así como los factores físicos y químicos que los regulan, por lo que en papa las técnicas de micropropagación pueden utilizarse para producir en un tiempo corto no sólo una gran cantidad de vitro-plántulas, sino también microtubérculos *in vitro*, ambos con calidad fitosanitaria. Para la multiplicación bajo la técnica de cultivo de tejidos vegetales de esta especie, se utilizan segmentos de tallo con al menos una yema axilar como explantes, los cuales pueden colocarse en tubos, frascos o envases de mayor tamaño, variando el número de ellos, pues pueden colocarse 4, 10 o 25, según el tamaño del recipiente. Los explantes, cualquiera que sea su naturaleza, requieren de un medio que suministre un balance nutricional adecuado, para que a corto plazo se obtenga un crecimiento óptimo (Toledo *et al.*, 1998).

El medio de cultivo contiene además de altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, sales inorgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento y otros aditivos,

en dependencia de la especie y de la técnica de cultivo (Aragón *et al.*, 2009). El medio que más se ha utilizado para la producción de plántulas *in vitro* de papa es el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual es adicionado con diferentes dosis de fitohormonas, vitaminas y ajustadores osmóticos, dependiendo de los intereses establecidos.

3.3. Aplicación de la micropropagación en la producción de papa

La propagación *in vitro* de papa se ha llevado a cabo mediante el sub cultivo de yemas axilares, pudiendo obtener tanto plántulas como vitro-tubérculos (Igarza *et al.*, 2012). Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir microtubérculos cuando se colocan en condiciones adecuadas, los cuales se originan principalmente en estructuras aéreas de la planta aunque también pueden formarse en el medio de cultivo. La producción de tubérculos *in vitro* fue descrita por primera vez como una herramienta experimental para el examen de la tuberización de la papa y los problemas fitopatológicos, señalando diversos nombres como mini-tubérculos producidos *in vitro* o vitro-tubérculos; pero se ha aceptado internacionalmente el uso del término microtubérculos (Igarza *et al.*, 2012).

El empleo de plantas *in vitro* y microtubérculos en la producción de semilla de papa tiene ventajas con respecto a la semilla convencional, pues están libres de patógenos, se obtiene un gran número en cortos periodos de tiempo, se reducen los costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en campo, entre otros aspectos. Además, pueden ser propagados en cualquier época del año, se facilita el intercambio de material genético y se reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material vegetal por cruzamiento. Sin embargo, se requiere personal especializado, infraestructura y equipamiento, con productos químicos de elevado costo (Pérez *et al.*, 2001). Por otra parte, en la producción de semilla de papa por métodos biotecnológicos en la siembra directa de plantas *in vitro* en campo se producen pérdidas en el traslado. En consecuencia, se elevan los requerimientos de atenciones culturales por personal altamente calificado y se han incrementado las pérdidas de tubérculos en las cosechas por daños o enfermedades, así como

la conservación, debido principalmente a la incidencia de microorganismos patógenos del suelo (Jiménez-Terry, 2000).

La aplicación del cultivo de tejidos y las técnicas aceleradas de multiplicación para la producción de semilla original, se han expandido tanto a países desarrollados como a otros menos desarrollados, pero debe estar bien fundamentada la creación de un programa de producción de semilla (Quiñones *et al.*, 2004). Las técnicas de multiplicación acelerada pueden incrementar aparentemente el costo de la semilla; sin embargo, este efecto es contrarrestado al obtener una mayor cantidad de tubérculos-semilla, producto de las sucesivas multiplicaciones que trae consigo, además, un incremento en el vigor de las plantas.

La producción *in vitro* de tubérculos ofrece una serie de ventajas, pues facilita la implementación de programas de producción de semillas, distribución e intercambio de germoplasma, proveyendo material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada o de experiencia en cultivo de tejidos, pues pueden ser sembrados en forma mecánica. Mediante esta técnica como se pueden obtener tubérculos en cualquier época del año, es posible la realización de siembras tempranas, logrando un escalonamiento de la producción; además, por su tamaño pequeño y escaso peso, reduce los precios de transporte, pueden ser almacenados por varios meses sin que pierdan su viabilidad y se genera material limpio, libre de enfermedades y genéticamente estable (Pomar, 2002).

3.4. Efecto de la relación hormonal durante la producción *in vitro*

La propagación *in vitro* puede llevarse a cabo gracias a que las células vegetales poseen dos características que las hacen especiales: la totipotencia, capacidad inherente de una célula para generar una planta completa y la dediferenciación, capacidad de una célula diferenciada para volver al estado meristemático, además de la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog y Miller en 1957, quienes mencionaron que la relación óptima de auxina/citocinina, facilita la formación, proliferación y alargamiento de yemas axilares. Para que una célula vegetal exprese su totipotencia debe experimentar una dediferenciación y

luego una nueva diferenciación, de acuerdo a las condiciones ambientales del cultivo. Esto puede lograrse si se colocan partes pequeñas de un tejido u órgano de la planta (explante) en un medio de cultivo apropiado con los nutrientes y reguladores de crecimiento, los cuales manipulados convenientemente pueden generar callos y posteriormente desarrollar yemas o embriones (Pérez, 2010).

Los callos se pueden definir como masas de tejido parenquimático indiferenciado en crecimiento activo, que surgen del crecimiento desorganizado de explantes sobre un medio de cultivo específico en condiciones asépticas, los cuales no corresponden con ningún tejido particular de la planta completa. El término cultivo de callos fue escogido debido a que la proliferación celular se pensaba era inducida por la herida del explante durante la escisión; sin embargo, se ha encontrado que es inducido por reguladores de crecimiento de la planta en el medio de cultivo sólido. Las hormonas y los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican procesos fisiológicos en las plantas, en general son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta sintetiza y que determinan el crecimiento activo de todos los órganos (Whahby, 2007).

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento en el cultivo de tejidos dependen del objetivo propuesto y la especie a emplear. Las principales hormonas involucradas en la propagación *in vitro* son las auxinas y las citocininas; el efecto de su relación puede conducir a la formación de yemas, crecimiento de callos indiferenciados o a la formación de tejidos de raíz (Pérez, 2010).

3.4.1. Auxinas

El nombre auxina significa en griego crecer y es dado a un grupo de compuestos que regulan el crecimiento, la división, alargamiento y diferenciación celular, en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos

vasculares (Llorente, 2000); influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales, estimulando el alargamiento o distensión de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras (Hoyos *et al.*, 2008).

La acción principal de las auxinas en el cultivo *in vitro*, es la estimulación celular y el desarrollo de callos (Mejía *et al.*, 2006); sin embargo, existe una gran diversidad de protocolos de micropropagación que pueden diferenciar la concentración de reguladores de crecimiento, cada uno es característico de cierta especie, pues presentan variaciones, pero en cuanto a enraizamiento *in vitro* se han tenido resultados cuando se aplican condiciones de oscuridad, distintos tipos y concentraciones de auxinas, y aclimatación gradual (Uribe *et al.*, 2012).

Las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejido vegetales, son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indol butírico), el pCPA (ácido *p*-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2oxiacético) (Llorente, 2000). De acuerdo a las necesidades de cada investigación, son las aplicaciones de cada tipo de regulador de crecimiento, lo cual puede generar resultados diversos.

3.4.2. Citocininas

Las citocininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*; poco después de su descubrimiento Skoog y Miller propusieron que la formación de órganos en las plantas se debe al balance existente entre las citocininas y las auxinas. Usando cultivos de tabaco, demostraron que un balance alto de auxinas favorecía la formación de raíces, mientras que un balance alto de citocininas favorecía la formación de tallos. Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, las citocininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos (Hoyos *et al.*, 2008).

La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas (Llorente, 2000). Estas hormonas pueden proporcionarse de forma sintética con BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina); o de forma natural con Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales.

La función de las citocininas se traduce en provocar también la división celular y, además, regular la diferenciación de los tejidos cultivados (Mejía *et al.*, 2006).

3.4.3. Relación Auxina – Citocinina

Las auxinas y las citocininas son dos grupos de reguladores hormonales que inician el crecimiento celular desdiferenciado y promueven la división celular, respectivamente (Pérez, 2012). La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1.0 se producen callos, es decir, cuando la concentración de citocininas es menor que la de auxinas, se produce desarrollo de raíces, pero cuando la cantidad de citocininas es mayor que la de auxinas, se desarrollan yemas adventicias (Mejía *et al.*, 2006).

En busca de mejorar la baja tasa de multiplicación en la técnica de cultivo de tejidos vegetales, se han realizado investigaciones donde ha quedado demostrado que mediante modificaciones en la composición química del medio de cultivo, especialmente del balance citocininas/auxinas, así como de otras condiciones físicas y químicas del cultivo, es posible inducir la diferenciación de numerosas yemas; sin embargo, pueden ocurrir algunas

variaciones en la respuesta, dependiendo de la variedad y de las condiciones del cultivo (Marín *et al.*, 2009).

El estado fisiológico determinará los factores exógenos que deben añadirse o sustraerse al medio de cultivo, para que pueda inducir la respuesta morfogénica requerida. Los cambios morfológicos pueden variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula y otros aspectos (Marín *et al.*, 2009). Gouhua en 1998, demostró el efecto de las citocininas en promover la organogénesis, destacando la importancia de benciladenina (BA) y tiadiazuron en combinación con auxinas y Páez en 1989 señaló que algunos medios de cultivo para iniciación de cultivo de tejidos en tubérculos de yuca que contienen ácido naftalenacético (ANA) y bencil aminopurina (BAP) en determinadas concentraciones conducen a la formación de callos. En la evaluación de 19 clones de yuca, se encontraron diferencias significativas entre los clones evaluados, en cuanto al desarrollo de la parte aérea; longitud de vitroplantas y número de nudos producidos.

Por su parte, Pardo *et al.*, (2011) establecieron un protocolo para la regeneración de plantas de ajo (*Allium sativum*) a partir de segmentos de hojas y raíces, determinando que la combinación de auxinas y citocininas, así como la influencia del tipo de explante y su posición en la micro planta, influye en la inducción de callos y su posterior regeneración a brotes. Mientras que Carhuaricra *et al.* (2012) en la misma especie, encontraron que los explantes extraídos de la sección apical de las raíces, favorecieron la regeneración de callos, en comparación con segmentos basales de las hojas.

Los regímenes hormonales estipulados en los protocolos de cultivo *in vitro* dan cuenta únicamente de la concentración hormonal agregada al medio, sin considerar el nivel hormonal propio de la célula y si los reguladores de crecimiento pudieron ser procesados por las células en estudio (Llorente, 2000). Además, es posible que se genere un control por retroalimentación negativa sobre el nivel endógeno de los reguladores de crecimiento inducido por las sustancias agregadas y que exista un arrastre celular o del medio de los tratamientos anteriores. Es factible que estos aspectos sean la fuente de todas las aparentes contradicciones que se generan al tratar de explicar los efectos de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

3.5. Efecto del Fotoperiodo en la propagación *in vitro* de papa

Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en condiciones ambientales semejantes a las naturales favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los principales factores del ambiente que inciden sobre las plantas, el comportamiento de muchos cultivos depende de la calidad, intensidad y fotoperiodo de la luz que reciben, dado que varias enzimas involucradas en el desarrollo y en el metabolismo secundario son influenciadas por la luz (Llorente, 2000).

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Se asume que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa; los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autótrófica. Además, una irradiación excesiva produciría un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo debido al efecto invernadero (Penacho *et al.*, 2002).

La alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad; El fotoperiodo, algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperiodo *in vivo* será también el mejor fotoperiodo *in vitro* (Pierik, 1987).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, la cual se ubica en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México; donde se contó con los espacios asépticos y materiales diversos para llevar a cabo la producción de microtubérculos en forma adecuada.

4.2. Material Vegetativo

Para obtener los explantes en condiciones adecuadas se emplearon tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha, producidos bajo condiciones de invernadero procedentes de Texcoco, Méx., los cuales fueron sometidos a temperaturas de 4 a 6°C mediante un periodo de refrigeración de 10 días para romper la dormancia y estimular el desarrollo de yemas axilares. Posteriormente se lavaron los tubérculos junto con las yemas formadas con jabón líquido antibacterial y bajo chorro de agua corriente. Se desinfectaron como lo menciona el apartado 4.4.1.

4.3. Diseño Experimental

Se realizó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y ocho repeticiones cada uno, haciendo un total de 40 unidades experimentales; considerando como tratamientos diferentes relaciones de auxina/citocinina en el medio de cultivo (Tabla 6), utilizando como fuente de auxinas el Ácido Indolbutírico (AIB) y la Benciladenina (BA) para el aporte de citocininas. Los datos se procesaron mediante un Análisis de Varianza y comparación de medias de Tukey con $\alpha = 0.05$. Con el programa Minitab v17.

Tabla 6. Relación Auxina/Citocinina del medio MS

<i>Tratamiento</i>	Auxinas (AIB) (mg·L⁻¹)	Citocininas (BA) (mg·L⁻¹)
<i>T1</i>	-	-
<i>T2</i>	1	-
<i>T3</i>	-	1
<i>T4</i>	1	1
<i>T5</i>	1	0.5

Una vez propagadas las yemas axilares de tubérculos de papa cv. Alpha, se dispuso del material libre de patógenos para realizar la nueva siembra con las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento y llevar a cabo el proyecto.

Al establecer el experimento, se dejó un periodo aproximado de 30 días, para que se establecieran los explantes en el medio y comenzar a realizar las mediciones de los parámetros a considerar para realizar el análisis de los cambios morfológicos que presentan los explantes de papa cv. Alpha con diferentes proporciones de auxina/citocinina; estas mediciones se hicieron semanalmente durante un periodo de seis semanas.

4.3.1. Parámetros a evaluar

Para llevar a cabo el análisis de cambios morfológicos de las plántulas producidas *in vitro*, se consideraron los parámetros siguientes:

Altura de vitro planta.- Se realizó la medición estimada de las plántulas desarrolladas en el medio de cultivo, con el uso de hojas milimétricas, con las cuales se colocó cada tubo de ensaye sobre dichas hojas y se toma la medida desde la base del tallo hasta el ápice de cada vitro-plántula a los 30, 37, 44, 51, 58 y 65 días después de colocados *in vitro*, realizando la lectura final extrayendo las plántulas de los tubos de ensaye.

Número de segmentos nodales. - Por conteo visual a los 30, 37, 44, 51, 58 y 65 días después de colocados *in vitro*, se realizó el conteo de nudos que se formaron en cada uno de los vitro-tallos formados, llevando a cabo un promedio por unidad experimental. También se realizó una lectura final extrayendo las plántulas de los tubos de ensaye y promediando para cada unidad experimental y tratamiento.

Desarrollo de raíces.- Solo se realizó una lectura al final del experimento, en la cual se retiraron las plantas del medio de cultivo, se enjuagaron con agua destilada y en una probeta con una cantidad establecida de agua, se sumergió la parte subterránea de cada plántula y se tomó la medida del agua desplazada, generando un valor de peso volumétrico de la raíz.

Número de microtubérculos.- Por conteo visual, una vez retirada y enjuagada la parte subterránea de la plántula, se realizó un corte anatómico para asegurar la existencia de microtubérculos y se procedió a realizar el conteo.

4.4. Manejo Experimental

4.4.1. Desinfección del explante

Para la multiplicación del material a propagar se utilizaron yemas obtenidas de algunos tubérculos, por lo cual la desinfección comenzó con un lavado con jabón, posteriormente se colocaron en un vaso de precipitados que contenía agua destilada, hipoclorito de sodio al 5 % y tres gotas de Tween 20 durante cinco minutos, posteriormente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada/esterilizada para eliminar residuos de los agentes desinfectantes.

4.4.2. Preparación del medio de cultivo

Basados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (Anexo 2) y con los tubos previamente esterilizados; se prepararon las soluciones nutritivas necesarias que contenían tanto los macroelementos como los microelementos para la elaboración del medio. Posteriormente se colocaron 500 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y se le agregaron las soluciones nutritivas, mientras que en otro vaso con la misma cantidad se diluyó el agar y la sacarosa. Se mezclaron ambas soluciones, se colocaron dentro del microondas durante tres minutos para lograr una mezcla homogénea, finalmente por medio de un potenciómetro marca Oakton se ajustó el pH a 5.7.

Cabe mencionar que la primera vez que se elaboró medio de cultivo, éste no tenía hormonas, ya que solo se hizo con la intención de aumentar la disponibilidad de material vegetativo y no afectar la relación con la que se quiere trabajar, por lo que para la segunda siembra se colocó el medio de cultivo MS modificado por la relación hormonal de cada tratamiento.

Finalmente se aplicaron 10 mL de medio de cultivo en cada tubo de ensaye y se colocaron en la autoclave (AESA mod. cd. 300) durante aproximadamente 20 minutos a una presión de

1.4 kg·cm², alcanzando una temperatura de alrededor de 120° C, con lo que quedaron listos para la siembra de los explantes.

4.4.3. Siembra del material vegetativo

Una vez propagados los brotes en ambiente aséptico, se realizaron cortes transversales de las plántulas como explantes para la nueva siembra, por lo que únicamente se desinfectó el instrumental y tubos de ensaye con cloro y fueron colocadas en un autoclave durante 20 minutos a 1.4 kg·cm². Finalmente se trabajó con alcohol en la campana de flujo laminar, realizando la siembra en tubos de ensaye cerca del mechero de alcohol para esterilizar el ambiente lo mejor posible.

La primera siembra se realizó colocando una yema axilar obtenida de tubérculos de papa sometidos a estrés por frío previamente desinfectado, en cada tubo de ensaye, con el medio de cultivo sin hormonas. Se sembró en condiciones asépticas, con las herramientas esterilizadas y en un ambiente controlado.

Posteriormente se realizó la segunda siembra, partiendo del material generado anteriormente, se extrajeron las plántulas de los tubos de ensaye y se realizaron cortes transversales con bisturí para obtener segmentos del tallo con yema axilar o apical, colocando tres explantes que contenían tres segmentos nodales cada uno, en el medio de cultivo que ya contaba con la proporción de hormonas de acuerdo a lo establecido en cada tratamiento (Tabla 6). Los tubos fueron sellados para después trasladarse al cuarto de incubación para que las condiciones del ambiente no limitaran el desarrollo de las plantas.

4.4.4. Proliferación

Se colocaron los tubos de ensaye sembrados en el cuarto de cultivo con una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 60 – 70% iluminados con luz fluorescente y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Durante la fase de multiplicación de material vegetal (primera siembra) un periodo de 75 días, en los cuales ya se contaba con material suficiente para la siguiente fase.

Se realizó una prueba al colocar explantes de las mismas plantas obtenidas, tomando en cuenta el desarrollo de las plántulas en completa oscuridad, con la finalidad de evaluar los cambios morfológicos que presentan los explantes con las mismas condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente, pero sin ninguna fuente de luz. En este caso los parámetros a evaluar solo fueron el volumen de la raíz y el número de microtubérculos presentados en la parte subterránea de las plántulas, debido a que los datos de altura y segmentos nodales pueden estar condicionados por un proceso de etiolación, por lo cual nos daría un dato que no es significativo en cuestiones prácticas.

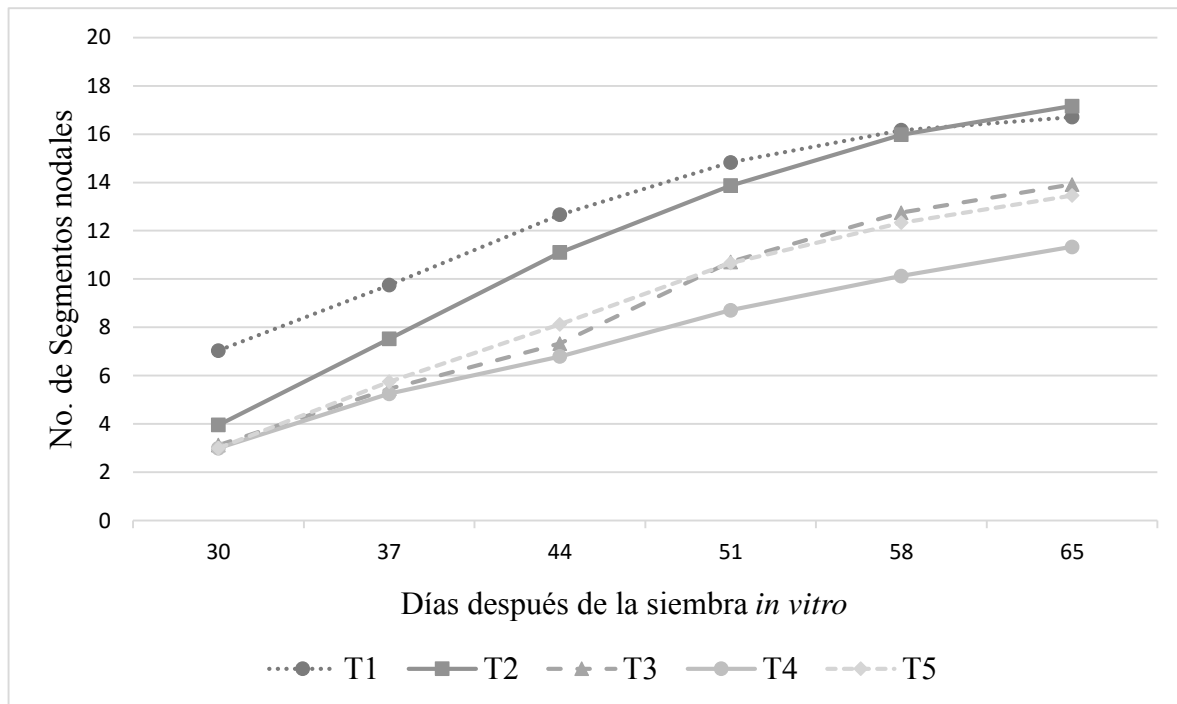
V. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se llevó a cabo un análisis de cada uno de los parámetros evaluados, donde se observó lo siguiente:

Número de segmentos nodales

El análisis de varianza (anexo 1.1) mostró diferencias significativas entre los tratamientos ya que desde los primeros quince días, a partir de la siembra de los explantes *in vitro* se observó el comportamiento en el número de segmentos nodales desarrollados en cada uno de los tratamientos, siendo el tratamiento donde no se adicionaron hormonas (T1) quien mostró una mayor cantidad de segmentos nodales en comparación con los demás tratamientos; aunque al finalizar las muestreos a 65 días después de la siembra *in vitro* se presentó un igual número de segmentos nodales entre las plantas que fueron tratadas con únicamente auxinas (T2) y el testigo (Figura 1).

Figura 1. Incremento del número de segmentos nodales obtenidos en plántulas producidas *in vitro*



Al final de la investigación se observó que todos los tratamientos, a excepción de T4, fueron estadísticamente iguales, presentando de 17 a 13 segmentos nodales por tallo (Tabla 7). Sin embargo, el tratamiento donde se adicionó igual proporción de auxinas-citocininas (T4), que presentó el menor número de segmentos nodales, fue estadísticamente igual a aquellas plantas que fueron tratadas con sólo citocininas (T3) y aquellas donde se adicionó mayor proporción de auxinas con relación a citocininas (T5). Por lo que puede observarse que el no proporcionar hormonas en la solución nutritiva para cultivo *in vitro* permite un comportamiento aceptable en la formación de segmentos nodales de *Solanum tuberosum* L. y la existencia en partes iguales de auxinas y citocininas puede limitar esta respuesta.

Tabla 7. Datos de los parámetros a medir con la comparación entre tratamientos

Tratamiento	Número de segmentos nodales	Altura de planta (cm)	Volumen de raíz (mL)	Número de tubérculos
T1	16-17 a	7.66 ab	1.4 b	42-43 a
T2	17 a	8.56 a	0.7 c	29-30 ab
T3	13-14 ab	6.7 ab	1.0 bc	7-8 b
T4	11 b	5.99 b	2.2 a	42-43 a
T5	13-14 ab	6.52 b	0.7 c	8-9 b

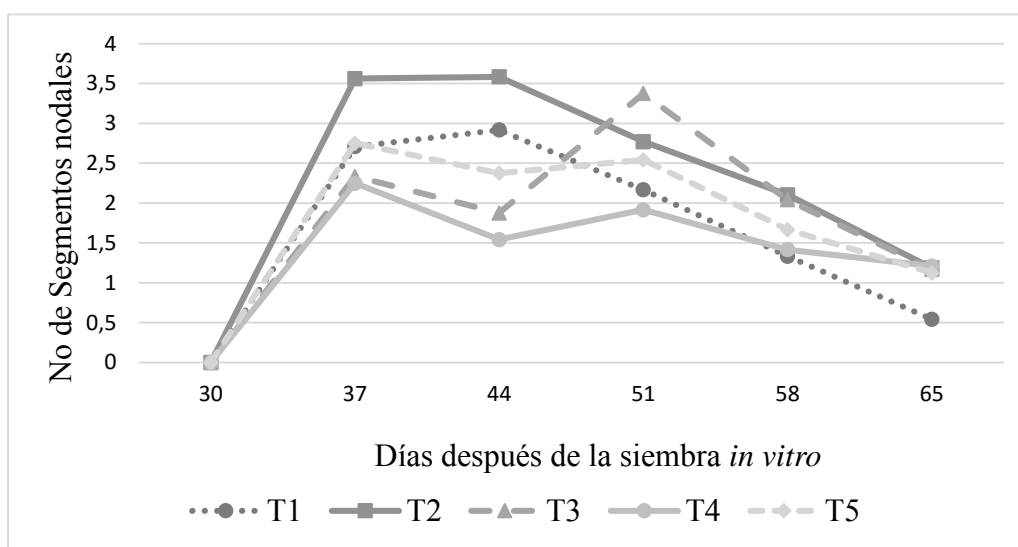
Nota: Letras iguales son estadísticamente similares entre sí, con $\alpha = 0.05$

Dicha respuesta puede deberse a que el brote inicial que fue utilizado como explante cuenta con una carga hormonal que le permite el desarrollo natural de nuevos brotes, pues los lugares de biosíntesis natural de dichas hormonas se encuentran en los ápices para el caso de las auxinas y en las zonas meristemáticas (Acosta *et al.*, 2000), por tanto, en un momento pudo no haberse afectado el resultado cuando había mayor proporción de auxinas o de citocininas y limitarse cuando la carga hormonal exógena era en igual proporción. Estos resultados son similares a los reportados por Pacheco (2005), quien encontró que en plantas de Cucúrbitas, obtenidas *in vitro*, se tuvo menor número de nudos cuando se aplicó

citocininas y auxinas, a diferencia de plantas que fueron tratadas solo con citocininas o auxinas.

Como puede observarse en la Figura 2, la tasa de desarrollo de segmentos nodales en las plantas de los diferentes tratamientos tuvo un comportamiento de doble sigmoide en aquellas que contenían citocininas (Tratamientos T3, T4 y T5), ya sea como única fuente hormonal o bien acompañada de auxinas. Mientras que aquellas plantas que se les aplicó solo auxinas (T2) o no se adicionó alguna fuente hormonal (T1), tuvieron una rápida velocidad de crecimiento en la primera semana, disminuyendo en forma progresiva a partir de la tercera semana después de colocadas *in vitro*.

Figura 2. Tasa de desarrollo de segmentos nodales *in vitro*-plantas de papa con diferente nivel de auxina-citocinina en el medio de cultivo



El comportamiento sigmoide de los tratamientos donde se aplicó citocininas, puede ser referido por etapas de división celular y el crecimiento de las células, mientras que con el aporte solo de auxinas se tuvo un crecimiento exponencial en la primera semana, disminuyendo la tasa de desarrollo de segmentos nodales hasta la sexta semana; por tanto, si la planta siguiera un comportamiento similar, a partir de la última toma de datos, posiblemente los tratamiento con citocininas puedan generar plantas de mayor altura, en virtud de las etapas de división y alargamiento celular, mientras que las de auxinas continuarían disminuyendo su velocidad de crecimiento.

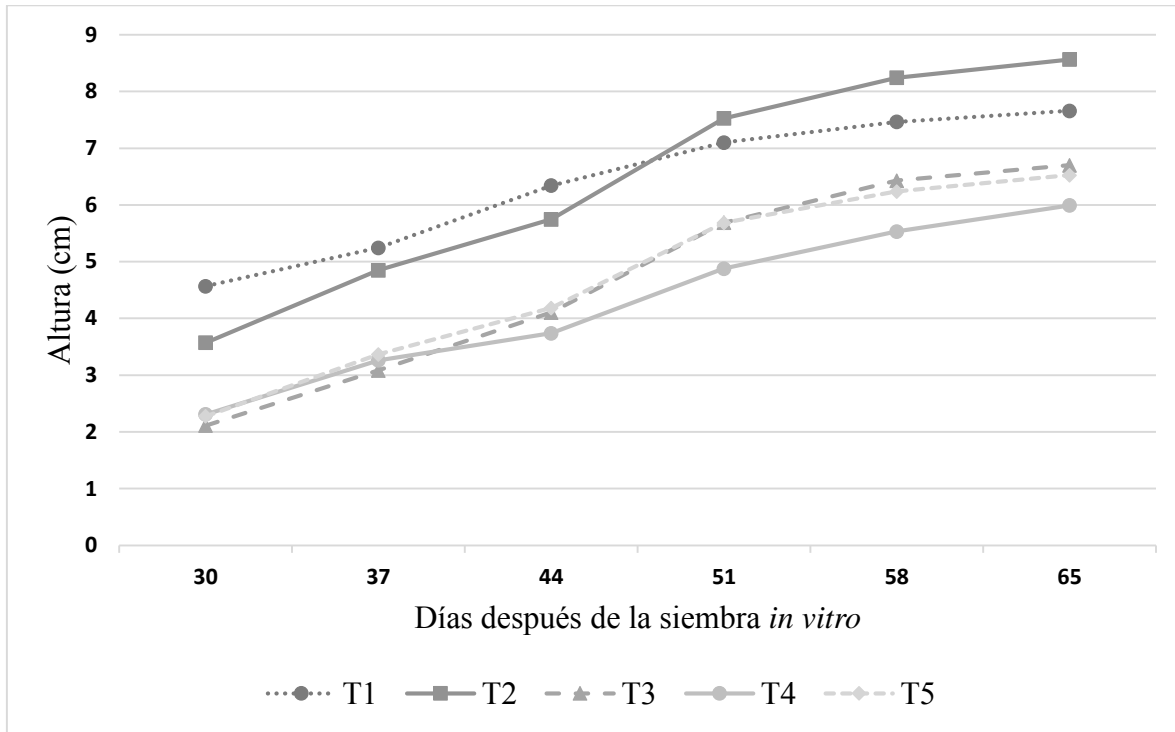
Altura de brotes

Una vez realizado el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (anexo 1.2) existiendo una relación entre la altura de la planta y el número de segmentos nodales, ya que hubo un comportamiento similar, presentando al mejor tratamiento a las plantas que fueron tratadas únicamente con auxinas (T2), pero siendo estadísticamente similares a las plantas testigo (T1) y las que se adicionó únicamente citocininas (T3); mientras que las plantas con menor número de segmentos nodales, que fueron las del tratamiento con igual proporción auxinas citocininas (T4) fueron las que presentaron una menor altura de planta, pero a su vez fueron estadísticamente iguales a todos los demás tratamientos a excepción de las plantas del tratamiento T2 (Tabla 7). Lo anterior sigue haciendo referencia a que los explantes utilizados cuentan con un soporte hormonal que les permite desarrollarse sin necesidad del aporte de reguladores del crecimiento en forma exógena y que existe una fuerte relación entre la altura y la formación de segmentos nodales.

Lo anterior coincide con los resultados encontrados por Mejía y colaboradores (2006) en su publicación “Propagación *in vitro* de papa ratona (*Oxalis tuberosa*)”, donde establecen el ácido naftalenacético como fuente de auxinas, en cuyos tratamientos con dicha hormona se reportan los datos más altos de longitud.

De acuerdo al incremento que fueron presentando las plantas de los diferentes tratamientos durante los días que duró el experimento, se denotó que desde el inició las plantas donde se aplicó solo auxinas y las testigo, fueron las que mayor altura tuvieron; pero existiendo mayor tamaño en el tratamiento donde no se tuvo aplicación de hormonas, durante las primeras tres semanas, para posteriormente ser superadas por las plantas del tratamiento con aplicación de únicamente auxinas (Figura 3).

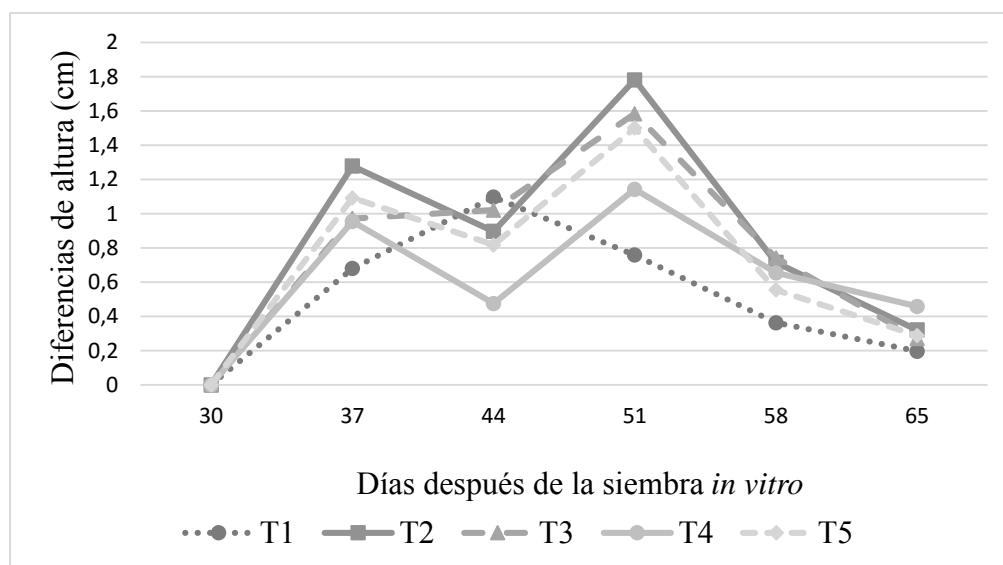
Figura 3. Incremento de altura de vitro-planta de papa, con diferente relación auxina/citocinina, durante la proliferación *in vitro*



Las plantas de los demás tratamientos tuvieron un comportamiento más bajo desde el inicio del experimento, manteniendo esa característica hasta el final de la toma de datos, a la sexta semana de trasferidas *in vitro*. Con base en estos resultados, se puede determinar que las hormonas si presentan un efecto sobre el crecimiento de las vitro-plantas de papa y que el balance entre las auxinas y citocininas puede demeritar el alargamiento de las plantas; de hecho las auxinas ayudan a que exista mayor incremento debido a su actuación en el crecimiento de las células, pero se debe considerar que el balance con otras hormonas, como es el caso de las citocininas, puede ocasionar diferencias en el comportamiento de las plantas, tal como son los resultados en este trabajo, donde las citocininas que se relacionan más con la división celular, no tuvieron un efecto sinérgico de las auxinas, provocando una menor crecimiento de las vitro-plantas.

Al observar el comportamiento en la tasa de crecimiento de altura de las plantas en los diferentes tratamientos (Figura 4), se encuentra que al igual que en la formación de segmentos nodales tuvo un comportamiento de doble sigmoide a excepción de las que no se les aplicó hormonas; esto pudo deberse a que la existencia de hormonas es fundamental para el desarrollo de las plantas, por lo que los explantes utilizados contenían en forma natural una proporción baja de hormonas que al terminarse y no haber disposición de éstas en el medio de cultivo, se generó la disminución progresiva en la tasa de desarrollo a partir de 44 días después del acondicionamiento *in vitro*. Con respecto a los demás tratamientos y el comportamiento sigmoide que presentaron las plantas con relación a la tasa de desarrollo de segmentos nodales, existe una respuesta entre procesos de división celular generados principalmente por la presencia de citocininas y el alargamiento celular promovido por las auxinas, pues ambas hormonas participan en el control mutuo de su abundancia, como refiere Segura (2000), en virtud que las citocininas incrementan los niveles de auxinas mientras que las auxinas, disminuyen la concentración de citocininas y es así como estas hormonas regulan el ciclo celular, dando lugar a ese posible comportamiento sigmoide que presentaron los diferentes tratamientos en la proliferación y altura de segmentos nodales en condiciones *in vitro*, con diferente proporción auxina/citocinina.

Figura 4. Tasa de desarrollo de altura de vitro-plantas de papa con diferente relación de auxinas/citocininas



Considerando los resultados del aporte de auxinas/citocininas en el crecimiento de vitro-plantas de papa, se puede determinar que no existe justificación para la aplicación de hormonas en el medio de cultivo, pues a pesar que la mayor altura de planta y número de segmentos nodales fueron aquellos tratamientos donde sólo se aplicó auxinas, no se tuvo diferencia significativa con las del tratamiento testigo, donde no hubo un aporte de hormonas en el medio de cultivo.

Volumen de raíz

Al realizar los análisis de varianza correspondientes, se encontró que existe una alta significancia estadística entre tratamientos (Anexo 1.3) y al realizar la comparación de medias, se observa que las plantas tratadas con la misma proporción auxinas/citocininas, fueron estadísticamente diferentes a los demás tratamientos, siendo las que presentaron mayor volumen de la parte subterránea y 3.1 veces mayor que las plantas que presentaron el menor valor en este parámetro (Tabla 7). Con base en estos resultados se establece que son poco consistentes con la expresión de la parte aérea, puesto que en los tratamientos donde se presenta mayor segmentos nodales y altura de los mismos no son los que obtuvieron un mayor volumen de la parte que comprende la raíz y formación de vitro tubérculos, de tal forma el tratamiento que tuvo el menor tamaño y número de segmentos nodales (T4) fue el que presentó un mayor volumen radical y de microtubérculos, mientras que el que mayor segmentos nodales y mayor altura (T2) tuvo el menor peso volumétrico de la parte subterránea, valor igual al del tratamiento con relación 2:1 auxina/citocinina (T5). De acuerdo a este comportamiento se puede determinar que la aplicación de auxinas/citocininas favorece la formación de raíces y/o microtubérculos de *Solanum tuberosum* propagado *in vitro*, siempre y cuando se encuentren en la misma proporción, pues la adición de auxinas en mayor concentración limita dicho crecimiento.

Número de tubérculos

El análisis de varianza de la variable número de tubérculos, indica que existe diferencia estadística entre tratamiento (anexo 1.4), al realizar la comparación de medias, se encontró que las plantas de los tratamientos testigo (T1) y donde se adicionó la misma proporción auxinas/citocininas (T4), fueron estadísticamente iguales y las de mayor número de tubérculos, pero que a su vez tuvieron el mismo comportamiento estadístico que las tratadas solo con auxinas (T2), estas últimas, también fueron estadísticamente iguales a los tratamientos donde solo se aplicó citocininas (T3) o una mayor concentración de auxinas (T5). El comportamiento de las plantas en los diferentes tratamientos de *Solanum tuberosum* L. propagada *in vitro* muestra poca congruencia entre las variables de segmentos nodales, altura de brote y peso volumétrico de la parte subterránea puesto que las plantas del tratamiento con relación 1:1 auxina/citocinina (T4) que fueron las de menor desarrollo aéreo, tuvieron el mayor número de vitro tubérculos, pero igual a aquellas donde no se agregó en forma exógena dichas hormonas (T1); éstas últimas presentaron el mayor número de segmentos nodales y mayor altura y las del tratamiento (Tabla 7). Con base en esto se puede establecer que la aplicación de hormonas en la misma proporción tiene una actuación directa en la formación de tubérculos, aunque no en el crecimiento aéreo de las vitro-plantas; pero el resultado es igual al no aplicar hormonas en el medio de cultivo; de tal forma la adición de auxinas y citocininas, resulta un gasto innecesario en la proliferación de microtubérculos o bien de la formación de segmentos nodales para el re-cultivo *in vitro*.

Por otra parte los tratamientos donde se aplicó citocininas en mayor o menor concentración que las auxinas (T3 y T5) presentaron el menor número de vitro tubérculos, estableciendo la importancia del balance hormonal en la formación de tubérculos de papa bajo la técnica de micropropagación *in vitro*.

5.1. Efecto de la luz en la formación de vitro-tubérculos de *Solanum tuberosum* L.

El Análisis de Varianza para las variables volumen de parte subterránea y número de tubérculos en oscuridad, presentan diferencias altamente significativas (anexo 1.5) y al realizar la comparación de medias entre tratamientos, se encontró que las plantas donde se adicionó solo auxinas, tuvieron el mayor número de vitro-tubérculos y fueron estadísticamente diferentes a todos los tratamientos; mientras que en el tratamiento donde se aplicó una relación 2:1 auxinas:citocininas, presentaron el menor número de vitro-tubérculos, siendo estadísticamente iguales a aquellas plantas donde se aplicó la misma proporción auxinas/citocininas (Tabla 8). De tal forma se puede determinar que el efecto de la aplicación sólo de auxinas (T2) en el medio de cultivo tiene un efecto positivo en la formación de vitrotubérculos, resultado cuatro veces mayor que las plantas que no fueron expuestas a oscuridad y que no presentaron el mejor comportamiento entre tratamiento en condiciones de luz. Además las plantas del tratamiento T2 en oscuridad tuvieron casi el doble de tubérculos que el tratamiento que le precedió y casi tres veces más que el mejor tratamiento expuesto a luz.

Tabla 8. Comparación de medias entre los tratamientos en luz y oscuridad

Tratamiento	Peso volumétrico de parte subterránea (ml)		Número de vitro-tubérculos	
	luz	oscuridad	luz	oscuridad
T1	1.4 b	1.67 b	42-43 a	70-71 b
T2	0.7 c	3.5 a	29-30 ab	127 a
T3	1.0 bc	2.17 b	7-8 b	32-33 c
T4	2.2 a	0.67 c	42-43 a	9-10 cd
T5	0.7 c	0.67 c	8-9 b	1 d

Nota: Letras iguales son estadísticamente similares entre sí, con $\alpha = 0.05$

Por los resultados obtenidos, se determinó que la luz tiene un efecto importante en el desarrollo de los explantes de papa bajo condiciones *in vitro*, pero se ve favorecida la formación de vitrotubérculos cuando se adiciona auxinas, aunque se debe considerar el balance hormonal y la adición de otras hormonas, puesto que la adición de mayor proporción de auxinas con respecto a citocininas o concentraciones iguales de ambas hormonas, resulta desfavorable en condiciones de obscuridad. En cambio la adición de únicamente citocininas (T3), tiene un efecto positivo en la propagación *in vitro* de papa, cuando se coloca en oscuridad, incrementando cuatro veces el número de vitrotubérculos con respecto al mismo tratamiento en condiciones de luz, pero resulta casi cuatro veces menor que las plantas tratadas con solo auxinas y en solo la mitad de vitrotubérculos que el tratamiento testigo en las mismas condiciones de obscuridad. Considerando este comportamiento, se determina que la aplicación de citocininas no es recomendable en la proliferación de tubérculos de papa en condiciones de micropropagación *in vitro*.

VI. CONCLUSIONES

1. El tratamiento donde no se adicionaron hormonas en el medio de cultivo (T1) generó plantas con mayor altura, número de segmentos nodales y número de tubérculos, aunque se presentó el menor peso volumétrico de la planta en condiciones de luz.
2. La aplicación de auxinas/citocininas en igual proporción (T4) presentó los menores valores en las variables número de segmentos nodales y altura de planta, pero tuvo el mejor comportamiento en el volumen de la parte subterránea y en la formación de vitrotubérculos en condiciones de luz.
3. La adición solo de auxinas o de citocininas en el medio de cultivo bajo condiciones de luz, T2 y T3, respectivamente, tienen valores estadísticamente iguales en todas las variables evaluadas por lo que su efecto es indistinto en comparación de las plantas testigo.
4. La aplicación solo de auxinas en el medio de cultivo bajo condiciones de oscuridad (T2) fue tres veces mayor que el mejor tratamiento en condiciones de luz.
5. El someter los explantes de papa en condiciones de oscuridad genera mejor comportamiento en la formación de vitrotubérculos en todos los tratamientos, a excepción de aquellos donde se aplicó en forma exógena ambas hormonas (T4 y T5).
6. Para la formación de segmentos nodales en condiciones *in vitro*, se recomienda que no se adicione hormonas al medio; mientras que para la formación de vitrotubérculos, es necesario la aplicación de auxinas y se coloquen en condiciones de oscuridad durante la fase de desarrollo en la cámara de incubación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E. M., Sánchez J. y Bañon, M. Auxinas. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000) Fundamentos de Fisiología Vegetal Interamericana- McGraw-Hill, Madrid. P.p. 305-326.
- Aragón, C., Carvalho L., González J., Escalona M. y Amancio S. (2009) Distinct patterns of responses in sugarcane plantlets (*Saccharum* spp. hybrid) micropropagated in Jell Medium (JM) and by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). *Acta Horticulturae* 812: 441- 446.
- Arellano G. M. A., Villavicencio G. E. E., García G. S.J. (2010) Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. México, D.F. INIFAP- SAGARPA.
- Cabezas G. M. (2013) Fisiología de la maduración del tubérculo de la papa. Colombia
- Carhuaricra K., Olivera J., Gonzales J., Rodríguez J. (2012) Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Rev. Perú. Biol.* 19(3): 341 - 344
- Castro, I. y Contreras A. (2011) Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Imprenta Austral, Valdivia- Chile. 72 p.
- Centro Internacional de la Papa, (1999) Producción de tubérculos- semillas de papa Manual de Capacitación
- CONPAPA. (2007) Plan Rector Nacional Papa. Sistema Producto Papa. Recuperado de http://www.inforural.com.mx/producto.php?&id_rubrique=174&id_article=9291

CONPAPA. (2009) Panorama de la producción en México. Recuperado de <http://www.conpapa.org.mx/panoramexico.html>

CONPAPA. (2010) Plan Rector Nacional Papa. Sistema Producto Papa. Consultado el 30 de junio de 2014 en: http://www.inforural.com.mx/producto.php?&id_rubrique=174&id_article=9291

CONPAPA. (2011) Plan Anual de Fortalecimiento. Recuperado de <http://conpapa.org.mx/files/pages/0000000007/plan-anual-fortalecimiento-2011.pdf>

CONPAPA. (2012) Ficha técnica del sistema producto papa. Recuperado en <http://conpapa.org.mx/files/pages/0000000018/ficha-tecnica-2012.pdf>

CONPAPA. (2015) Intercambio comercial de papa. Informe Anual 2014. Boletín 001 de la Confederación Nacional de Productores de papa. Recuperado de http://www.conpapa.org.mx/files/pressreleases/2015/BoletinCONPAPA_001_2015.pdf

Coria Gil N. A., Pérez P. A., Sarquís R. J. I., Cantú S. I., González R. H., Gómez M. M. V. (2004) Regeneración de la planta de papa (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* a partir del estolón. Ciencia UANL 7(3): 361- 370.

Corzo C. P. J. (2001) Manejo integrado del cultivo de la papa. Corpoica. 75 p

Diario Oficial de la Federación (DOF). (1996) Norma Oficial Mexicana NOM-012-FITO-1995, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la papa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F.

Diario Oficial de la Federación (DOF). (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-041-FITO-2002, Por la que se establecen los requisitos para la producción de material

propagativo asexual de papa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F.

Flores H. E., Brigham L. A. y Vivanco J. M. (1997) The future of radical biology? Connecting roots, people, and scientists. *In* HE Flores, JP Lynch, D Eissenstat, eds, Radical Biology: Advances and Perspectives on the Function of Plant Roots. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 320–339

Fuentes G. C., Rivera L. J., Sánchez C. C., Cruz M. A., Gutiérrez D. R. y Valdez O. A. (2012) Producción *in vitro* de microtubérculos de papa cv. Alpha. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. México

Guohua, M. (1998) Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 (1): 1-7.

Hernández C., V. (2008) Producción de papa Cultivo que crece a la sombra del TLC. Consultado en <http://empresarios.mundoejecutivo.com.mx/articulos.php>

Hoyos J. L., Perea Román C., Velasco R.J. (2008) Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano dominico hartón (*musa aab simmonds*). *Facultad de ciencias agropecuarias* 6(2): 99- 104

Igarza C. J., Agramonte D., Alvarado Y., M. de Feria, T. Pugh. (2012) Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*. 12(1): 3 – 24.

Jiménez-Terry, F. (2000) Aclimatización de plantas *in vitro* y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivo. Tesis para optar al grado científico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba

- Khurana, S.M.P., J. Minhas S. y S. Pandey K. (2003) The Potato: production and utilization in subtropics. Mehta Publishers, New Delhi, India, 445 p.
- Llorente B. E. (2000) Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Universidad Nacional de la Plata Facultad de ciencias exactas. Tesis de doctorado.
- Marín A., Albarrán J. G., Fuenmayor F., Perdomo D. (2009) Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Venezuela. Revista UDO Agrícola 9 (3): 556- 562
- Mejía M. J. M., González C. S., Mora A. S., Rodríguez-Pérez J. E. (2006) Propagación *in vitro* de papa ratona (*Oxalis tuberosa* Mol.). Revista Chapingo Serie Horticultura 12 (2): 231- 237.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. En: Physiology Plantarum. Vol. 15; p.473-497
- Pacheco T. V. E. (2005) Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de 11 ecotipos de cucúrbitas y cuatro de pasifloras. Tesis de grado. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador.
- Páez, J. (1989) Propagación *in vitro* de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Rev. Fac. Agron. Alcance. U.C.V. Maracay. 38: 131-138.
- Pardo A., Luna F. y Hernández N. (2011) Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. Bioagro 23(3):207-214
- Patrón I. J. C. (2014) Sustratos orgánicos alternativos para la producción de tubérculo-semilla de papa en invernadero. Colegio de Postgraduados

- Penacho, A., Martín L., Cueva R., Sanfelire J. y Alins G. (2002) Cultivo *in vitro*. Escuela técnica superior de ingeniería agrícola de Lleida. Recuperado en: <http://www.etsea2.udl.es/in%20vitro/%20luz>
- Pérez-Alonso, N., de Feria M., Jimenez E., Capote A., Chávez M. y Quiala E. (2001) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en campo. *Biotecnología Vegetal* 1: 17-21.
- Pérez B. J. A. (2010) Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivo de células en suspensión de *Nerium oleander*. Universidad Nacional de Colombia
- Pierik R., L. M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. Netherlands. 344 p.
- Pomar V. G. M. (2002) Tuberización *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol. “OCA” como una alternativa para la producción de tubérculos semillas. Perú. Universidad Nacional mayor de San Marcos
- Quiñones Y., Izquierdo H., Martínez O., Alcántara P., Rodríguez E. (2004) Métodos alternativos para la producción de semilla prebásica de papa (*Solanum tuberosum*, L.). Cuba. *Cultivos Tropicales* 25(2): 23- 27.
- Ranalli P., Bassi F., Ruaro A., Di. Candilo M. y Mandolino A. (1994) Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. *Potato Res.* 37: 383-391.
- Santiago C., M. J. y García J. S. (2001) Economía de la agroindustrialización de la papa en México. *Revista Latinoamericana de la Papa*. Vol. Especial: 21-43.

- Scherwinski P., J.E. y G.R. de Luces F. (2004) Organogénesis de ápices meristemáticos de patata en medios de insolamiento y multiplicación *in vitro*. Horticultura Brasileira 22(2):197-201.
- Segura, J. (2000) Citoquininas. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000) Fundamentos de Fisiología Vegetal Interamericana- McGraw-Hill, Madrid. P.p. 343-360.
- SENASICA, (2012) Análisis de riesgo de plagas para la importación de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) a México.
- SIAP. (2012) Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (Fecha de consulta en línea: 10 de abril de 2014).
- SIAP. (2014) Cierre de la Producción Agrícola de papa. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (Fecha de consulta en línea: 5 de marzo de 2015).
- SNICS. (2012) Existencia de semilla calificada de papa en México. Consultado en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/certificacion/Paginas/PreciosyExistencias.aspx>
- Suttle, J. C y Banowetz G. M. (2000) Changes in cis-zeatin and cis-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiol. Plant.* 109: 68–74.
- Toledo J., Espinoza N. y Golmirzaie A. (1998) Tissue Culture. Management of *in vitro* plantlets in potato seed production. International Potato Center (CIP). Training Manual. Lima, Peru. 46p.
- Uribe M. E., Ulloa J., Delaveau C., Sáez K., Muñoz F., Cartes P. (2012) Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Bot.* 69(1): 105- 112

Velásquez, J. (2006) Producción de tubérculo-semilla de papa en la estación experimental "Santa Catalina" del INIAP y su relación con el sector semillero nacional. En: Memorias del II Congreso ecuatoriano de la papa. Ambato, Ecuador, 17 al 19 de mayo del 2006. 7 p.

Wahby I. (2007) Aproximaciones biotecnológicas tendientes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa L.*): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

ANEXOS

Anexo 1.1. Análisis de Varianza del número de segmentos nodales

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	187.517	187.517	46.879	6.49	0.001
Error	35	252.917	252.917	7.226		
Total	39	440.433				

S = 2.68816 R-cuad. = 42.58% R-cuad.(ajustado) = 36.01%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	8	17.2	A
1	8	16.7	A
3	8	13.9	A B
5	8	13.5	A B
4	8	11.3	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 1.2. Análisis de varianza para altura de planta

Análisis de varianza para Altura de planta, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	33.351	33.351	8.338	4.25	0.007
Error	35	68.648	68.648	1.961		
Total	39	101.999				

S = 1.40049 R-cuad. = 32.70% R-cuad.(ajustado) = 25.01%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	8	8.6	A
1	8	7.7	A B
3	8	6.7	A B
5	8	6.5	B
4	8	6.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 1.3. Análisis de varianza para volumen de la parte subterránea en condiciones de luz

Análisis de varianza para volumen de la parte subterránea (luz), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	7.9000	7.9000	1.9750	15.19	0.000
Error	20	2.6000	2.6000	0.1300		
Total	24	10.5000				

$S = 0.360555$ $R\text{-cuad.} = 75.24\%$ $R\text{-cuad.}(\text{ajustado}) = 70.29\%$

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
4	5	2.2	A
1	5	1.4	B
3	5	1.0	B C
5	5	0.7	C
2	5	0.7	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 1. 4. Análisis de varianza para número de Microtubérculos en condiciones de luz

Análisis de varianza para No. De Microtubérculos (luz), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	6089.8	6089.8	1522.4	5.36	0.004
Error	20	5679.6	5679.6	284.0		
Total	24	11769.4				

S = 16.8517 R-cuad. = 51.74% R-cuad.(ajustado) = 42.09%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	5	42.8	A
4	5	42.6	A
2	5	29.4	A B
5	5	8.6	B
3	5	7.4	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 1. 5. Análisis de varianza para volumen de la parte subterránea y número de microtubérculos en condiciones de oscuridad.

Análisis de varianza para Peso Volumétrico (oscuridad), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	16.7667	16.7667	4.1917	35.93	0.000
Error	10	1.1667	1.1667	0.1167		
Total	14	17.9333				

S = 0.341565 R-cuad. = 93.49% R-cuad.(ajustado) = 90.89%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	3	3.5	A
3	3	2.2	B
1	3	1.7	B
4	3	0.7	C
5	3	0.7	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferente

Análisis de varianza para No. De Microtubérculos (oscuridad), utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	4	32004.4	32004.4	8001.1	88.70	0.000
Error	10	902.0	902.0	90.2		
Total	14	32906.4				

S = 9.49737 R-cuad. = 97.26% R-cuad.(ajustado) = 96.16%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
2	3	127.0	A
1	3	70.7	B
3	3	32.7	C
4	3	9.7	C D
5	3	1.0	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 2. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		100 ml
NH ₄ NO ₃	16,5	
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		10 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0.083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
CoCl ₂ .6H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
Fuente de hierro		10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.00556	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.00746	
Vitaminas		10 ml
Inositol	10	
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Adicionar al medio 3% de sacarosa y 0.7% de agar.