124
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## FACULTAD DE CIENCIAS

Organogénesis in vitro y termoterapia para la obtención de plantas de Solanum tuberosum libres de virus "X"

# T E S I S

Que Para Obtener el Título de

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**Presenta**

**SILVIA MARIN FUENTES**

MEXICO, D. F. 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## CONTENIDO

Página

RESUMEN . . . . . V

INTRODUCCION . . . . . VI

I. REVISION DE LITERATURA . . . . . 1

1 Generalidades de *Solanum tuberosum* . . . . . 1
1.1 Origen. . . . . 1
1.2 Clasificación. . . . . 1
1.3 Importancia nutricional. . . . . 2

2 Virosis en papa. . . . . 2
2.1 Generalidades de virus en papa. . . . . 3
2.2 Virus X de la papa. . . . . 3

3 Cultivo de tejidos en papa. . . . . 4
3.1 Métodos de obtención de plantas libres de virus. . . . . 5

4 Reguladores de crecimiento y diferenciación. . . . . 6
4.1 Reguladores de crecimiento. . . . . 7
4.2 Poliaminas. . . . . 9

5 Acido acetil salicílico. . . . . 10
5.1 Los salicilatos en la inhibición de diversos procesos. . . . . 11
5.2 Los salicilatos y la organogénesis *in vitro*. . . . . 12
5.3 Los salicilatos y la resistencia a patógenos. . . . . 12

II. MATERIALES Y METODOS . . . . . 14

1 Material Biológico. . . . . 14
1.1 Medios de Cultivo. . . . . 14

2 Métodos. . . . . 17
2.1 Preparación de los medios de cultivo. . . . . 17
2.2 Condiciones del cultivo. . . . . 17
2.3 Pruebas serológicas. . . . . 17

3 Descripción de los experimentos. . . . . 18
3.1 Experimento 1 Termoterapia. . . . . 18
3.2 Experimento 2 Organogénesis. . . . . 18

3.3 Experimento 2.A Cultivo de yemas axilares en medio PG incubadas con ASA, previamente subcultivadas en medio G. . . . 20

3.4 Experimento 2.B Cultivo de yemas axilares en medio PG incubadas con ASA, previamente subcultivadas una vez en medio B. . . . . 20

3.5 Experimento 2.C Cultivo de yemas axilares en medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas una vez en medio B en presencia y ausencia de $GA_3$. . . . . 21

3.6 Experimento 2.D Cultivo de yemas axilares en medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B en presencia y ausencia de $GA_3$. . . . . 21

3.7 Experimento 2.E Cultivo de yemas axilares en medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B en ausencia de $GA_3$. . . . . 22

3.8 Experimento 2.F Cultivo de yemas axilares en medio C incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B sin $GA_3$. . . . . 22

III. RESULTADOS . . . . . 24

1 Experimento 1. . . . . 24

2 Experimento 2.A. . . . . 24
2.1 Experimento 2.B. . . . . 29
2.2 Experimento 2.C. . . . . 34
2.3 Experimento 2.D. . . . . 37
2.4 Experimento 2.E. . . . . 41
2.5 Experimento 2.F. . . . . 44

IV. DISCUSION . . . . . 47

V. CONCLUSIONES . . . . . 54

VI. BIBLIOGRAFIA . . . . . 55

VII. APENDICE . . . . . 63

# RESUMEN

Se determinó la relación existente entre la posición del meristemo a lo largo del tallo de la planta de *Solanum tuberosum* y el porcentaje, obtenido de plantas libres del virus "X" de la papa.

Se trabajaron 9 clones prioritarios al Programa de Papa, plantas jóvenes fueron sometidas a la prueba serológica de LATEX para confirmar la presencia de virus X de la papa (PVX). Los materiales se sometieron a termoterapia durante un periodo de 3 a 4 semanas a 35°C, posteriormente se obtuvieron yemas axilares las cuales se enumeraron (de la base al ápice) en niveles de acuerdo a la posición del tallo; dichas yemas se sembraron *in vitro*, posteriormente se les realizó la prueba de ELISA**, obteniéndose plantas negativas en 88.8% de los clones.

En el 55.5% de los genotipos los mayores porcentajes de plantas tendieron a obtenerse en el extremo basal y el 44.4% en el apical, la magnitud de los valores varió en función del clon.

Se trabajó con yemas axilares de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro* en el efecto del ácido acetil salicílico (ASA)***, en la inducción de organogénesis para la obtención de plantas libres de virus X. El experimento constó de 2 Fases: Fase I (FI) se probaron con ASA 3 medios: PG y MSm con concentraciones de $10^{-6}$ y $10^{-5}$ M a una temperatura de 22°C y el medio C con concentraciones $10^{-5}$ y $10^{-4}$ M, a una temperatura de 8°C.

A los 35 días dió inicio la Fase dos (FII) en esta se subcultivaron los explantes a varios medios, con diferentes balances hormonales. En el medio $MSm_5$ de la (FII), se alcanzaron los porcentajes más altos de organogénesis, en explantes provenientes de tratamiento de ASA $10^{-5}$ M. Después de 30 días se analizaron mediante la prueba de ELISA, obteniéndose los mayores porcentajes con reacción negativa en los explantes cultivados en ASA que fueron incubados a una temperatura de 8°C.

Fue posible obtener brotes, ramas y tallos con reacción negativa a PVX, en los tratamientos con y sin ASA, siendo mas importante la presencia de ASA en la obtención de explantes negativos que el fenómeno de organogénesis por sí misma.

** Enzyme-linked immunosorbent assay.
*** Acetyl Salicilic Acid.

# INTRODUCCION

Muchos Cultivos vegetales, particularmente los que son propagados vegetativamente son atacados por virus, los cuales afectan la fisiología de la planta disminuyendo su rendimiento. Para multiplicar la papa se emplean partes vegetativas de la planta, lo cual constituye un método excelente para la deseminación de virus en el material propagado por tal motivo es necesario producir plantas libres de virus, que sean multiplicadas para posteriormente ser usadas como semilla. En México los virus de papa que más afectan el cultivo son: el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV)*, el virus "S" (PVS)** el virus "Y" (PVY)*** y el virus "X" (PVX)**** (López-Delgado *et al.*, 1985) que reducen el rendimiento y la calidad de los tubérculos.

Existen trabajos en los que se han obtenido plantas de papa libres de virus a partir del cultivo *in vitro* de meristemos, procedentes de plantas que han sido sometidas a termoterapia (Mellor y Stace-Smith, 1972; Quak, 1972; López-Delgado *et al.*, 1985); también es posible obtenerlas por la aplicación al medio de cultivo de compuestos químicos antivirales (Dawson, 1984; Pett *et al.*, 1986).

Lograr obtener material libre de virus está basado en el hecho de que no todas las células del tejido estan infectadas (Quak, 1972) y que algunos virus tienen menor tolerancia al calor que el hospedante, estas interacciones hacen posible la busqueda de nuevos métodos para obtener plantas sanas.

Los salicilatos son compuestos fenólicos, usados principalmente en la industria farmacéutica, en algunas plantas se han encontrado en forma de ésteres del ácido salicílico (Collier, 1963; Cleland y Ajami, 1974 en López-Delgado, 1987); además se sabe que pueden intervenir en diferentes aspectos, tales como inhibición de floración, transpiración formación de raíces y crecimiento (López-Delgado, 1987), también se ha encontrado que inducen resistencia a virus del mosaico del tabaco (White, 1979; Van Loon, 1982; Pennazio *et al.*, 1987; Roggero y Pennazio, 1988) *Colletotrichum lagenarium* en pepino (Mills y Wood, 1984).

1987), también se ha encontrado que inducen resistencia a virus del mosaico del tabaco (White, 1979; Van Loon, 1982; Pennazio *et al.*, 1987; Roggero y Pennazio, 1988) *Colletotrichum lagenarium* en pepino (Mills y Wood, 1984).

Con base en lo registrado para termoterapia-Cultivo de meristemo, en la obtención de plantas libres de virus (Lopez-Delgado *et al.*, 1985); y que los salicilatos en plantas, inducen resistencia a virus y hongos, aunado a que el ASA favorece la organogénesis de brotes en *Solanum Cardiophyllum* (López-Delgado, 1987) y en *Solanum Tuberosum* (Mora 1991), en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos.

* Potato leaf roll virus
** Potato virus "S"
*** Potato virus "Y"
**** Potato virus "X"

## OBJETIVOS

1) Determinar si en plantas de *Solanum tuberosum* existe relación entre la posición del meristemo a lo largo del tallo de la planta y el porcentaje de plantas obtenidas con reacción negativa a PVX empleando la técnica de termoterapia-cultivo de meristemo.

2) Probar el efecto del ácido acetil salicílico en la inducción de organogénesis de Brotes *in vitro* y evaluar si es posible obtener plantas de *Solanum tuberosum* con reacción negativa a PVX, a partir de dichos brotes.

## HIPOTESIS

- Si la distribución del virus no es homogénea en las plantas y la técnica de Termoterapia afecta la replicación del virus sin dañar el metabolismo de ésta, entonces deberan existir niveles en la planta libres de virus en los que sea más probable obtener yemas sin virus.

- Si los Salicilatos han inducido resistencia a virosis en algunas especies, entonces la combinación de la inducción de organogénesis de brotes con Salicilatos podría favorecer la obtención de plantas libres de virus.

# I. REVISION DE LITERATURA

## 1 Generalidades de *Solanum tuberosum*

### 1.1 Origen

Aunque el sitio de origen geográfico de la papa es muy discutido, se sabe que es originaria de América (Parsons, 1984; Maldonado, 1982; Cañas; 1901, Hawkes 1945 en Montaldo, 1984). Cañas (1901, en Montaldo 1984) afirma que la papa es nativa de los bosques del sur de Chile, por otra parte Hawkes en 1945 (en Montaldo 1984) discute las teorías sobre el origen de la papa y propone como lugar de origen la región del Cuzco y el Lago Titicaca en Perú; Maldonado (1982) y Parsons (1984) proponen 2 centros uno en México y el otro en la cordillera de los Andes del Perú. Desde el año 500 A.C. la papa se consumía como alimento básico en los Andes por los Incas y nuestros antepasados también consumieron papas silvestres en el Altiplano de México. Las primeras papas, con valor comercial son originarias de las partes más altas de los Andes, de donde fueron llevadas por los conquistadores españoles a Europa en el Siglo XVI, distribuyéndose luego por todo el mundo (Smith, 1977).

La especie *Solanum tuberosum* se cultiva en todo el mundo; existen cerca de 200 especies silvestres en América, las cuales crecen desde el sur de E.U, México, hasta el sur de Chile. El género se encuentra desde el nivel del mar hasta más de 4000 m de altitud (Smith, 1977; Montaldo, 1984).

### 1.2 Clasificación

La papa puede ser clasificada en niveles de ploidía. El juego cromosómico de la papa es de 12 cromosomas (n = 12). Las células somáticas de las especies cultivadas pueden variar entre el nivel diploide y pentaploide.

Según los niveles de ploidia la papa se clasifica de la manera siguiente:

Familia: *Solanacea*
Género: *Solanum*
Subgénero: *Leptostemonum*
Sección: *Tuberarium*
Sub-sección: *Hyperbasarthum*.

Entre las especies cultivadas solamente *Solanum tuberosum* ssp. es cultivada en todo el mundo (Huamán, 1986).

**1.3 Importancia Nutricional**

La papa es un producto alimenticio importante para el hombre, la calidad y cantidad de sustancias constitutivas del tubérculo estan determinadas por la variedad y condiciones de crecimiento. Según el análisis bromatológico de la papa fresca deja ver que la humedad oscila entre 63 y 87%; el contenido de carbohidratos está entre 13 y 30%, regularmente de éstos se presentan sacarosa, glucosa, fructuosa y almidón; el contenido de fibra es de 0.17 al 3.40%; proteína 0.7 a 4.8%; grasa 0.02 al 0.96%; cenizas entre 0.44 y 1.9%; otros constituyentes son el ácido ascórbico, tiamina, piridoxina, sustancias fenólicas, magnesio, hierro, fósforo, potasio y otros (Vázquez, 1981; H. Li, 1985).

**2 Viroels en papa**

Al cultivo de la papa lo afectan diversas enfermedades, entre las más importantes se encuentran las producidas por virus, los cuales reducen el rendimiento y la calidad de los tubérculos. (O'Brien y Rich, 1979; López-Delgado *et al.*, 1985).

Los virus se diseminan de plantas infectadas a sanas por medio de vectores, (insectos, hongos y nematodos) por contacto de plantas enfermas y sanas; o bien mecánicamente por medio de la maquinaria, el hombre y los animales. La infección viral en el tejido de las plantas hospedantes ocasiona cambios de color, desintegración de tejidos, daños al sistema vascular y a zonas meristemáticas,

desarrollo anormal del crecimiento y de los procesos de diferenciación, alteración del balance de clorofila en la hoja y reducción de la capacidad fotosintética de la misma (O'Brien y Rich, 1979; Abello, 1988).

**2.1 Generalidades de virus en papa**

Los componentes básicos de los virus son: ácido ribonucléico (RNA) o ácido desoxirribonucléico (DNA) y proteína. El RNA contiene la información que determina las propiedades de los virus como: infectividad, tamaño y forma de la partícula. La mayoría de los virus que afectan a la papa contienen RNA. En todos los virus la proteína es el componente que se haya en mayor concentración. La forma de la partícula de los virus puede ser alargada o isométrica. (Salazar, 1982; Rich, 1983).

En México, los virus que afectan al cultivo de papa son: el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), el virus "Y" (PVY) y el virus "X" (PVX), otro menos frecuente es el virus "S" (PVS). (López-Delgado *et al.*, 1985).

**2.2 Virus "X" de la papa**

Este virus contiene RNA en partículas elongadas, con una longitud de 515 X 13nm (Salazar 1982).

La mayor parte de las plantas hospedantes son solanáceas y el virus es trasmitido a través de tubérculos infectados por contacto, partes bucales de chapulines y por el hongo *Synchytrium endobioticum* (O'Briend y Rich, 1979; Rich 1983).

En general, este virus es llevado por la mayoría de las variedades de papa sin manifestar síntomas, sin embargo, en algunas puede manifestarse en hojas como un ligero moteado, un mosaico benigno, un mosaico severo con encrespamiento de hojas, o bien una reacción necrótica. El efecto por infección de PVX causa pérdidas en el rendimiento de 10 a 25%, dependiendo del cultivo y de la variante de virus; se sabe que el efecto combinado de virus "X" con otros virus causa pérdidas muy severas en el rendimiento (Rich, 1983).

**3 Cultivo de tejidos en Papa.**

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un periodo breve (Espinosa *et al.*, 1984).

Por sus características fisiológicas y morfológicas la papa es una planta excepcional para estudios de cultivo de tejidos, la propagación en papa consiste básicamente en la inducción al crecimiento y diferenciación de tejidos y órganos de las plantas en un medio artificial y en condiciones de asepsia. Todas las técnicas de cultivo de tejidos usadas en papa , se aplican en diferentes países con el fin de mejorar la cantidad y calidad de la producción del tubérculo.

El cultivo de tejidos de papa tiene como principales aplicaciones en la agricultura:

1) Obtención de plantas libres de virus

El uso de técnicas de cultivo *in vitro* para la erradicación de virus no es una técnica nueva. Los primeros trabajos de cultivo de meristemo para erradicar virus fueron los hechos por Morel y Martin en 1952 (citado en Dodds y Ng, 1987; y H Li, 1985).

El método recomendado por el Centro Internacional de la Papa (CIP) es termoterapia seguida de cultivo de meristemo, el estado fitosanitario se comprueba con la técnica de ELISA (Espinoza *et al.*, 1984)

2) Micropropagación

Es la propagación del material sano por medio de cultivo de microesquejes, estas plantas son enraizadas *in vitro* para posteriormente ser usadas como plantas madre para su propagación en invernadero y campo (Espinoza *et al.*, 1986).

3) Mantenimiento de Banco de germoplasma in vitro

El Banco de germoplasma *in vitro*, permite contar con una fuente de germoplasma, ya que mantiene un nivel satisfactorio de estabilidad genética, para los programas de mejoramiento genético de los cultivos.

Además es una alternativa para mantener material genético de papa libre de virus y de otras enfermedades, y contar con una fuente permanente de materiales sanos (López-Delgado *et al.*, 1985).

4) Herramienta en la investigación para estudios bioquímicos, morfogenéticos, etc. (Espinoza *et al.*, 1986).

**3.1 Métodos de Obtención de Plantas libres de virus**

Los métodos más utilizados, para la erradicación de virus son:

Cultivo de Meristemo

La técnica de cultivo de meristemo consiste en aislar asépticamente, la región meristemática de la yema apical o axial, que mide menos de 0.1mm de largo y consiste de un domo terminal y primordios de hojas. Existen trabajos en los que se ha logrado obtener plantas de papa libres de virus mediante cultivo de meristemos. Sin embargo, la probabilidad de obtener plantas a partir de dicho método es a menudo baja, el éxito de esta depende de la composición del medio, de la naturaleza de los virus presentes y del tamaño del meristemo (Mellor y Stace-Smith, 1972; Wang, 1977; López-Delgado *et al.*, 1985).

Quimioterapia

Consiste en la aplicación de productos químicos al medio de cultivo o directamente al tejido (Dawson, 1984).

Por muchos años han sido de intéres el uso de antivirales para la eliminación de virus. Entre los compuestos estudiados como inhibidores de virus se encuentra: Verde de malaquita (Norris, 1954),

rivarbirin, 2 thiuracilo, 8 azoguanina, Sulfato de Zinc, ácido 2, 4 diclorofenoxiacético, vitavax, plantax (Dawson, 1984), 2-4 dioxohexahidro 1-3-5 triazina, (Bitther *et al.*, 1987), análogos de lisolecitinas, aminoadamantane (Pett, 1986). También se ha encontrado que químicos antivirales de animales pueden ser usados para inhibir virus en plantas (Dawson, 1984). De acuerdo con Quak 1972, la mayoría de las sustancias quimioterápeuticas investigadas, han resultado ser fitotóxicas y las plantas, y estas revierten al estado original de infección cuando el tratamiento cesa.

Termoterapia-Cultivo de Meristemo

El método consiste en tratar la planta o partes de la planta infectada, con temperaturas que van de 30°C a 66°C con agua o aire caliente. En la termoterapia se incrementa la temperatura a un nivel en el cual el meristemo de la planta puede crecer, pero la replicación del virus es inhibida. En papa se utilizan temperaturas superiores a los 40°C (Dodds y Ng 1984: López-Delgado *et al.*, 1985), además el uso de temperaturas fluctuantes (Supra óptimas 40°C-45°C y óptimas 25°C) eliminan virus (Lozoya-Saldaña y Dawson, 1982).

**4 Reguladores de crecimiento y diferenciación**

Un fitoregulador es un compuesto químico capaz de intervenir en el metabolismo de las plantas, que actúa en muy pequeñas concentraciones para activar o deprimir algún proceso del desarrollo, pueden ser sintéticos o naturales (Rojas, 1978; Bidwell, 1979)

Las fitohormonas producen una gran variedad de efectos en la fisiología del vegetal (Bidwell 1979; Haab *et al.*, 1991).

Cada fase del desarrollo y de la diferenciación vegetal es controlado por medio de reguladores del crecimiento. Su posible mecanismo de acción se ha buscado en el genoma; algunas de sus propiedades son reprimir, desreprimir, seleccionar o modificar los diversos procesos del desarrollo contenidos en el genoma de las células vegetales. La respuesta diferencial de una célula a un regulador del crecimiento depende del estado de competencia de ésta, es decir, la hormona por sí sola no controla el patrón de diferenciación, y todas las células no van a responder de igual manera a dicha

hormona, hay una interacción entre las necesidades de la célula y la cantidad y tipo de la hormona presente. Sin embargo, se han reportado algunos casos donde el regulador del crecimiento puede controlar el patrón de diferenciación principalmente la inducción de raíces en cultivo de callos (Smith y Grierson, 1982).

Wareing y Phillips (1982) mencionan que la diferenciación está regulada por algunos genes principales, que a su vez tienen genes subordinados y posiblemente los reguladores del crecimiento estén controlando algunos de estos pasos para disparar la expresión genética. Los mismos autores señalan que hay evidencias de que algunos reguladores del crecimiento se unen a proteínas específicas y por lo tanto, la diferenciación seguirá un patrón predeterminado, una vez que los reguladores del crecimiento se unen a las proteínas. Lo anterior es similar a lo propuesto por Smith y Grierson ya que afirman que existe una unión entre el regulador y un receptor, y un patrón de diferenciación a seguir por las células blanco. Esta diferenciación depende de los receptores específicos para la misma hormona, de tal manera que se forma un complejo regulador receptor y dependiendo de éste será la competencia específica de la célula (Smith y Grierson 1982).

**4.1 Reguladores de Crecimiento**

Los fitoreguladores del crecimiento vegetal, se dividen en 3 grupos principales:
I) Promotores del crecimiento
Auxinas

La principal auxina presente en la naturaleza es el ácido indol acético (AIA), se sintetiza a partir del triptofano, su principal función es el alargamiento celular, se produce principalmente en los ápices en desarrollo, hojas en expansión y tejidos con actividad meristemática (Salisbury, 1978).

La auxina ejerce una acción sobre el crecimiento celular, también aumenta la plasticidad en la pared, actúa, en la síntesis del RNA ribosámico, estimula la división celular en las células de origen cambial (Rojas, 1978; Bidwell, 1979).

Skoog and Miller 1967 (en Coleman y Ernst, 1990) sugieren que en cultivos *in vitro* la interacción de auxina y citocinina desencadena mecanismos de regulación en los eventos de morfogénesis en plantas, y que un elevado coeficiente de auxina/citocinina favorece la aparición de raíces y una relación inversa la formación de yemas.

Citocininas.

Son derivadas de la adenina, se forman principalmente en las raíces de ahí viajan a las hojas y tallos, dentro de sus principales funciones están: la estimulación de la división celular, la prevención de la senescencia, la inducción de floración, además son capaces de inducir fenómenos de diferenciación y en particular de neoformación de órganos (Salisbury, 1978; Rojas, 1978; Bidwell, 1979). Villalobos *et al.*, (1984) trabajó con cultivo de tejidos en pino y aplicó citocinina exógena, la cual indujó formación de primordios.

Skoog *et al.*, 1968 (en Mora, 1991) demostraron que en cultivo de callos de tabaco, el AIA y la citocinina estimulan y determinan la formación de órganos, lo que evidencia la importancia del equilibrio entre las hormonas de crecimiento. (Kikuta y Okasawa, 1984).

Giberelinas

Se sintetizan principalmente en los tejidos aéreos en pleno crecimiento activo (embriones y tejidos meristemáticos). Sus principales funciones son: crecimiento, división celular, inducción de enzimas hidrolíticas, la desrepresión de genes específicos que luego provocan la síntesis de RNA (Bidwell, 1979).

El ácido giberélico induce la formación de brotes *in vitro* en crisantemo (Jeremy, 1985 en López-Delgado 1987) y en discos de tubérculos de papa (Kikuta y Okasawa, 1984), pero es antagonista en la formación de brotes en tabaco (Jeremy, 1985 en López-Delgado, 1987).

ii) Inhibidores del crecimiento

El Acido Abscísico (ABA) es el principal inhibidor del crecimiento y su acción fundamental parece ser la inhibición de las giberelinas y estimular el letargo. El mecanismo de acción del ABA parece tener un efecto sobre la traducción inhibiendo la síntesis de RNA, se emplea en casos muy especiales en cultivo de tejidos vegetales (Bidwell, 1979).

iii) Etileno

Dentro de sus principales funciones está la maduración de frutos y la abscisión de las hojas. Estos efectos parecen deberse a la estimulación de procesos de síntesis requeridas para la formación de la zona de abscisión (Bidwell 1979).

En años recientes, se ha incrementando la evidencia de que la presencia del etileno puede estar asociada a morfogénesis en plantas. Se encontró que la presencia de etileno fue importante para la embriogénesis de *Hordeum vulgaris* y la formación de yemas de flores de *Nicotiana tabacum*, en contraste la regeneración de cultivo de callo de *Heliantrus annuus* y *N. tabacum* fue inhibida por etileno (Chi, 1991).

**4.2 Poliaminas**

Las poliaminas putrescina, espermidina, espermina, tienen efectos importantes en el desarollo de las plantas. Estas aminas estan implicadas en diferentes procesos que implican crecimiento celular, desarrollo (Tiburcio et al., 1987; Kaur-Sawhney *et al.*, 1982; Lilio, 1989), embriogénesis somática, formación de flores y raices adventicias (Geneve y Kester, 1991). Se ha observado el incremento de la biosíntesis de poliaminas durante el crecimiento rápido de muchos sistemas de plantas, tales como, germinación en semillas de maíz, desarrollo de brotes de frijol y embriogénesis de células de zanahoria en suspensión (Kaur-Sawhney *et al.*, 1982)

En estudios *in vitro*, Geneve y Kester (1991) cultivaron explantes de hoja de Datura y observaron un incremento en el nivel de poliaminas particularmente de putrescina, asociada con la formación de raíz.

Tiburcio *et al.*, (1987) trabajando con cultivo de callos de tabaco encontraron que hay una relación entre la concentración de putrescina y la organogénesis de raíz. La respuesta organogenética de células de plantas cultivadas *in vitro* es un evento complejo que involucra cambios estructurales, que anteceden a los eventos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos (Attiodd y Evans, 1991 A).

Se ha postulado que el proceso de morfogénesis *in vitro* requiere de la desdiferenciación celular del explante del tejido y una interacción de las células desdiferenciadas, como respuesta específica a las señales de morfogénesis.

Los procesos de morfogénesis *in vitro* han sido divididos en distintos eventos: competencia, inducción y determinación. La competencia es la capacidad de la célula para responder a un estímulo inductivo; mientras que la inducción es el proceso por el cual el resultado de un estímulo dá un desarrollo único, finalmente la determinación se lleva cabo cuando se continúa el camino de desarrollo en presencia y ausencia de los fitoreguladores (Meins, 1989; Coleman y Ernest, 1990; Attfield y Evans, 1991 B).

La morfogénesis en cultivo de tejidos vegetales, dependerá de un balance entre reguladores del crecimiento exógenos y endógenos además de la procedencia del tejido o callo (López-Delgado, 1987; Kikuta y Okasawa, 1987).

**5 Acido Acetil Salicílico**

Los salicilatos son compuestos usados comúnmente en medicina, como analgésicos y antipiréticos; además se mostró su efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades (artritis, cataratas, diabetes, gota, asma, prevención de infartos del miocardio, angina de pecho, es anticoagulante, antiinflamatorio y antireumático. Los más utilizados en medicina son el salicilato de sodio y el ácido acetil salicílico el cual se conoce comúnmente como aspirina (Barker y Levitan, 1971).

El ácido acetil salicílico (ASA) es un salicilato que se obtiene por acetilación del ácido salicílico (SA), la molécula de ASA tiene un peso molécular de 180.15, un punto de fusión de 137°C y un pK de 3.5 (Collier, 1963; Merck S Co. Inc., 1976, en López-Delgado, 1987).

En las plantas los salicilatos se encuentran en géneros como *Salix*, *Spirea*, *Gautheria* y *Xantium*, en forma de ésteres del ácido salicílico (Collier, 1963; Cleland y Ajami, 1974 en López-Delgado, 1987).

A pesar de que se conoce la presencia de salicilatos en vegetales, se tienen pocos datos del papel fisiológico que desempeñan en éstos. Se han hecho estudios sobre la participación de los salicilatos en diferentes funciones de las plantas tales como:

Inhibición de diversos procesos: floración, transpiración, maduración de frutos, formación de raíces, actividad de enzimas, respiración (Groenewald y Visser, 1974; Larqué-Saavedra, 1972; García y Larqué-Saavedra, 1981; Basu, 1969, 1972; Jain y Srivastava, 1981; Saphiro, 1966; en López-Delgado, 1987), producción de grano (López-Delgado, 1981), organogénesis (Saxena y Rashid, 1980; López-Delgado, 1987; Mora, 1991) y resistencia a patógenos (Mill y Wood, 1984, Métraux *et al.*, 1990, Malamy *et al.*, 1992).

**5.1 Los salicilatos en la inhibición de diversos procesos**

Larqué-Saavedra 1975 (en Mora 1991) reportó que las altas concentraciones de ASA son capaces de inhibir el crecimiento de raíces y coleóptilos. El ASA inhibió en lenteja, el crecimiento de la planta en un rango de concentraciones de $1.4 \times 10^{-4}$ M a $3.6 \times 10^{-4}$ M (Chou y Patrick, 1976; en Mora, 1991).

También el ácido salicílico (SA) aislado de hojas de cacahuate inhibió la elongación de plantas de arroz, así como también el crecimiento de coleóptilos de avena (Kimura *et al.*, 1976).

López-Delgado (1987) obtuvó inhibición en el crecimiento de *Solanum cardiophyllium* cultivado *in vitro* con ASA.

**5.2 Los salicilatos en la organógenesis *"in vitro"***

Lee y Skoog (1965) probaron el SA y otros derivados de los ácidos benzóico, fenilacético y fenil propanóico, en la formación de brotes en callos de tabaco. Encontraron que el SA indujo brotes en concentraciones de 2 a 256 mM, concluyendo que los derivados hidroxibenzóicos, contribuyen a la formación de brotes en presencia de IAA y cinetina.

Saxena y Rashid (1980) obtuvieron diferenciación de yemas en el protonema de musgo *Anoectangium thomsonii*, en presencia de ASA y SA a concentraciones óptimas de $10^{-6}$ M y $10^{-5}$ M respectivamente.

López-Delgado (1987) encontró que el ASA indujó a concentraciones de $10^{-4}$ y $10^{-5}$ M, procesos morfogenéticos en *Solanum cardiophyllum*. Mora (1991) trabajando con *Solanum tuberosum* obtuvo con ASA a una concentración $10^{-5}$ M la formación de brotes en yemas axilares.

**5.3 Los Salicilatos y la Resistencia a patógenos**

Existen trabajos en los que se demostró que los salicilatos (ácido salicílico y ácido acetil salicílico) inducen resistencia a virus y hongos (White, 1979; Malamy *et al.*, 1990).

Van Loo y Antoniw (1982) encontraron que el SA indujó resistencia sistémica al virus del mosaico de tabaco (TMV) en esta especie. La resistencia estuvo asociada a una mayor producción de etileno y de proteínas *de novo*, las cuales estuvieron ausentes en plantas no tratadas con SA. También Mills y Wood (1984) obtuvieron resistencia al hongo *Colletotricum legenarium*, en pepino. Otros trabajos han asociado la inducción de la resistencia contra virus por ASA y SA, con la inducción de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), (Pennazio y Roggero 1987; Van de Rhee *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991; y Malamy *et al.*, 1992). Las proteínas se encuentran en muchas plantas y se piensa que pueden ser inducidas por virus, hongos, bacterias patógenas, medio ambiente y por químicos (Malamy *et al.*, 1992).

Una forma común de resistencia de los vegetales a un patógeno es la respuesta hipersensitiva (HR), la cual se caracteriza por la muerte celular alrededor del punto de infección, lo que restringe la difusión sistémica del patógeno. En adición a la respuesta local, muchas plantas responden a la infección activando defensas en las partes no infectadas de la planta, como resultado, la planta completa se presenta resistente a una segunda infección, esta respuesta es conocida como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), y puede persistir por varias semanas (Malamy *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991).

La HR ocurre en muchas plantas como defensa a la presencia de una variedad de patógenos, la cual es acompañada por cambios moleculares y bioquímicos. (Van de Rhee *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991; Malamy *et al.*, 1992). Asociada con la HR y la SAR, se presenta la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), y se propone que el ácido salicílico y el ácido acetil salicílico pueden inducir la producción de PR (White, 1979; Van Loon y Antoniw, 1982; Hooft Van Huijsduijnen 1986; Pennazio *et al.*, 1987, en Yalpani *et al.*, 1991).

La SAR implica la existencia de una señal, la cual se difunde sistémicamente del sitio de HR al resto de la planta. Gianinazzi *et al.*, 1985 (en Pennazio et al., 1987), propone que un compuesto se sintetiza durante la HR, para estimular la expresión de los genes para la SAR y que ésta, puede ser activada por la administración de sustancias químicas como poliacrilatos y salicilatos. Los siguientes trabajos apoyan lo anterior; KUC 1985 (en Roggero y Pennazio, 1988), sugiere que un "estresante" químico es capaz de activar la expresión de genes de resistencia, y propone a los salicilatos como agentes "estresantes". Van Loon, 1983 (en Malamy *et al.*, 1990) postuló que el ASA puede ser una señal endógena, que dispara la expresión de los genes para activar la síntesis de proteínas PR; Métraux *et al.*, 1990 trabajando con pepino mostró que el ácido salicílico endógeno está relacionado con la inducción de SAR. Existen informes en los que se mostró que en tabaco el ácido salicílico exógeno induce la síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis, y sugieren que la función del ácido salicílico es una señal de traducción (Malamy *et al.*, 1990).

# II MATERIALES Y METODOS

**1 Material Biológico.-**

En el presente trabajo fueron utilizadas plantas de *Solanum tuberosum*, generadas en el proyecto de mejoramiento/genetico del Programa Nacional de Papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Toluca Edo. de México, Clones 676007, 676176, 676214,77-18-213, 77-97-65, 77-5-261, 77-1A-26, 77-103-103, 7-87-110 y 78-7-176 los cuales por sus características agronómicas y de resistencia a enfermeades principalmente a tizón, son prioritarios de limpieza en el Proyecto de Producción de Semilla.

**1.1 Medios de Cultivo**

Los reactivos empleados en la preparación de los medios de cultivo fueron:

Sales inorgánicas y Manitol (Baker), reguladores de crecimiento, vitaminas, agar, ácido acetil salicílico y Carbón activado (Sigma Chemical) y sacarosa (azúcar morena).

Los medios empleados para el cultivo de Meristemo fueron B, F, G y H Cuadro A, propuestos por el Centro Internacional de la Papa (CIP) (Espinoza *et al.*, 1987), los cuales son modificaciones del medio Murashige-Skoog 1962.

Los medios utilizados para la formación de brotes fueron: medio FG modificado para papita güera, (López-Delgado 1987), medio MSm, modificado por el Programa Nacional de papa (López-Delgado y Mora 1989-1990) y Medio C modificado por el CIP para el Banco de Germoplasma. (Espinoza *et al.*, 1987), todos los medios son modificaciones del medio Murashige-Skoog, se describen en el Cuadro B.

**CUADRO A.- MEDIOS PARA CULTIVO DE MERISTEMO Y PROPAGACION**

| CLAVE | MEDIO |
|---|---|
| B | MS* + TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + AC GIBERELICO 0.25 + AC. PANTOTENICO DE Ca 2 + SAC. 3% + AGAR 0.8% |
| F | MS* + TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + AC GIBERELICO 0.40 + BENCIL AMINO PURINA 0.5 + AC. NAFTALECETICO 0.01 + AC. PANTOTENICO DE Ca 2 + SAC 2% + AGAR 0.6% |
| G | MS* + TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + AC. GIBERELICO 0.1 + GLICINA 2 + AC NICOTINICO 0.5 + PIRIDOXINA 0.5 + SACAROSA 2.5% + AGAR 0.6% |
| H | MS* + TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + AC GIBERELICO 25 + AC PANTATÉNICO DE CA 1000 + SACAROSA 3% + AGAR 0.6% |

MS* Sales (Murashige y Skoog 1962) ver apéndice 1

Nota: Las concentraciones estan en partes por millón

## CUADRO B.- MEDIOS PARA INDUCIR ORGANOGENESIS

| CLAVE | MEDIO |
|---|---|
| PG | MS* + TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + IAA 1.0 + BAP 1.0 SAC 3% + AGAR 0.7% + ASA[1] |
| $PG_1$<br>$PG_2$<br>$PG_3$<br>$PG_4$<br>$PG_5$ | PG + $GA_3$ 0.40<br>PG + $GA_3$ 0.80<br>PG + BAP 1.0<br>PG + CARBON ACTIVADO 4000<br>PG + ZEATINA |
| MSm | ELEMENTOS MAYORES MS** + ELEMENTOS MENORES MS** + NaEDTA 37.28 + $FeSO_4$ 27.8 + TIAMINA 0.5 + INOSITOL 100 + IAA 0.3 + KIN 0.3 + SAC 4% + AGAR 0.7% + ASA[1] |
| $MSm_1$<br>$MSm_2$<br>$MSm_3$<br>$MSm_4$<br>$MSm_5$<br>$MSm_6$<br>$MSm_7$<br>$MSm_8$ | MS** + Zca2 + ANA 0.1 AGUA DE COCO 50ML + SAC 3.5% + AGAR 0.7%<br>MS** + Zca 2.5 + ANA 0.1 + BAP 1.0 + PUT 20 + SAC 3.5% + AGAR 0.6%<br>MS** + Zca 2.5 + $GA_3$ 0.40 + BAP 1.0 + PUT 20 + ANA 0.1 + SAC 3.5% + AGAR 0.6%<br>MS** + Zca2.5 + ANA 0.1 + BAP 1.0 + PUT 20 + KIN 1.0 + SAC 3.5% + AGAR 0.6%<br>MS** + Zca 2.5 + ANA 0.1 + BAP 1.0 + PUT 20 + $GA_3$ 0.40 + KIN 1.0 + SAC 3.5% + AGAR 0.6%<br>MS** + Zca 1 + $GA_3$ 0.40 + C. HIDRO 1.0 + CAR. ACTI. 100 + SAC 3% AGAR 0.7%<br>MS** + Zca 1 + C.HIDRO 1.0 ppm + SAC 3% + AGAR 0.7%<br>MS** + Zca 1 + BAP 1.0 + KIN 1.0 + $GA_3$ .40 + C.HIDRO 1.0 + SAC 3% + AGAR 0.7% |
| C | MS* TIAMINA 0.40 + INOSITOL 100 + SAC 0.4% + AGAR 0.6% + ASA[1] |
| C1<br>C2 | MS* + ANA 0.1 + BAP 1.0 + KIN 1 + MANITOL 5000 + Zca 2.5 + SAC. 0.1% + AGAR 0.6%<br>MS* + ANA 0.1 + BAP 1.0 + KIN 1 + MANITOL 5000 + Zca 2.5ppm + SAC. 0.5% + AGAR 0.6% |

ANA = ACIDO NAFTALENACETICO
BAP = BENCIL AMINO PURINA
$GA_3$ = ACIDO GIBERELICO
* = SALES DE MURASHIGE Y SKOOG. VER APENDICE 1
** = SALES DE MEDIO MSm

ZEA = ZEATINA
IAA = ACIDO INDOL ACETICO
KIN = KINETINA
PUT = PUTRECINA
SAC = SACAROSA

C.HIDRO = CASEINA HIDROLIZADA
CAR.ACT = CARBON ACTIVADO
[ ] en ppm.
ASA[1] = ACIDO ACETIL SALICILICO

## 2 Métodos

### 2.1 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

El procedimiento general para la preparación del medio de cultivo se describe a continuación: Partiendo de la solucion madre de Sales Inorgánicas de MS*, vitaminas y reguladores del crecimiento, se mezclaron las cantidades requeridas y se adicionó la sacarosa, el ph se ajustó a 5.7 0.1 con HCl o KOH; posteriormente se adicionó el agar cuya dilución se hizo calentando el medio. La distribución del medio fue de la manera siguiente: en tubos de ensaye de 120 x 23mm, se adicionaron 10 ml de medio, o bien, en tubos de 100 x 16mm 2 ml de medio, tapándolos con papel aluminio. La esterilización del medio se llevó a cabo en un autoclave a 15 lbs de presión y a 120° C durante 15 minutos.

### 2.2 CONDICIONES DE CULTIVO

La incubación de los inóculos para todos los experimentos se llevó a cabo en un cuarto de ambiente controlado con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de obscuridad, una intensidad lumínica de 24 $Mm^{-2}$ $seg^{-1}$ (400-700nm) y una temperatura de 22°C. Excepto para el que se mantuvo en el Banco de Germoplasma *in vitro*.

### 2.3 PRUEBAS SEROLOGICAS

Para confirmar el estado fitosanitario de las plantas se utilizaron las pruebas serológicas LATEX y ELISA (Clark y Adams 1981) para el virus X de papa (PVX) el protocolo de dichas técnicas aparece en el Apéndice 2.

* Apendice 1

## 3 DESCRIPCION DE EXPERIMENTOS

## 3 DESCRIPCION DE EXPERIMENTOS

### 3.1 EXPERIMENTO I

TERMOTERAPIA

Se sembraron los tubérculos en macetas y fueron llevados a invernadero (de acuerdo con la disponibilidad del material). Se trabajaron dos clones por mes, sembrando de 10 a 15 tubérculos de cada clon, una vez emergidas las plantas, se confirmó su estado fitosanitario con la prueba serológica LATEX. Confirmado que las plantas se encontraban infectadas con PVX, éstas plantas pasaron a termoterapia. Tratamiento que consistió en mantenerlas a una temperatura de 35°C a 40°C por un periodo de 3 a 4 semanas según lo permitió la resistencia de la planta al calor; posteriormente se obtuvieron esquejes (con una yema axilar) enumerándolos ascendentemente por niveles de la base (nivel 1) al ápice (nivel 5 o 6 dependiendo del número de nudos presentes en la planta). Se desinfectaron con hipoclorito de Sodio al 0.6%, después se obtuvieron los meristemos con dos o tres primordios de hoja, cultivándose individualmente *in vitro* en los medios B y H. Los meristemos fueron subcultivados cada 10 días. Al alcanzar la planta aproximadamente 8cm de longitud se realizó la prueba de ELISA. Los clones utilizados fueron: 676007, 676176, 676214, 77-1A-26, 77-5-261, 77-18-213, 77-103-103 y 78-7-110 y 78-7-176.

### 3.2 EXPERIMENTO 2

ORGANOGENESIS

Los siguientes experimentos describen el trabajo realizado, para inducción de organogénesis.

Tubérculos jóvenes fueron sumergidos en una solución de ácido giberélico 5mg/l por 10 minutos para inducir brotación, una vez brotados se sembraron a macetas en invernadero, emergidas las plantas se confirmó su estado fitosanitario con la prueba serológica LATEX para PVX, de las que resultaron positivas se obtuvierón yemas axilares, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.6%) y fueron sembradas yemas individuales en los medios H, B y F.

De estas plantas se obtuvieron yemas axilares para propagarlas aproximadamente cada 35 días en los medios B y/o G, para mantener una fuente permanente de material biológico. Estos experimentos se dividieron en dos fases:

Fase uno (FI) cuya duración fué de 35 $\pm$ 1 días, en presencia de salicilato (ASA),
Fase dos (FII) tuvo una duración de 30 $\pm$ 1 días, en ausencia de salicilato.

Para la FI se sembraron esquejes con una yema axilar, en todos los experimentos.

De acuerdo a la disponibilidad del material *in vitro* (ya que no todos los genotipos presentaron el mismo tiempo de desarrollo), los clones fueron agrupados para la FI en 3 rutas:

1.- En presencia 2 auxinas IAA y BAP
2.- En presencia una auxina IAA y una citocinina KIN
3.- En ausencia reguladores de crecimiento.

Las condiciones de incubación fueron las mismas para la ruta uno y dos; no así para la ruta tres, que estuvo bajo condiciones del Banco de Germoplasma *in vitro* fotoperiodo de 16 horas luz, intensidad luminica de 11 $Mm^{-2}$ $Seg^{-1}$ (400-700nm) y temp de 8°C.

Fase II. En las tres rutas los medios variaron tanto en los reguladores de crecimiento como en la concentración de los mismos, las condiciones de incubación fueron las mismas para las tres rutas.

Al final los experimentos fueron evaluados con los parámetros siguientes: peso fresco, longitud del tallo más largo y formación de brotes *de novo*.

Los clones utilizados fueron 676007, 77-1A-26, 77-18-213, 77-97-65, 77-103-103, 78-7-110 y 78-7-176.

**3.3 Experimento 2.A**

**Cultivo de yemas axilares en medio PG incubadas con ASA previamente subcultivadas en medio G**

Fase I.- En medio PG se incubaron yemas axilares con dos diferentes concentraciones de ASA ($10^{-6}$ y $10^{-5}$ M) y su testigo, se llevaron a cabo 25 repeticiones por tratamiento.

Fase II.- Se subcultivaron sin ASA a medio $PG_1$, transcurrido un mes se realizó la evaluación visual del experimento (formación de callo y de brotes *de novo*). El clon utilizado fué el 77-1A-26.

Se realizó una repetición de este experimento con los clones 77-1A-26 y 78-7-176, pero la Fase II tuvo la siguiente variante: FII se subcultivaron sin ASA en los medios siguientes: $PG_1$, $PG_2$, $PG_3$, $PG_4$ y $PG_5$ con cinco explantes por medio, realizando la evaluación visual a los 30 días, con los parámetros antes mencionados.

**3.4 Experimento 2.B**

**Cultivo de yemas axilares en medio PG, incubadas con ASA, previamente subcultivadas en medio B.**

Fase I.- En el medio PG se incubaron yemas axilares a dos diferentes concentraciones de de ASA ($10^{-6}$ y $10^{-5}$ M) y su testigo, con 25 repeticiones por tratamiento.

Fase II.- Se subcultivaron sin ASA, cinco explantes en cada uno de los medios siguientes: $MSm_1$, $MSm_2$, $MSm_3$, $MSm_4$ y $MSm_5$; se evaluaron los parámetros ya mencionados a los 30 días.

Posteriormente, se realizó un muestreo (de ramas y de brotes mayor es de 0.5 cm) para realizar la prueba de ELISA. Los clones utilizados fueron 77-18-213, 77-103-103 y 78-7-110.

### 3.5 Experimento 2.C

**Cultivo de yemas axilares en medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas una vez en medio B en presencia y ausencia del $GA_3$.**

En este experimento se utilizaron explantes que previamente se subcultivaron en medio B (descrito en el Cuadro A) una vez con 0.125ppm de $GA_3$ y en ausencia de éste durante un mes, lo que se llama un subcultivo en medio B (1SB).

Fase I.- En medio MSm se incubaron yemas axilares con dos concentraciones de ASA ($10^{-6}$ y $10^{-5}$M) y su testigo, con 50 repeticiones cada uno. (25 provenientes de medio B con 0.125ppm de $GA_3$ y 25 sin $GA_3$).

Fase II.- Se subcultivaron sin ASA en los medios siguientes: $Msm_1$, $Msm_2$, $Msm_3$, $Msm_4$ y $Msm_5$, cinco explantes por cada medio, 30 días después se realizó la evaluación del experimento con los parámetros ya considerados.

Posteriormente se les realizó la prueba de ELISA a todas las plantas (incluyendo tallos y brotes mayores de 0.5 cm). El clon utilizado fue el 77-97-65.

### 3.6 Experimento 2.D

**Cultivo de yemas axilares en medio Msm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B en presencia y ausencia de $GA_3$.**

En este experimento se utilizaron explantes que previamente fueron subcultivados en medio B con 0.125ppm de $GA_3$ y en ausencia de éste, durante dos meses (2SB).

Fase I.- Fué la misma que el experimento 2.C.

Fase II.- El subcultivo sin ASA se realizó en los medios siguientes: $Msm_4$, $Msm_5$, $Msm_6$, $Msm_7$ y $Msm_8$; se evaluó el experimento para los parámetros ya considerados, posteriormente se realizó la prueba de ELISA a todas las plantas (incluyendo tallos y brotes mayores de 0.5 cm).

Los clones utilizados fueron el 676007, 78-7-110, 77-103-103.

**3.7 Experimento 2.E.**

**Cultivo de yemas axilares en medio Msm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B en ausencia de $GA_3$.**

En este experimento se utilizaron explantes que previamente fueron subcultivados dos veces en medio B en ausencia de $GA_3$

Fase I.- En medio Msm se incubaron yemas axilares con dos concentraciones de ASA ($10^{-6}$ y $10^{-5}$M) y su testigo, con 20 repeticiones cada uno.

Fase II.- Se subcultivaron sin ASA en los medios siguientes:

$Msm_4$, $Msm_5$, $C_1$ y $C_2$ cinco explantes por cada medio.

A los 30 días se hizo la evaluación del experimento con los parámetros anteriormente mencionados. Se realizó la prueba de ELISA a todas las plantas (incluyendo tallos y brotes mayores de 0.5 cm). El clon utilizado fue el 77-97-65.

**3.8 Experimento 2.F**

**Cultivo de yemas axilares en medio C incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en Medio B sin $GA_3$.**

Fase I.- Bajo condiciones de Banco de germoplasma *in vitro* la incubación fue a temperatura de 8°C, en medio C (subtituyendo el manitol por ASA) se incubaron yemas axilares con dos concentraciones de ASA ($10^{-4}$ y $10^{-5}$M) con su testigo, se efectuaron 20 repeticiones por tratamiento.

Fase II.- Se subcultivaron en los medios siguientes $Msm_4$, $Msm_5$, $C_1$ y $C_2$ con cinco explantes por medio (la incubación fue a temperatura de 22°C), 30 días después se evaluaron los parámetros considerados, posteriormente se realizó la prueba de ELISA a todas las plantas (incluyendo tallos y brotes mayores de 0.5 cm). Los clones utilizados fueron el 77-97-65, 77-1A-26 y 77-103-103.

# III RESULTADOS

## 1 EXPERIMENTO

### 1 TERMOTERAPIA

Los datos del **Cuadro 1** muestran que en la prueba de LATEX, todos los clones presentaron reacción positiva a PVX, antes del tratamiento de Termoterapia. Los resultados de la **(fig. 1)** muestran que después del tratamiento de termoterapia cultivo de meristemo los mas altos porcentajes de plantas libres de PVX fueron obtenidas de los extremos del tallo (basal y apical) los cuales corresponden a los niveles uno y seis. La magnitud de dichos valores varió en función del clon **(figura 2)**. De los clones trabajados, en todos los niveles se obtuvieron plantas negativas, a excepción del clon 676007 que presentó reacción positiva a la prueba de ELISA en todos los niveles; además todos los clones presentaron diferentes periodos de resistencia al tratamiento de calor **(Cuadro 2)**.

## 2 EXPERIMENTO

### 2 ORGANOGENESIS 2.A.

**Cultivo de yemas axilares en Medio PG incubadas con ASA, previamente subcultivadas en medio G.**

No se obtuvo organogénesis, los resultados obtenidos no se esperaban, razón por lo cual la evaluación únicamente fue visual; no se presentó formación de callo ni de brotes *de novo* en la FII con ninguna de las concentraciones de ASA ni en los testigos. En *Solanum cardiophyllum*, Lopéz-Delgado (1987), obtuvo organogénesis de brotes con ASA en la FII, empleando el medio PG + $GA_3$ a una concentración 0.40ppm, sin embargo en este clon el mismo medio no indujo el mismo efecto. En la repetición de este experimento con los clones 77-1A-26 y 78-7-176, tampoco se presentó el fenómeno de organogénesis de brotes, pero sí la formación de callo, el medio mas favorable para la formación de callo fue el medio $PG_5$ que contiene 2mg/l de zeatina.

**CUADRO 1.- NUMERO DE TUBERCULOS SEMBRADOS A INVERNADERO Y PORCENTAJE DE PLANTAS DE *S. tuberosum* QUE PRESENTARON REACCION POSITIVA A VIRUS X EN LA PRUEBA DE LATEX ANTES DE SER TRATADAS EN TERMOTERAPIA.**

| Nº CLON | Nº DE TUBERCULOS SEMBRADOS | % DE PLANTAS CON REACCION POSITIVA A PVX |
|---|---|---|
| 1) 676007 | 10 | 100 |
| 2)676176 | 15 | 100 |
| 3)676214 | 15 | 100 |
| 4)77-1A-26 | 15 | 100 |
| 5)77-18-213 | 10 | 100 |
| 6)77-5-261 | 10 | 100 |
| 7)77-103-103 | 10 | 100 |
| 8)78-7-110 | 10 | 100 |
| 9)78-7-176 | 15 | 100 |

**CUADRO 2.- PORCENTAJE Y NO. DE PLANTAS DE *S. tuberosum* CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA DESPUES DEL TRATAMIENTO DE TERMOTERAPIA**

| Nº CLON | Nº DE MERISTEMOS SEMBRADOS | % DE PLANTAS OBTENIDAS LIBRES DE VIRUS | % DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS | DIAS EN TRATAMIENTO DE TERMOTERAPIA |
|---|---|---|---|---|
| 1) 676007 | 22 | 0 | 0 | 25 |
| 2)676176 | 111 | 65 | 100 | 30 |
| 3)676214 | 142 | 98 | 78.5 | 30 |
| 4)77-1A-26 | 109 | 66 | 60.5 | 34 |
| 5)77-18-213 | 24 | 14 | 58.3 | 32 |
| 6)77-5-261 | 48 | 39 | 81.2 | 29 |
| 7)77-103-103 | 18 | 9 | 50 | 32 |
| 8)78-7-110 | 46 | 38 | 82.6 | 22 |
| 9)78-7-176 | 48 | 44 | 93 | 26 |

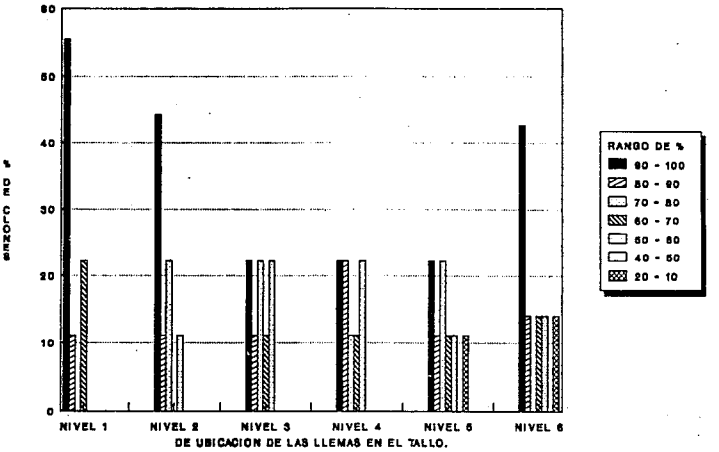



FIG 1 PORCENTAJE DE PLANTAS CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA, OBTENIDAS DESPUES DE TERMOTERAPIA CULTIVO DE MERISTEMO EN 7 CLONES DE PAPA.

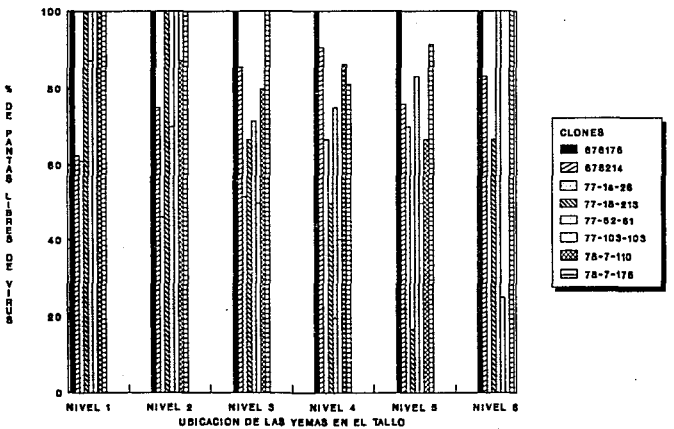



FIG 2 PORCENTAJE DE PLANTAS DE PAPA LIBRES DE VIRUS X, OBTENIDAS DESPUES DE TERMOTERAPIA CULTIVO DE MERISTEMO EN 8 CLONES. A DIFERENTES NIVELES DEL TALLO.

## 2.1 EXPERIMENTO 2.B.

**Cultivo de yemas axilares en Medio PG incubadas con ASA, previamente subcultivadas en Medio B.**

Los resultados muestran que cada uno de los clones tuvo una respuesta diferente a los medios de la Fase II, tanto para el peso fresco, longitud del tallo, y así como para la formación de brotes. **(Cuadros 3, 4 y 5).**

Para los tratamientos con ASA, en el clon 77-18-213 el mayor promedio de peso fresco y de longitud se obtuvo en el medio $MSm_5$ concentración $10^{-6}$M. En el medio $MSm_4$ se presentó el mayor porcentaje de brotación en el testigo (Cuadro 3).

En todos los medios se observó brotación a excepción del medio $MSm_1$; posiblemente el ASA tuvo un efecto inhibidor de organogénesis en los medios $MSm_3$ y $MSm_5$.

El mayor promedio de peso fresco y longitud para los tratamientos con ASA, se obtuvo en el clon 77-103-103 en el medio $MSm_4$ a una concentración $10^{-6}$M (**Cuadro** 4). El mayor promedio de brotes por explante, se presentó en el medio $MSm_2$ concentración $10^{-6}$ M.

Además en los medios $MSm_3$ y $MSm_4$ que correspondían a los testigos, se alcanzaron los mayores porcentajes de brotación, siendo el primero de ellos donde se presentó el mayor numero de brotes por explante.

El **Cuadro 5** muestra que el clon 78-7-110 en el medio $MSm_2$, a una concentración $10^{-5}$ M, es donde se presentó el mayor promedio, tanto de peso fresco como en longitud del tallo. La formación de brotes en el medio $MSm_5$, a una concentración de $10^{-5}$M se obtuvo el mayor porcentaje de brotación de los 3 tratamientos. Los datos de las plantas muestreadas, indican que el clon 77-18-213 resultó positivo y los clones 78-7-110 y 77-103-103 fueron negativos, tanto en los tratamientos como en el testigo **(Cuadro 5.A).**

**CUADRO 3.- PESO FRESCO, LONGITUD DEL TALLO Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO PG EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA F(II) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES CLON 77-18-213**

| | ASA [ $10^{-6}$ ] | | | | ASA [ $10^{-5}$ ] | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| $MSm_1$ | 137.6±19 | 1.9 * | 0 | 0 | 775 * | 3.5 * | 0 | 0 | 213±20 | 2.6±.1 | 0 | 0 |
| $MSm_2$ | 190±59 | 2.1±.26 | 0 | 0 | 417±31 | 1.9±.17 | 20 | 1 | 997±142 | 3±.35 | 20 | 4 |
| $MSm_3$ | 202.2 * | 1.5 * | 0 | 0 | 369.4±104 | 2.8±.10 | 0 | 0 | 443±108 | 4.5±0.35 | 20 | 1 |
| $MSm_4$ | 609±111 | 3.3±.36 | 40 | 1 | 319±145 | 2.6±.21 | 0 | 0 | 387±190 | 2.7±.177 | 20 | 1 |
| $MSm_5$ | 1223±230 | 4.3±.51 | 0 | 0 | 343.1±61 | 3.8±.74 | 0 | 0 | 599.7±128 | 3.8±.44 | 20 | 1 |

NOTA: LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS SU ERROR ESTANDAR, CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO.

* Una repetición debido a que el resto se perdió por contaminación.

**CUADRO 4.- PESO FRESCO, LONGITUD DEL TALLO Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO PG EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA F(II) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES CLON 77-103-103**

| | ASA [ $10^{-6}$ ] | | | | ASA [ $10^{-5}$ ] | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| $MSm_1$ | 1148±307 | 7.3±1.12 | 20 | 1 | 1004±313 | 8.5±1.2 | 20 | 1 | 1241±244 | 15.1±23 | 20 | 2 |
| $MSm_2$ | 839.1±267 | 5.8±20 | 20 | 3 | 710±154 | 9±2.0 | 0 | 0 | 833±149 | 7.6±1.3 | 0 | 0 |
| $MSm_3$ | 815±169 | 6.25±.94 | 20 | 1 | 914.2±127 | 5.5±.283 | 0 | 0 | 1195±141 | 7.4±1.8 | 30 | 3 |
| $MSm_4$ | 1398±432 | 10.8±2.5 | 0 | 0 | 1355±355 | 7.5±2.1 | 0 | 0 | 154.1±508 | 8.2±1.1 | 30 | 1 |
| $MSm_5$ | 847±145 | 9.5±1.7 | 0 | 0 | 358±134 | 5.1±.27 | 30 | 1 | 874±143 | 6.7±1.9 | 0 | 0 |

NOTA: LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS SU ERROR ESTANDAR, DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO.

**CUADRO 5.- PESO FRESCO, LONGITUD DEL TALLO Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO PG EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA F(II) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES CLON 78-7-110.**

| | ASA [ $10^{-6}$] | | | | ASA [ $10^{-5}$ ] | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| $MSm_1$ | 1215±156 | 74±.3 | 0 | 0 | 522±74.3 | 4.4±1.2 | 0 | 0 | 722±504 | 7.4±2.7 | 20 | 3 |
| $MSm_2$ | 1274±289 | 7.1±.89 | 0 | 0 | 1587±229 | 11.5±1.0 | 0 | 0 | 1305±100 | 10±0.65 | 20 | 3 |
| $MSm_3$ | 1307±284 | 7.5±1.0 | 0 | 0 | 173±116 | 3.5±1.0 | 0 | 0 | 240 * | 7 * | 0 | 0 |
| $MSm_4$ | 454±247 | 6.82±.67 | 20 | 3 | 904.5±171 | 3.8±.47 | 20 | 3 | 1083±336 | 7.1±1.2 | 0 | 0 |
| $MSm_5$ | 1413±379 | 5±.70 | 0 | 0 | 460±190 | 3.6±.76 | 40 | 4 | 1215±179 | 10.6±1.7 | 20 | 5 |

NOTA: LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS SU ERROR ESTANDAR, DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

* Una repetición debido a que el resto se perdió por contaminación.

**CUADRO 5.A.- NUMERO Y PORCENTAJE DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA, OBTENIDAS DESPUES DE SER TRATADAS CON ASA**

| NO. CLON | ASA $10^{-6}$ | | ASA $10^{-5}$ | | TESTIGO | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NO. EXP. | % EXP. NEG. | NO. EXP. | % EXP. NEG. | NO. EXP. | % EXP. NEG. |
| 77-18-213 | 5 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 |
| 77-103-103 | 11 | 100 | 4 | 0 | 5 | 0 |
| 78-7-110 | 8 | 100 | 8 | 100 | 8 | 100 |

## 2.2 EXPERIMENTO 2.C.

**Cultivo de yemas axilares en medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas una vez en medio B en presencia y ausencia de $GA_3$**

En los tratamientos con ASA, se observa que en los explantes que fueron subcultivados con 0.125 ppm de $GA_3$ se obtuvieron mayores promedios en peso fresco y longitud, en comparación con los que fueron subcultivados sin $GA_3$. Para brotación, los medios que alcanzaron los promedios más altos fueron el $MSm_1$, y el $MSm_2$ a una concentración de $10^{-6}$M, sin embargo en el medio $MSm_5$ concentración $10^{-5}$M, se obtuvo el mayor número de brotes por explante (**Cuadro 6**). En general, en los testigos, los mayores promedios de peso fresco y longitud, se obtuvieron a partir de explantes que fueron subcultivados sin $GA_3$. En cuanto a la organógenesis de brotes los mayores porcentajes se obtuvieron en los medios $MSm_1$, $Msm_2$ y $MSm_4$.

Con respecto a la obtención de plantas negativas para el PVX, los resultados mostraron que de los 10 tratamientos (cinco provenientes de subcultivos con $GA_3$ y cinco en ausencia de éste) en seis de ellos se observó que empleando ASA, se obtuvo un mayor porcentaje de explantes negativos a PVX con respecto al testigo. Cabe destacar que en sólo en dos tratamientos, se presentaron menores porcentajes de explantes con reacción negativa que el testigo. **(Cuadro 6.A)**

**CUADRO 6.- PESO FRESCO, LONGITUD Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO MSm EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN SIETE DIFERENTES MEDIOS CLON No. 77-97-65**

| | ASA $10^{-6}$ | | | | ASA $10^{-5}$ | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO II | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP BROT | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | |
| MSm1 * | 493.8±71 | 11.2±1.1 | 60 | 2 | 312±3.6 | 5.5+.47 | 20 | 1 | 873.6±91.8 | 10.1±1.5 | 80 | 2.5 |
| ▪ | 504.2±93 | 11±1.7 | 40 | 1.5 | 392±66 | 6.2±1.3 | 60 | 2 | 973±296 | 11.9±.87 | 20 | 3 |
| MSm2 * | 446±43 | 9.6±.93 | 0 | 0 | 293±33 | 8.6±1.5 | 0 | 0 | 834±153 | 9.3±1.41 | 80 | 2.5 |
| ▪ | 483±60 | 11.9±1.4 | 60 | 2 | 441±62 | 11.2±.80 | 40 | 2.5 | 1051±193 | 14.6±1.07 | 60 | 2.6 |
| MSm3 * | 415±19 | 13.5±1.4 | 0 | 0 | 273±67 | 11.7±1.0 | 0 | 0 | 802.5±132 | 13.9±2.1 | 50 | 2 |
| ▪ | 452±59 | 16.2±1.1 | 16 | 1 | 311.6±67 | 12.9±1.2 | 0 | 0 | 870±130 | 16±1.6 | 40 | 1..5 |
| MSm4 * | 262±18 | 7±.47 | 0 | 0 | 285±44 | 7.2±.7 | 0 | 0 | 942±147 | 14±2.3 | 80 | 2 |
| ▪ | 304±37 | 10.4±1.1 | 0 | 0 | 198±14.6 | 6.5±.3 | 0 | 0 | 1158±386 | 15.7±.9 | 40 | 2.5 |
| MSm5 * | 360±71.7 | 11.1±13 | 40 | 3.5 | 220±34 | 79±1.3 | 0 | 0 | 627±81 | 9.2±.43 | 20 | 3 |
| ▪ | 471±51 | 8.2±1.0 | 20 | 3 | 227±29 | 7.0±1.0 | 20 | 1 | 413±49 | 9.5±.77 | 16 | 1 |
| C1 * | 637±52 | 14.6±2.1 | 0 | 0 | 436±58 | 11.2±.6 | 0 | 0 | 655.2±67 | 15.7±1.3 | 0 | 0 |
| C2 * | 705.8±45 | 20.3±1.7 | 0 | 0 | 683±51 | 14.2±1.1 | 0 | 0 | 752.8±159 | 17.8±1.0 | 0 | 0 |

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADOS UNA VEZ SIN $GA_3$.
▪ PREVIAMENTE SUBCULTIVADOS UNA VEZ CON 0.125 ppm DE $GA_3$.

NOTA: LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS SU ERROR ESTANDAR, CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

**CUADRO 6A.- PORCENTAJES DE EXPLANTES CON BROTES *de novo* Y PORCENTAJE DE EXPLANTES CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA, DE *S. tuberosum*, CLON 79-97-65 OBTENIDOS DESPUES DE SER SUBCULTIVADAS *in vitro* EN MEDIO MSm CON ASA POR 35 DIAS (FI) Y SIN ASA (FII) EN SIETE DIFERENTES MEDIOS**

| | ASA $10^{-6}$ | | | ASA $10^{-5}$ | | | TESTIGO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO | %EXP. BROTADOS | $\bar{X}$ BROTES POR EXP. | % EXP. NEGATIVOS | % EXP. BROTADOS | $\bar{X}$ BROTES POR EXP. | % EXP. NEGATIVOS | % EXP. BROTADOS | $\bar{X}$ BROTES POR EXP. | % EXP. NEGATIVOS |
| $MSm_1$ * | 40 | 1.5 | 0 | 60 | 2 | 20 | 20 | 3 | 0 |
| » | 60 | 2 | 0 | 20 | 1 | 20 | 80 | 2.5 | 60 |
| $MSm_2$ * | 60 | 2 | 20 | 40 | 2.5 | 0 | 60 | 2.6 | 0 |
| » | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 80 | 2.5 | 20 |
| $MSm_3$ * | 16.1 | 1 | 40 | 0 | 0 | 20 | 40 | 1.5 | 0 |
| » | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 0 | 50 | 2 | 33-2 |
| $MSm_4$ * | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 40 | 2.5 | – |
| » | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 80 | 2 | 20 |
| $MSm_5$ * | 20 | 3 | 40 | 20 | 1 | 0 | 16 | 1 | 60 |
| » | 40 | 3.5 | 20 | 0 | 0 | 20 | 20 | 3 | 0 |
| $C_1$ » | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $C_2$ » | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

NOTA LOS DATOS SON DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS UNA VEZ SIN $GA_3$
» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS UNA VEZ CON 0.125 ppm DE $GA_3$

**2.3 EXPERIMENTO 2.D.**

**Cultivo de yemas axilares en Medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en medio B en presencia y ausencia de $GA_3$.**

Los resultados de los clones 676007 y 78-7-110 muestran, que en los tratamientos con y sin ASA los explantes subcultivados en ausencia de $GA_3$, presentaron los mayores porcentajes de peso fresco y longitud, en comparación con los subcultivados en presencia de $GA_3$. (Cuadros 7 y 8). El clon 676007 no presentó organogénesis de brotes con ningún tratamiento ni el testigo. Para el clon 78-7-110 el medio que mostró el porcentaje más alto de brotación fué en el $MSm_5$ a una concentración de $10^{-6}$. En la mayoría de los resultados del clon 77-103-103, indican que los explantes subcultivados con 0.125 ppm de $GA_3$ presentaron los mayores promedios de peso fresco y longitud; por otra parte, la formación de brotes no se observó en ninguno de los tratamientos con ASA, sólo en el testigo. (Cuadro 9)

Los resultados para PVX por ELISA son los siguientes:

Con el clon 676007 no se obtuvo un porcentaje de explantes negativos, en ninguno de los tres tratamientos.

Los clones 77-103-103 y 78-7-110, presentaron el 100% de explantes negativos en los 3 tratamientos.

**CUADRO 7.- PESO FRESCO, LONGITUD Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO MSm EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (F1) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES. CLON No. 676007**

| | ASA $10^{-6}$ | | | | ASA $10^{-5}$ | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| MSm4 * | 487±38 | 22.1±2.8 | 0 | 0 | 224±72 | 7.3±0.6 | 0 | 0 | 526±99 | 12.9±2.5 | 0 | 0 |
| » | 412±125 | 19.2±3.1 | 0 | 0 | 146±17.1 | 5.3±.48 | 0 | 0 | 374±75 | 15±3.7 | 0 | 0 |
| MSm5 * | 389.4± – | 20.2± – | 0 | 0 | 98.7±9.6 | 5.4±0.6 | 0 | 0 | 442±25 | 17.7±.7 | 0 | 0 |
| » | 421+126 | 19.1±3.5 | 0 | 0 | 149±29 | 6.9±1.1 | 0 | 0 | 387±133 | 16.6±3.9 | 0 | 0 |
| MSm6 * | 497±147 | 19.8±5.2 | 0 | 0 | 164.8±22 | 7±1.1 | 0 | 0 | 513±65 | 20±1.3 | 0 | 0 |
| » | 463±93 | 23±4.2 | 0 | 0 | 224±11.8 | 11.22±1.1 | 0 | 0 | 484±53 | 19±2.9 | 0 | 0 |
| MSm7 * | 484±102 | 19.8±3.8 | 0 | 0 | 125±24 | 6.6±.7 | 0 | 0 | 513±59 | 17.1±1.1 | 0 | 0 |
| » | 407±61 | 19.5±2.6 | 0 | 0 | 80±5.3 | 6.6±.9 | 0 | 0 | 557±181 | 17.9±2.3 | 0 | 0 |
| MSm8 * | 503±70 | 20±2.7 | 0 | 0 | 137±24 | 6.7±0.8 | 0 | 0 | 512±83 | 14.5±2.2 | 0 | 0 |
| » | 319±44 | 19.7±1.7 | 0 | 0 | 173±9.5 | 8±.8 | 0 | 0 | 456±100 | 19.8±2.8 | 0 | 0 |

NOTA. LOS DATOS SON DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO, SON PROMEDIO MAS, MENOS ERROR ESTANDAR

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B SIN $GA_3$
» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B CON 0.125ppm DE $GA_3$

**CUADRO 8.- PESO FRESCO, LONGITUD Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO MSm EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN SIETE MEDIOS DIFERENTES CLON 78-7-110**

| | ASA $10^{-6}$ | | | | ASA $10^{-5}$ | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| * MSm4 » | 813±110 | 20±3.1 | 20 | 3 | 425±83 | 14.5±1.4 | 0 | 0 | 1129±187 | 17.2±1.3 | 20 | 5 |
| | 554±14 | 19±.82 | 0 | 0 | 473±64 | 13±2.2 | 0 | 0 | 829±162 | 20±3.4 | 0 | 0 |
| * MSm5 » | 724±37 | 23±.9 | 0 | 0 | 741±204 | 10.9±3 | 40 | 25 | 834±48 | 20.4±1.5 | 0 | 0 |
| | 688.6±112.5 | 16.1±2.1 | 0 | 0 | 407.2±74 | 13.6±2.7 | 20 | 2 | 726±147 | 158±2.8 | 0 | 0 |
| * MSm6 » | 445.6±70.2 | 21.4±1.1 | 0 | 0 | 362±56 | 22.5±1.5 | 20 | 2 | 725.6±101 | 23.1±1.4 | 0 | 0 |
| | 359±64 | 18.8±0.52 | 0 | 0 | 343.4±48.5 | 19.4±.73 | 20 | 1 | 552.4±140 | 25.2±2.2 | 0 | 0 |
| * MSm7 » | 510.4±42.1 | 20.5±1.0 | 0 | 0 | 339.2±80.4 | 17.6±1.6 | 0 | 0 | 546±69 | 20.6±1.1 | 0 | 0 |
| | 475.2±48 | 20.8±1.0 | 0 | 0 | 289.7±32 | 17.2±1.1 | 0 | 0 | 636±96 | 20.5±1.3 | 0 | 0 |
| * MSm8 » | 427±82 | 16.1±2.9 | 0 | 0 | 294.5±54 | 13.3±1.9 | 0 | 0 | 655.5±109 | 14.5±2.3 | 0 | 0 |
| | 560±40 | 18.4±2.1 | 0 | 0 | 287.6±55 | 12.3±2.2 | 0 | 0 | 4848±75 | 15±3.0 | | |
| $C_1$ * | 724±127 | 13.4±30 | 0 | 0 | 519±32 | 14.3±.96 | 0 | 0 | 1302±78 | 18.8±1.7 | 0 | 0 |
| $C_2$ * | 943±38 | 19.4±.52 | 0 | 0 | 974±82 | 15.5±0.5 | 0 | 0 | 1114±40 | 18.8±.39 | 0 | 0 |

NOTA. LOS RESULTADOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS ERROR ESTANDAR, CINCO REPETICIONES POR TRATAMIETO.

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B SIN $GA_3$

» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B CON 0.125ppm DE $GA_3$

**CUADRO 9.- PESO FRESCO, LONGITUD Y BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro*, EN MEDIO MSm EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES CLON No. 77-103-103**

| | ASA $10^{-6}$ | | | | ASA $10^{-5}$ | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| MSm4 * | 472±54 | 13.5±2.2 | 0 | 0 | 433±64 | 16±1.6 | 0 | 0 | 477±24 | 14.1±2.6 | 0 | 0 |
| » | 680±111 | 17±1.13 | 0 | 0 | 355±86 | 8.9±1.2 | 0 | 0 | 655±125 | 15±2.4 | 23 | 3 |
| MSm5 * | 543.2±62 | 17.7±1.1 | 0 | 0 | 277.8±33 | 16±1.3 | 0 | 0 | 572±66 | 20.2±1.6 | 40 | 3 |
| » | 694±54 | 15±1.6 | 0 | 0 | 890±125 | 17.6±.7 | 0 | 0 | 906±149 | 13.5±1.7 | 0 | 0 |
| MSm6 * | 426±67 | 16.1±0.9 | 0 | 0 | 340±39 | 16.3±.5 | 0 | 0 | 599.6±131 | 13.5±.56 | 20 | 5 |
| » | 924±148 | 17.1±1.3 | 0 | 0 | 467±93 | 9.8±1.6 | 0 | 0 | 712±111 | 15.4±1.08 | 0 | 0 |

NOTA. LOS DATOS SON DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO, SON PROMEDIO MAS, MENOS ERROR ESTANDAR

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B SIN $GA_3$
» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES EN MEDIO B CON 0.125ppm DE $GA_3$

## 2.4 EXPERIMENTO 2.E.

**Cultivo de yemas axilares en Medio MSm incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en Medio B en ausencia de $GA_3$.**

La mayoría de los resultados revelan que al subcultivar los explantes dos veces en ausencia de $GA_3$, se obtienen promedios similares de peso fresco y longitud del tallo, esto en relación a los explantes subcultivados una vez. (Cuadros 10).

El promedio más alto para peso y para longitud, se obtuvo en el medio $MSm_4$ a una concentración de $10^{-6}$M, también fue este medio el que mostró una mejor respuesta a la organogénesis de brotes, en la concentración $10^{-5}$M.

En la obtención de explantes libres de PVX, los datos mostraron que en los tratamientos con y sin ASA, se alcanzaron porcentajes similares de explantes negativos. También se observó, que la presencia de ASA fue más importante que la organogénesis para la obtención de explantes negativos por ejemplo en el **Cuadro 10.A** se muestra que en el Medio $C_2$, aunque no se presentó la organogénesis en la concentración $10^{-5}$M ni en el testigo, el porcentaje de explantes negativos fue mayor en el tratado con ASA, y en el mismo medio en la concentración $10^{-6}$M, donde sí se presentó organogénesis y superó a los anteriores, en porcentaje de explantes negativos.

**CUADRO 10.- PESO FRESCO, LONGITUD DE BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO MSm EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN CUATRO MEDIOS DIFERENTES CLON No. 77-97-65**

| | ASA $10^{-6}$ | | | | ASA $10^{-5}$ | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| MSm4 » | 981.8±150 | 12±1.6 | 0 | 0 | 166.4±32 | 4.3±.6 | 40 | 2.5 | 672±200 | 6.2±2.2 | 0 | 0 |
| MSm5 » | 750±201 | 6.7±1.3 | 0 | 0 | 746±93 | 9.8±1.1 | 0 | 0 | 502±131 | 7.7±.2 | 20 | 4 |
| $C_1$ » | 413±108 | 11.9±2.8 | 0 | 0 | 303±85 | 10.2±2.5 | 0 | 0 | 468±105 | 9.3±1.2 | 40 | 2 |
| $C_2$ » | 625±92 | 10.5±25 | 25 | 2 | 307±70 | 7.6±1.4 | 0 | 0 | 382±118 | 9.6±1.6 | 0 | 0 |

NOTA. LOS DATOS SON EL PROMEDIO MAS, MENOS ERROR ESTANDAR, CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES SIN $GA_3$.

**CUADRO 10A.- PORCENTAJE DE EXPLANTES CON BROTES *de novo* Y PORCENTAJE DE EXPLANTES CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA, DE *S. tuberosum* CLON 77-97-65 OBTENIDAS DESPUES DE SER SUBCULTIVADAS *in vitro* EN MEDIO MSm CON ASA POR 35 DIAS (FI) Y SIN ASA (FII) EN CUATRO MEDIOS DIFERENTES.**

| | ASA $10^{-6}$ | | | ASA $10^{-5}$ | | | TESTIGO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MEDIO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | % EXP. NEGATIVO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | % EXP. NEGATIVO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT EXP. | % EXP. NEGATIVO |
| $MSm_4$ » | 0 | 0 | 50 | 40 | 2.5 | 60 | 0 | 0 | 50 |
| $MSm_5$ » | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 4 | 50 |
| $C_1$ » | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 40 | 2 | 25 |
| $C_2$ » | 25 | 2 | 50 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 25 |

NOTA. LOS DATOS SON CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES SIN $GA_3$.

**2.5 EXPERIMENTO 2.F.**

**Cultivo de yemas axilares en Medio C incubadas con ASA, previamente subcultivadas dos veces en Medio B sin $GA_3$.**

Puede observarse (**Cuadro 11**) que en los tres clones, en los tratamientos con ASA $10^{-4}$ y $10^{-5}$ M, se presentó una tendencia hacia un promedio menor de peso fresco y longitud, en comparación con sus respectivos testigos. De los tres clones el único que presentó el fenómeno de organogénesis fue el clon 77-1A-26. La brotación pudo observarse en el medio $MSm_5$ con y sin ASA; además, en la concentración $10^{-5}$M se presentó el mayor número de brotes por explante.

Las condiciones de baja temperatura y la concentración de ASA, no favorecieron la organogénesis; ya que, el clon 77-97-65 bajo condiciones de temperatura a 22°C, sí presentó este fenómeno. Los datos **Cuadro 11.A** demuestra que el mayor porcentaje de explantes negativos, se obtuvo en la concentración $10^{-4}$M de ASA; ya que, se alcanzó un 75% de explantes con reacción negativa a PVX, siendo este porcentaje el más alto obtenido en todos los tratamientos con y sin salicilato.

**CUADRO 11.- PESO FRESCO, LONGITUD DE BROTES *de novo* DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* INCUBADAS *in vitro* EN MEDIO C EN PRESENCIA DE ASA DURANTE 35 DIAS (FI) Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) EN CUATRO MEDIOS DIFERENTES CLONES. 77-1A-26, 77-97-65 Y 77-103-103**

| | | ASA $10^{-4}$ | | | | ASA 10-5 | | | | TESTIGO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CLON No. | MEDIO FII | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | $\bar{X}$ PESO | $\bar{X}$ LONG. | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. |
| 77-97-65 | MSm4 » | 232.4±33 | 2.9±.38 | 0 | 0 | 430.2±45 | 5.7±.59 | 0 | 0 | 697±126 | 10.5±.77 | 0 | 0 |
| | MSm5 » | 794.6±297 | 6.7±.93 | 0 | 2.5 | 1247±170 | 7.6±1.5 | 0 | 0 | 1427±111 | 11±1.0 | 0 | 0 |
| | $C_1$ » | 113.2±16 | 2.6±.32 | 0 | 0 | 208±28 | 5.8±1.0 | 0 | 0 | 411.4±30 | 9.4±.6 | 0 | 0 |
| | $C_2$ » | 121.6±12 | 2.1±.29 | 0 | 0 | 297±55 | 7.2±.59 | 0 | 0 | 478.8±42 | 309±.73 | 0 | 0 |
| 77-1A-26 | MSm4 » | 114.2±19 | 3.8±.22 | 0 | 0 | 274±31 | 14.2±2.8 | 0 | 0 | 218.8±31 | 8.4±2.1 | 0 | 0 |
| | MSm5 » | 248.5±53 | 9.6±1.5 | 40 | 25 | 350.8±58 | 15±1.9 | 40 | 4 | 639±182 | 14.5±1.5 | 20 | 4 |
| | $C_1$ » | 48.8±6.4 | 11.6±7.4 | 0 | 0 | 117±18 | 8±.99 | 0 | 0 | 272±22 | 9.6±2 | 0 | 0 |
| | $C_2$ » | 81±19 | 2.8±.36 | 0 | 0 | 202±19 | 10±1.9 | 0 | 0 | 456±95 | 10.1±1.9 | 0 | 0 |
| 77-103-103 | MSm4 » | 165±35 | 4.8±.6 | 0 | 0 | 215.8±22 | 11.8±1.5 | 0 | 0 | 310±71 | 10.1±2.4 | 0 | 0 |
| | MSm5 » | 152±48 | 8.1±1.2 | 0 | 0 | 376±43 | 14.7±.8 | 0 | 0 | 544±112 | 16.1±.83 | 0 | 0 |

NOTA. SON EL PROMEDIO MAS, MENOS SU ERROR ESTANDAR, CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO

» PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES SIN $GA_3$.

CUADRO 11A.- PORCENTAJE DE EXPLANTES CON BROTES *de novo* Y PORCENTAJE DE EXPLANTES CON REACCION NEGATIVA A *PVX* EN LA PRUEBA DE ELISA, DE *S. tuberosum*, OBTENIDAS DESPUES DE SER SUBCULTIVADAS *in vitro* EN MEDIO C CON ASA POR 35 DIAS (FI) Y SIN ASA (FII) EN CINCO MEDIOS DIFERENTES . CLONES 77-97-65 Y 77-1A-26.

| | | ASA $10^{-4}$ | | | ASA $10^{-5}$ | | | TESTIGO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| No. CLON | MEDIO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | % EXP. NEGATIVO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT. EXP. | % EXP. NEGATIVO | % EXP. BROT. | $\bar{X}$ BROT EXP. | % EXP. NEGATIVO |
| 77-97-65 | $MSm_4$ * | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | $MSm_5$ * | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | $C_1$ * | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| | $C_2$ * | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| 77-1A-26 | $MSm_4$ * | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 60 |
| | $MSm_5$ * | 40 | 2.5 | 75 | 40 | 4 | 40 | 20 | 4 | 60 |
| | $C_1$ * | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| | $C_2$ * | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 20 | 5 | 25 |

NOTA. LOS DATOS SON DE CINCO REPETICIONES POR TRATAMIENTO.

* PREVIAMENTE SUBCULTIVADAS DOS VECES SIN $GA_3$.

# IV DISCUSION

Los resultados obtenidos, en la presente investigación tanto en los experimentos de termoterapia como en los de organogénesis, corroboran las hipótesis planteadas, las cuales señalan que es posible obtener en estos clones de *Solanum tuberosum* plantas libres de virus "X" por termoterapia, y por organogénesis inducida con salicilatos.

Los resultados de termoterapia mostraron que el 55.5% de los clones, el mayor porcentaje de plantas libres de virus se presentó en el nivel uno (corresponde a la parte basal) y en el 44.4% en el nivel seis (que pertenece a la parte apical de la planta). Esto se explica con base en lo mencionado por Norris (1954) y Mac Donald (1973), quienes declaran que la distribución del virus en la planta no es homogénea, y que la concentración del virus disminuye invariablemente con el crecimiento de la planta, de ahí que no esten presentes en los centros de crecimiento. Por lo tanto, la cantidad del virus es menor en la región apical y esto explica lo sucedido en dicha región (nivel seis). Aunque Kassanis (1967) y Applano y Lennazio (1972) han detectado por microscopía electrónica la presencia de partículas virales en zonas meristemáticas (en Mellor 1972), nuestros resultados se apoyan en lo propuesto por Norris y Mc Donald. Usando plantas de tabaco infectadas con virus del mosaico del tabaco, Quak (1972) demostró que la concentración del virus es heterogénea en la planta, además observó que la cantidad del virus disminuye en hojas jóvenes, incrementándose en hojas maduras, decreciendo nuevamente en hojas viejas, lo que fundamenta la explicación del porque en la parte basal de la planta (nivel uno), se encontró un alto porcentaje de plantas libres de virus, ya que es el tejido más longevo de la planta.

La magnitud de los resultados varió en función del clon, como lo muestra la figura 2; pero la tendencia se mantuvo en el 66% de los genotipos trabajados.

Además, se observó que cada clon presentó diferente grado de resistencia al calor en el tratamiento de termoterapia (**Cuadro 2**); ya que algunos genotipos resistieron únicamente 22 días, mientras otros, soportaron el tratamiento hasta 34 días. Esto se relaciona con lo postulado por Quak 1964 (en Mac Donald 1973), quien menciona que la respuesta al tratamiento de calor está relacionada con las características varietales y la condición de la planta. En este trabajo se observó ya que el estado senecente o turgente de los tubérculos (que fueron sembrados en invernadero, para obtener las plantas que serían tratadas con calor) fue un factor muy importante, porque si los tubérculos estaban senecentes las plantas crecían muy delgadas y débiles, por lo tanto, poco resistentes al calor y aún cuando las plantas lograban sobrevivir sus meristemos eran poco viables, por lo que minimizaban la posibilidad de obtener plantas libres de virus. Sin embargo, las plantas que provenían de tubérculos turgentes, originaban plantas resistentes al tratamiento de termoterapia, como sucedió en los clones 676176, 676214 y 77-1A-26.

Otro factor que es determinante para el éxito en la limpieza del material, es el tamaño del explante que se siembra. Kassanis y Verman (1967) encontraron que al sembrar meristemo de papa de 0.1mm de longitud sin primordios de hoja, se obtenían menos meristemos viables; con dos primordios de hoja la viabilidad aumentaba, pero disminuía el porcentaje de plantas libres de virus. En este trabajo se pudo observar que no es necesario aislar el meristemo, sino que es posible obtener plantas con reacción negativa a PVX mediante la disección de yemas con dos ó tres primordios de hojas, obteniendo así un buen número de plantas sin virus "X".

Los resultados de organogénesis indicaron que cada clon presentó diferente respuesta morfogenética, aún cuando no se logró una brotación de 100% como la obtenida en un clon de *Solanum tuberosum* por Mora (1991). Cabe mencionar que el presente trabajo se realizó con seis genotipos y la respuesta no fué uniforme en cada uno de ellos.

La morfogénesis en cultivo de tejidos vegetales depende tanto del balance de los reguladores de crecimiento exógenos y endógenos como de la procedencia del tejido o callo (López-Delgado 1987; Kikuta y Okasawa 1989). Con base en ello, se explica el porque en esta investigación los clones

trabajados no presentaron la misma respuesta organogenética; un ejemplo de ésto, radica en el experimento 2.A, en el cual no hubo brotación empleando el medio PG + $GA_3$ 0.40ppm en Fase II. López-Delgado (1987) trabajando con "papita güera", obtuvo organogénesis de brotes con ASA, empleando en la F II el mismo medio; un factor importante en este experimento fue la etapa de establecimiento *in vitro*, que requirió de subcultivos en diferentes medios con altas concentraciones de $GA_3$ (de 0.25ppm a 25ppm), lo que posiblemente alteró los reguladores internos de la planta y por lo tanto, la capacidad de respuesta morfogenética. Otro factor que pudo intervenir posiblemente, fue el fenómeno conocido como habituación Gautheret 1942 (en Meins 1989), trabajando con cultivo de zanahoria, observó que ésta gradualmente requiere menos auxinas y citoquininas exógenas y en algunos casos también vitaminas. Ya que, después de cierto tiempo, el cultivo es capaz de satisfacer su propios requerimientos, lo que se conoce como habituación a los reguladores de crecimiento, pudiendo haberse presentado habituación al ácido giberélico; ya que los medios (H, G y B) en los que previamente se desarrollaron las plantas son ricos en este regulador. Se tienen informes de que el $GA_3$ induce la formación de brotes en papa (López-Delgado 1987, Mora 1991). Pero también existen trabajos en los cuales se encontró que las giberelinas inhiben la diferenciación de yemas en tabaco (Jeremy en López-Delgado 1987; Thorpe y Murashige 1970 en Bhojwani y Razdan 1983), pudiendo suceder lo segundo en este experimento. Se buscó romper la "posible habituación" con otros balances hormonales en la F II, incluso con carbon activado, ya que éste es un captador de fenoles y el $GA_3$ pertenece a este grupo, con lo que se favoreció el crecimiento y el vigor de la planta, afectados previamente por el ASA, sin embargo, no se presentó la respuesta morfogénetica.

En los experimentos 2.B al 2F, tanto en la F I como en la F II se probaron varios medios con diferentes balances hormonales, además en la FII de variar los balances hormonales, se utilizaron sustancias como: caseína hidrolizada, la cual según Bhojwani y Razdan (1983) promueve la formación de yemas; putrescina que interviene en el desarrollo de las plantas (Tiburcio *et al.*, 1987; Lillo 1989 Genove y Kester 1991) y manitol que favorece la formación de brotes en tubérculos de papa (Lillo 1989). Siendo los medios $MSm_4$ y $MSm_5$ que contenían putrescina en los que se manifestó la mejor respuesta organogenética (Apéndice 4).

Como ya se ha expuesto, en el cultivo de tejidos vegetales, la morfogénesis depende de el balance hormonal, además de la procedencia del tejido (López-Delgado 1987), por lo que al no encontrar la respuesta esperada se decidió subcultivar por un mes las plantas (experimento 2.C) en um medio carente o con una mínima concentración de $GA_3$, y los experimento 2.D, 2.E y 2.F por 2 meses, observándose únicamente, que en la longitud del tallo y el peso, se vió el efecto del $GA_3$.

En el experimento 2.F se subcultivaron los explantes sin $GA_3$ por dos meses y se incubaron en condiciones de Banco de Germoplasma, observándose que la baja temperatura (6°C) inhibió la formación de brotes (Cuadro 7). Esto fué evidente en el clon 77-97-65 el cual bajo condiciones de incubación a temperatura de 22°C y utilizando los mismos medios ($MSm_4$, $MSm_5$ si presentó brotación). Además de los factores anteriormente enunciados que intervienen en la formación de brotes, hay que agregar la respuesta morfogenética de cada clon, ya que ésta es diferente de un genotipo a otro.

En cuanto a la obtención de plantas libres de virus, los resultados mostraron que en un 33.3% de los clones trabajados se obtuvo reacción negativa a PVX en brotes, ramas y tallos, lo cual corrobora la hipótesis de que es posible obtener plantas con reacción negativa al virus "X" por medio de organogénesis inducida por salicilato (ASA).

Los resultados mostraron que los clones 77-103-103 y 78-7-110 presentaron el 100% de explantes negativos, probablemente fue debido a que el subcultivo sucesivo (durante más de 12 *meses*) favoreció la obtención de explantes con reacción negativa a PVX.

Los mecanismos de erradicación del virus durante el cultivo no se conocen pero se sugiere que la inactivación puede ser un factor producido por el explante o por algun componente del medio sobre el virus, aunque Pennazio y Redolfi 1974 han demostrado que si el explante es muy pequeño el virus puede ser inactivo durante el cultivo y Quak (1972) especula que las partículas virales desaparecen por el contacto del meristemo con el medio (en Mellor 1972); además se tiene conocimiento de que los virus se distribuyen en forma heterogénea en la planta (Quak 1972); y que algunos sitios pueden estar sin virus o con bajas concentraciones de éste, pudiendo haber propagado un esqueje sin virus y

obtener explantes negativos; también se sabe que los reguladores del crecimiento pueden tener algún efecto inhibidor sobre los virus (Fraser y Whenham 1982), por lo que al pasar estos clones por varios subcultivos en diferentes medios, estos favorecieron la obtención de plantas libres de PVX.

Crowley y Hanson 1960 (en Quak 1972) postulan que en células de callo de tabaco infectadas con virus, hay una con virus, hay una competitividad entre la división celular y la multiplicación del virus; superando la división célular de la planta, la velocidad de replicación del virus, pudiendo contribuir también este factor a la obtención de plantas sanas.

En el experimento 2.C, los resultados mostraron que aunque el testigo presentó un mayor porcentaje de explantes con brotes (Cuadro 6), estos no superaron el porcentaje de explantes negativos a PVX, ya que dicho porcentaje fue mayor en los explantes tratados con ASA (Cuadro 6.A) De los 10 tratamientos con ASA en dos de ellos los porcentajes de explantes negativos fueron similares al testigo no marcándose alguna tendencia, de los ocho tratamientos restantes en seis se obtuvo un porcentaje mayor de explantes negativos en los tratados con ASA, y únicamente en dos tratamientos, en el testigo fue superior el porcentaje de explantes negativos, lo que sugiere que el ácido ácetil salicílico puede tener participación en la obtención de explantes negativos.

De las tres rutas seguidas en la FI, se observó que los mayores explantes negativos se obtuvieron en los esquejes que fueron incubados bajo condiciones de Banco de Germoplasma *in vitro*, en la concentración $10^{-4}$ M de ASA, en este experimento se alcanzó un 75% de explantes negativos, siendo el más alto obtenido en todos los experimentos con y sin ASA; lo antes mencionado indica que las condiciones de baja temperatura (8°C) y la concentración de $10^{-4}$M de ASA se conjugaron para la obtención de plantas negativas, no siendo indispensable la respuesta de organogénesis; Selsky y Black 1962; Paduchy-Kryczynski (1982), señalan que es posible obtener plantas sin virus, empleando bajas temperaturas, el segundo autor trabajó con plantas de crisantemo y tubérculos de papa, obteniendo plantas de papa libres de virus manteniéndolas a 5°C por seis meses; lo cual sugiere que el frío afecta la replicación del virus y si además se utiliza con ASA, esta puede contribuir a reducir el tiempo para obtener plantas sana ya que en este caso fue de tres meses.

En los clones 77-1A-28 y 77-97-65 se obtuvieron explantes negativos en tratamientos y en testigo, sin embargo se observó que el ASA incrementó los porcentajes de brotes y de ramas libres de PVX Apéndice 5.

En base a los resultados obtenidos, se observa que para la obtención de explantes negativos es más relevante la presencia del salicilato que el fenómeno de organogénesis por sí.

Este método presenta ventajas con respecto a termoterapia-cultivo de meristemo y se enumeran a continuación:

1) La rutina empleada en el Programa Nacional de Papa, comprende técnicas para la limpieza de materiales, dentro del proyecto de Producción de semilla. Los tubérculos se obtienen del campo después de la cosecha una vez por año. El espacio disponible en la estufa de termoterapia permite trabajar únicamente de dos a tres clones por cada bimestre, lo que obliga a procesar los clones escalonadamente, los tubérculos tienen que guárdarse, antes de ser sembrados en suelo para el tratamiento de termoterapia. Dicho almacenaje favorece la deshidratación natural del tubérculo, lo que hace necesario sembrar los tubérculos en invernadero, a fin de poder partir de tubérculo turgente para las plantas que se trataran con calor ya que se ha observado que tubérculos deshidratados producen plantas con menor resistencia al calor.

   Además se requiere de personal entrenado para la extracción del meristemo. Sin embargo con el método de organogénesis inducida por ASA se tienen las ventajas siguientes: se pueden trabajar muchos clones en cualquier epoca del año, ya que al tener el material *in vitro* se puede conservar por tiempo indefinido; no se requiere de personal capacitado en el aislamiento de meristemo ya que en este método se utilizan yemas completas.

2) Los materiales que después de haber sido trabajados con termoterapia cultivo de meristemo, aún presenten reacción positiva a virosis pueden ser, tratados en cualquier época del año sin tener que esperar un ciclo nuevamente para obtener tubérculos, lo cual toma aproximadamente 10 meses, en cambio con este método en tres meses.

3) Otra ventaja es que con organogénesis hay un potencial (El potencial es el número de esquejes posibles apropagar; de un tallo cinco yemas y de un brote tres) mayor de plantas a propagar, como lo muestran los datos del clon 77-1A-76 el cual fue trabajado por ambos métodos, por termoterapia -cultivo de meristemo se utilizaron 109 meristemos, de los cuales se obtuvieron en promedio 60 plantas negativas (Cuadro 2) en un tiempo aproximado de 8 meses, mientras que con organogénesis, se trabajarón 60 yemas axilares y se obtiene hipotéticamente 133 plantas Apéndice 5 en un tiempo de cinco meses.

4) También se puede trabajar por organogénesis clones que por sus características varietales, presenten baja resistencia al tratamiento de calor, o baja sobrevivencia en cultivo de Meristemo *in vitro*.

Por lo antes mencionado se propone que la organogénesis inducida por salicilatos puede ser una alternativa para obtener plantas de papa libres de virus X.

# V CONCLUSIONES

1) La técnica de termoterapia-cultivo de yemas, permite obtener plantas libres de virus "X".

2) Se obtiene un mayor porcentaje de plantas libres de PVX a partir de yemas de zona basal seguida de la apical.

3) El ASA puede inhibir o favorecer la organogénesis dependiendo del balance hormonal empleado.

4) Es determinante el medio en el cual haya sido cultivado el explante antes de inducir organogénesis.

5) Los medios de la FI y FII, son determinantes para la respuesta organogenética.

6) La capacidad morfogenética de cada clon es determinante para la respuesta organogenética.

7) Es posible obtener plantas con reacción negativa a PVX en presencia y ausencia de ASA.

8) La presencia del salicilato es más importante que la organogénesis por si misma para obtener explantes libres de virus.

# VI BIBLIOGRAFIA


- Abelló, J.F. (1988). Electroterapia y Cultivo de tejidos contra virus en papa *Solanum* ssp. Tesis I. Agrónomo. UACH. México 69 p.

- Attfield, E.M. and Evans P.K. (1991) A. Developmental Pattern of Root and Shoot Organogenesis in Cultured Leaf Explants of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc. Journal of Experimental Botany 42 234: 51-57.

- Attfield, E.M. and Evans P.K. (1991) B. Stages in the Initiation of Root and Shoot Organogenesis in Cultured Leaf Explants of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi nc. Journal of Experimental Botany 42, No. 234:59-63.

- Barker, L. J and Levitan, H. (1971) Salicilates; Effect on membrane permeability of Mailuscan Neurons Science 1977: 1245-1247.

- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. (1983). Plant Tissue Culture: Theory and Practice. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. Printed in the Netherlands. 71-90

- Bidwell, R.G.S. (1979). Fisiología vegetal (2da ed.) MacMillan México D.F.

- Bittner, H. Schenk, G. and Schuster, G. (1987). Chemotherapeutical Elimination of Potato Virus X from Potato Stem cuttings. Phytopathology 120: 90-92

- Chi, G.L. Pua, E-Ch, and Goh, G-J. (1991). Rol of Ethylene on *de novo* Shoot Regeneration from Catyledonary Explans of *Brassica campestris* SSP. *Pekinensis* (LOUR) Olsson *in vitro*. Plant Physiol 96: 178-183.

- Clark, M.F and Adams, A.N 1977 Characteristics of the microplate method of enzyme-liked inmuno-sorbent assay for the detection of plant viruses. E. Malling Res. Stn. Maidston Kent. England 6 p.

- Coleman, G.D. and Ernst, S.G. (1990). Shoot induction competence and callus determination in Populus deltoides. Plant Science, 71: 83-92.

- Dawson, O.W. (1984). Effects of animal antiviral chemicals on plant viruses. Phytopathology 74:211-213.

- Dodds, J.H. and Ng, S.Y.C. (1987). Exploration, Maintenance, and utilization of Sweet Potato Genetic Resources. Report of the first Sweet Potato Planning Conference. International Potato Center (CIP).

- Espinoza, N., O. Estrada, R. Silva Rodríguez P. Tovar, P., Lizarraga, R., and Dodds J.H. (1986) The Potato: A Model Crop Plant for Tissue Culture. International Potato Center En:Out look on agriculture. Pergamon Press. Great Britain, 15 (1), 21-26.

- Espinoza, N., Estrada R., Tovar P., Bryan J., Dodds J.H., (1984). Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. Specializad technology Document I. International potato center. 20 p.

- Espinoza, N, Estrada. R, Tovar P, Bryan J, Dodds, J. H (1987). Tissue Culture micropopagation, conservation, and export of potato germoplasm. Specialized Technology Document 1. International Potato center 20 p.

- Fraser, R.S.S. and Whenham, R.J. (1982). Plant growth regulators and virus infection: A critical review Plant Growth Regulation 1:37-59.

- Geneve, R.C. and Kester, S.T. (1991). Polyamines and Adventitious Root Formation in the Juvenile and Mature Phase of English Ivy. Journal of Experimental Botany 42, 234: 71-75.

- H.Li, P. (1985). Potato Physiology Academic Press-INC: Unites States, America.

- Haab, D. Abou-Mandour A.A., Blaschek. W., Franz G., and Czygan F.C. (1991). The influence of phytohormones on growth, organ differentiation and fructan production in callus of *Symphytum officinale* L. Plant Cell Reports. 10:421-424.

- Huamán, Z. (1986). Botánica Sistemática y morfología de la papa. Boletin de Información Técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP) Lima Perú 22 p.

- Kassanis B., and Verman A., (1967). The production of virus-free clones of some Bristish potato varieties. Ann. Applied Biology, 59: 447-450.

- Kaur-Sawhney, R., Shih. L-M. and Galston A.W. (1982). Relation of Polyamine Biosynthesis to the Initiation of Sprouting in Potato Tubers. Plant Physiol 69:411-415.

- Kikuta, Y. and Okazawa Y. (1984). Control of root and shoot-but formation from potato tuber tissue cultured *In vitro*. Physiol Plant 61:8-12.

- Kimura, Y., Takesake, K., Takahashi, Y., & Tamura. S., (1976). Isolation, identification and biological activites of growth inhibitors in peanut. Agr. Biol. Chem. 40: 126-128.

- Lillo, C. (1989). Effects of media components and factors on shoot formation from protoplast-derived calli of *Solanum tuberosum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 19: 103-111.

- López-Delgado H.A., (1981). Reguladores del crecimiento I: Efecto del ácido acetil salicílico sobre algunos componentes del rendimiento en frijol (*Phaseolus vulgaris* L. c.v Cacahuate). Tesis Biólogo UNAM México.

- López-Delgado H.A. (1987) Efecto del ácido acetil Salicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum Cardiophyllum* (Lindl) cultivadas *in vitro*. Tesis M. en C. C.P Chapingo México 86 p.

- López-Delgado H., y Mora H.M. (1989-1990). Informe de investigación Campo Exp. Toluca INIFAP.

- López-Delgado H., Zavala, T., Cadena, M. (1985). Obtención y conservación de genotipos de papa libres de virus. Folleto micelaneo Núm. 3 SARH 16 p.

- Lozoya- Saldaña, H. and Dawson, W.O., (1982) Effect of Alternating Temperature Regimes on Reduction or Elimination of Viruses in Plant Tissues. Phytopathology 72: 1059-1064.

- Mac Donald, D.M. (1973). Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S. Potato Res 16: 263-269.

- Maldonado, A.U (1982)., Papa alimento base del Pueblo Mexicano.

- Malamy, J. Carr, J.P., Klessig D.F., Raskin I, (1990). Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. Science 250: 1002-1004

- Malamy, J., Hennig J., and Klessig D.F., (1992). Temperature Dependent Induction of Salicylic Acid and its Conjugates during the Resistanse Responce to tobacco Mosaic Virus Infection. The Plan Cell, 4: 359-366.

- Meins, F. (1989). Habituation: Heritable Variation in the Requirement of Cultured Plant Cell for hormones. Ann. Rev. Genet. 23:395-408.

- Mellor, F.C. and Stace-Smith, R. (1972). Virus-Free Potatoes by Tissue Culture ed J.A de Boky. Wageningen Center for Agricultural Publishing and Documentation 616-635.

- Mills, P.R. and Wood R.K.S. (1984). The Effects of Polyacrylic Acid, Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid on Resistance of Cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Phytopath. Z., 111: 209-216

- Métraux J.P., Signer, H., Ryals. J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverard, B., (1990). Increase in Salicylic Acia at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. Science, 250: 1004-1006.

- Montaldo, A. (1984). Cultivo y mejoramiento de la papa. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura San José Costarica.

- Mora, H.M.E. (1991). Efecto del Acido Acetil Salicílico en el Crecimiento de Yemas Axilares de *Solanum tuberosum* Cultivadas *in vitro*. Tesis Biólogo UNAM, México 115 p.

- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and brossays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-479.

- Norris, D.O. (1954) Development of virus-free stock of green Mountain Potato by Treatment with Malachite Green. Aust. J. Agric. Res., Vol. 5. No. 4 658-663.

- O'Brien, MJ. and Rich, A.E. (1979). Potato Diseases. Agriculture Hand book No. 474 United States Departament of agriculture/Agricultural Research service. Washington D.C.

- Paduch - Cichal, E. and Kryczynski, S. (1987). A Low Temperature Therapy and Meristem-Tip Culture four Eliminating four Viroids from Infected Plants. J. Phytopathology 118:341-346.

- Parson, B.D. (1984). Papas Manuales para educación agropecuarias SARH. Trillas México D.F.

- Pennazio, S., Colariccio D., Roggero, P., and Lenzi, R., (1987) Effect of salicylate stress on the hypersensitive reaction of asparagus bean to tabacco necrosis virus. Physiological and Molecular Plant pathology 30:347-357.

- Pett, B. Kluges, S. Thieme R., Nuhn R., and Kerptscher H.P., (1986). High yield ok PVY- free potato plants from axillary bud cultures after application of lysolecithin analogues and aminoademantane Potato Research 29: 169-172.

- Quak, F. (1972)A. Viruses of potatoes and seed potato production J.A. de Bolox ed. Wageningen Centre for Agricultural Publishing and Documentation The Netherlands.

- Quak, F. (1972)B. Heat treatment and Substances Inhibiting Virus Multiplication, In Meristem Culture to Obtain Virus -free Plants. Wageningen, Institute for Phytopathological Research, The Netherlands. 144-148.

- Rich, A.E. (1983). Potato Diseases. Academic Press INC USA.

- Roggero, P., and Pennazio. S., (1988). Effects of Salicylate on Systemic Invasion of Tabacco Plants by Various Viruses. Phytopathology 123:207-216.

- Rojas, G.M., (1978). Fisiología Vegetal Aplicada Mc. Graw-Hill. México.

- Salazar, L.F. (1982) Enfermedades virosas de la para. CIP. Centro Internacional de Lima, Perú.

- Salisbury, B.F., Ross W.C., (1978). Plant Physiology, (2da. ed.) Wadsworth Publinshing Company California.

- Saxena, P.K. and Rashid, A. (1980) Differentiation of Bud-cell on the Protonema of the Moss Anoectangium thomsonii. Effect of Aspirin and Salicylic Acid. Z. Pflanzenphysiol 99: 187-189.

- Selsky, M.I. and Black L.M. (1962). Effec of high and low temperatures on the survival of wound-tumor virus in sweet clover. Virology 16: 190-198

- Smith, O. Ph. D. (1977). Potatoes: Production, Storing Processing. (2da. ed.) The AVI Publishing. Company. INC. United States of America.

- Smith, H & Grierson, D. (1982). Determination and Related Aspects of Plant Development. En: The Molecular Biology of Plant Development. Botanical Monographs. Vol. 18: University of California Press 517-526 pp.

- Tiburcio, A.F. Kaur-Sawhney R., Galston A.W., (1987). Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on alkaloids and organogenesis in tabacco callus cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture 9: 111-120.

- Vázquez, C.G., (1981). Uso de la papa en la Elaboración de tortilla y pan. Tesis Profesional UACH. Industrias Agrícolas. Chapingo, México.

- Van Loon, L.C. and Antoniw, J.F. (1982) Comparison of the effets of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tabacco. Neth J. Pl. Path. 88: 237-256.

- Van de Rhee M.D., Van Kan J.A.L., González-Jaén M.F., and Bol J.F, (1990). Analysis of Regulatory Elements Involved in the Induction of Two Tobacco Genes by Salicylate Treatment and Virus Infection. The Plan Cell 2:357-366.

- Villalobos, V.M., Oliver M.J., Yeung E.C., and Thorpe T.A., (1984). Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured in vitro. Physiol. Plant 61: 483-489.

- Wang, P.J., (1977) Regeneration of Virus-free Potato from Tissue Culture. Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application W. Barn, E. Reinhard, M.H. Zenk. Editors. SPRINGER-VERGAS. Berlin Herdelberg New York.

- Wareing, P.F. & Phillips, I.D.J. (1982). Growth and Differentiation in plants (3rd. ed). Great Britain: Pergamon Press.

- White, R.F., (1979). Acetylsalicylic Acid (Aspirin) Induce Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco. Virology 99: 410-412.

- Yalpani., N., Silverman P; Wilson T. M.A; Kleier A. D, and Raskin I., (1991). Salicylic Acid is a Systimec Signal and an Iducer of Pathogenesis Related Proteins in Virus-Infected Tobacco. The Plant Cell, 3: 809-818.

# VII APENDICE

**Apendice 1**

**. Sales de Murashige-Skoog MS***

$NH_4NO_3$ 16.5g/l
$KNO_3$ 19 g/l
$CaCl_2$ $2H_2O$ 4.4g/l
$KH_2PO_4$ 1.7g/l
$H_3BO_3$ 0.062g/l
$MnSO_4H_2O$ 0.169g/l
$ZnSO_4$-$1H_2O$ 0.086g/l
KI 0.0083g/l
$Na_2MoO_4$-$2H_2O$ 0.025g/l
$CuSO_4$-$5H_2O$ 0.00025g/l
$CbCl_2$-$6H_2O$ .00025g/l

**Sales de M-S para el medio Msm****

**Elementos menores para medio MSm**
$H_3BO_3$ 6.2mg/l
$MnSO_4.H_2O$ 1.7g/l
$Zn\ SO_4.7H_2O$ 1.0g/l
KI 83.0mg/l
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$ 25.0mg/l
$CuSo_4$ .$5H_2O$ 2.5mg/l
$Co_2Cl$ .$6H_2O$ 2.5mg/l

**Elementos mayores medio MSm Solución Madre:**
$NH_4NO_3$ 16.5g/l
$KNO_3$ 19.0g/l
$CaCl_2$ .$2H_2O$ 4.4g/l
$MgSO_4$ 3.7g/l
$KH_2PO_2$ 1.7g/l

**Solución de ASA**

Para todas las concentraciones de ASA utilizadas en este trabajo. Se hizo una solución madre de 10mg de ASA que se disolvió en 0.5ml de DMSO (dimetil sulfóxido) y posteriormente se aforó con agua destilada 10ml.

**Apéndice 2**

**Muestreo para pruebas serológicas**

A la planta crecida de un tamaño aproximado de 5-6 cm se le cortaron los ápices con todo y hojas y se metieron a una bolsa marcada con la clave (clon y el no de la planta muestreada) correspondiente, esto se hizo tanto en invernadero como en condiciones de asepcia en la cámara de flujo laminar. Las muestras fueron maceradas para las pruebas de LATEX y ELISA.

**Detección de virus mediante la prueba de LATEX.**

1) Tomar una placa para la prueba de LATEX o una caja de petri de plástico y con un lápiz de cera trazar lineas paralela a 0.8 cm unas de otras, invertir la caja y trazar lineas perperdiculares para formar una cuadrícula.

2) Tomar tubos de ensayo (dos por cada muestra) rotularlos para identificar las muestras.

3) Poner en cada tubo 180 de solución amortiguadora (Buffer) 0.05 mM de Tris-HCl, pH8 (contiene además 1% de Bisulfito de Sodio y 0.05% de Tween 20)

4) Dentro de Bolsas de Plástico previamente etiquetadas, se maceran las muestras que se desean probar, incluyendo por lo menos una muestra sana y una muestra con virus.

5) De cada muestra se toma 20ml de savia o extracto y se agrega a uno de los tubos con solución amortiguadora Tris-Hcl y se mezclan perfectamente. Esta será dilución 1:10

6) De la solución 1:10 de cada muestra se toman una ó dos gotas y se adicionan al segundo tubo que contiene Tris-Hcl. Se homogeniza y se obtiene asi la dilución 1:100.

7) En cada cuadro de la placa colocar una gota de la dilución 1:100 de cada muestra, y en el cuadro de al lado colocar una gota de la dilución 1:10.

8) A cada una de las gotas de la muestra, adicionar una gota de LATEX sensibilizado con el virus que se desea detectar.

9) Cubrir la placa y agitarla (movimiento rotatorio) a una velocidad de 120 rpm en un agitador. Si no cuenta con agitador, colocar la placa sobre un papel (hoja bond) y ejecutar un movimiento rotatorio, procurando que alguna esquina de la placa describa círculos de 1. 5-2cm de diámetro.

10) Leer los resultados después de 15-60 minutos de agitación (dependiendo del tiempo requerido por los testigos positivos para reaccionar).

## Detección de virus mediante la prueba de ELISA

1.- Colocar 150 microlitros de gammaglobulina purificada diluida en buffer de cobertura en cada cavidad de la placa de microtitulación, incubar de 30 a 34°C por tres horas.

2.- Lavar la placa con PBS-Tween.
Dejar remojando por lo menos tres min. Repetir el lavado tres veces vaciar la placa.

3.- Añadir alícuotas del 150 microlitros de la muestra a probar (por duplicado). Dejar A 6°C toda la noche o a 37°C por 4-6 horas. Debe incluirse por lo menos una muestra sana y una enferma, además de llenar dos pozos con solución extractora.

4.- Lavar la placa tres veces como se indica en No. 2

5.- Añadir alícuotas de 150 microlitros de gamaglobulina conjugada c/enzima (conjugando E) a cada cavidad Incubar a 30-34°C por tres horas.

6.- Lavar la placa tres veces como se indica en 2.

7.- Adicionar alícuotas de 150 microlitros de solución recién preparada de sustrato a cada cavidad. Incubar a temperatura ambiente por una hora o el tiempo necesario para ver reacción.

8.- Detener la reacción agregando 50 microlitros de Na OH 3M a cada cavidad.

Técnica propuesta por Clark Adams, en 1977, con algunas modificaciones del Programa Nacional de papa.

9.- Tomar los resultados por medio de:

a) Observación visual
b) Midiendo la densidad óptica a 405 nanómetros para la fosfatasa alcalina y fosfato de p-nitrofenilo.

**A) Preparación de la muestra:**

La muestra (hoja) debe molerse con PBS Tween+2% de polivinil pirrolidona (PVP),+0.2% de albúmina de huevo. Diluciones entre 1/10 y 1/20 dan buenos resultados.

**B) Dilución del conjugado:**

El conjugado se diluye (1:1000) en PBS. Tween +2% de PUP + 0.2% de albúmina de huevo.

**C)Preparación del substrato:**

a) Fosfato de p- nitrofenilo 0.6 mg/ml de Buffer para substrato.

**BUFFERS**

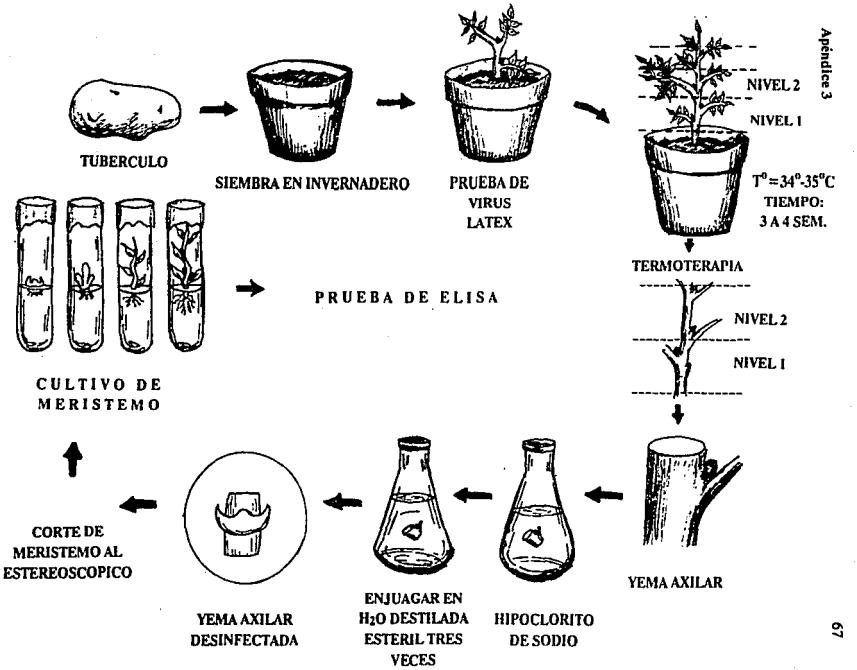
**PBS:** (PH 7.4)
8.0g Nacl
0.2g $KH_2PO_4$
2.9g $Na_2$ $HPO_4$ .$12H_2O$
0.2g Kcl
0.2g Na $N_3$
PBS-Tween = PBS + 0.5ml de Tween 20 por litro

**Buffer de Cobertura** (PH 9.6)
1.5g $Na_2CO_3$
2.93g $NaHCO_3$
0.2g $NaN_3$

**Buffer para substrato.**
A) Para fosfatasa alcanina:
97ml de dietanolamina
800ml de agua
0.2g de Na $N_3$
añadir Hcl hasta que de un pH de 9.8

B) Para peroxidasa de rábano picante:
7.3g $Na_2$ $HPO_4$
5.1g Acido citrico
0.4 ml $H_2$ $O_2$ al momento de usarlo

Nota: todos los buffers se aforan a 1 litro de agua


TUBERCULO
SIEMBRA EN INVERNADERO
PRUEBA DE VIRUS LATEX
NIVEL 2
NIVEL 1
T°=34°-35°C
TIEMPO: 3 A 4 SEM.
TERMOTERAPIA
NIVEL 2
NIVEL 1
YEMA AXILAR
HIPOCLORITO DE SODIO
ENJUAGAR EN $H_2O$ DESTILADA ESTERIL TRES VECES
YEMA AXILAR DESINFECTADA
CORTE DE MERISTEMO AL ESTEREOSCOPICO
CULTIVO DE MERISTEMO
PRUEBA DE ELISA

**Apéndice 4**

**CUADRO 12.- PORCENTAJE DE EXPLANTES BROTADOS Y NUMERO DE BROTES POR EXPLANTE DE *S. tuberosum* INCUBADOS *in vitro* EN 3 MEDIOS EN PRESENCIA DE ASA (FI), Y SUBCULTIVADAS SIN ASA (FII) A MEDIOS DIFERENTES. LOS RESULTADOS SON DE 6 CLONES**

| No. CLON | MEDIO II | ORGANOGENESIS | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | UNICAMENTE CON ASA | | | UNICAMENTE TESTIGO | | | ASA Y TESTIGO | | |
| | | % EXP. BROT | No. BROT EXP. | TRAT. | % EXP. BROT | No. BROT EXP. | | % EXP. BROT | No. BROT EXP. | TRAT. |
| FI PG | $MSm_1$ | | | | | | | 20 | 2 | Test |
| 77-103-103 | $MSm_2$ | 20 | 3 | $10^{-6}$ | | | | | | |
| | $MSm_3$ | | | | | | | 30 | 3 | Test |
| | $MSm_4$ | | | | 30 | 1 | | | | |
| | $MSm_5$ | 30 | 1 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| 77-18-213 | $MSm_2$ | | | | | | | 20 | 4 | Test |
| | $MSm_3$ | | | | 20 | 1 | | | | |
| | $MSm_4$ | | | | | | | 40 | 1 | $10^{-6}$ |
| | $MSm_5$ | | | | 20 | 1 | | | | |
| 78-7-110 | $MSm_1$ | | | | 20 | 3 | | | | |
| | $MSm_2$ | | | | 20 | 3 | | | | |
| | $MSm_4$ | 20 | 3 | $10^{-5}$ Y $10^{-6}$ | | | | | | |
| | $MSm_5$ | | | | | | | 40 | 4 | $10^{-5}$ |
| FI MSm | $MSm_4$- | | | | 23 | 3 | | | | |
| 77-103-103 | $MSm_5$- | | | | 40 | 3 | | | | |
| | $MSm_8$* | | | | 20 | 5 | | | | |
| 78-7-110 | $MSm_4$* | | | | | | | 20 | 5 | Test |
| | $MSm_5$* | 40 | 2.5 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| | $MSm_5$- | 20 | 2 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| | $MSm_6$* | 20 | 2 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| | $MSm_6$- | 20 | 1 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| 77-97-65 | $MSm_1$* | | | | | | | 80 | 2.5 | Test |
| 1SB | " | | | | | | | 60 | 2 | $10^{-5}$ |
| | $MSm_2$ | | | | 80 | 2.5 | | | | |
| | " | | | | | | | 60 | 2.6 | Test |
| | $MSm_3$* | | | | 50 | 2. | | | | |
| | " | | | | | | | 40 | 1.5 | Test |
| | $MSm_4$* | | | | 80 | 2 | | | | |
| | " | | | | 40 | 2.5 | | | | |
| | $MSm_5$* | | | | | | | 40 | 3.5 | $10^{-6}$ |
| | " | | | | | | | 20 | 3 | $10^{-6}$ |
| 2SB | $MSm_4$* | 40 | 2.5 | $10^{-5}$ | | | | | | |
| | $MSm_5$* | | | | 20 | 4 | | | | |
| | C.1* | | | | 40 | 2 | | | | |
| | C.2 | 25 | 2 | $10^{-6}$ | | | | | | |
| 676007 | NO BROTO | EN NINGUN MEDIO | | | | | | | | |
| FI C | | | | | | | | | | |
| 77-IA-26 | $MSm5^*$ | | | | | | | 40 | 4 | $10^{-5}$ |
| | C.2* | | | | 20 | 5 | | | | |
| 77-103-10 | $MSm5^*$ | 20 | 1 | $10^{-4}$ | | | | | | |
| 77-97-65 | NO BROTO | EN NINGUN MEDIO | | | | | | | | |

* SIN $GA_3$

\- CON 0.125 ppm DE $GA_3$

**CUADRO 13.- PORCENTAJE DE EXPLANTES DE *S. tuberosum* CON REACCION NEGATIVA A PVX EN LA PRUEBA DE ELISA, DESPUES DE SER TRATADAS CON ASA Y No. DE EXPLANTES POTENCIAL A PROPAGAR.**

| | CLON No. 77-1A-26 | | | | | | | | CLON No. 71-97-65 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TRATADOS CON ASA | | | | TESTIGO | | | | TRATADOS CON ASA | | | | TESTIGO | | | |
| TIPO DE EXPLANTE | No EXPLA. (-) | % EXP. (-) | % EXP. CON TALLO (-) Y/O BROTES RAMAS | No. DE EXP. (-) POTENCIAL A PROPAGAR | No. EXP. (-) | % EXP. (-) | % EXP. CON TALLO (-) Y/O BROTES RAMAS | No. EXP. (-) POTENCIAL A PROPAGAR | No. EXP. (-) | % EXP (-) | % EXP. CON TALLO (-) Y/O BROTES RAMAS | No. EXP. (-) POTENCIAL A PROPAGAR | No. EXP (-) | % EXP. (-) | % EXP. CON TALLO (-) Y/O BROTES RAMAS | No. EXP (-) POTENCIAL A PROPAGAR |
| TALLOS | 12 | 25 | 10 | 50 | 8 | 40 | 12.5 | 40 | 28 | 14 | 7.14 | 140 | 21 | 21 | 14.2 | 105 |
| BROTES | 2 | 15.3 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 30.4 | 0 | 40 | 13 | 20 | 0 | 39 |
| RAMAS | 5 | 71.4 | 20 | 6 | 4 | 80 | 25 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 19 | | 30 | 81 | 12 | | 37.5 | 52 | 42 | | 7.14 | 182 | 34 | | 14.2 | 144 |

NOTA: EL POTENCIAL ES EN PROMEDIO EL No. DE YEMAS POR TALLO (5) Y POR BROTE (3).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA