

i

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

EFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y TIPOS DE RECIPIENTES EN LA TUBERIZACIÓN IN VITRO DE LA PAPA  
(Solanum tuberosum L.)

TESIS

TESIS PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD  
DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

ERWIN ENRIQUE GÓMEZ DELGADO

En el acto de su investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO

GUATEMALA, AGOSTO DE 2,003

DL  
10  
T(2024)

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**RECTOR**

**Dr. LUIS ALFONSO LEAL MONTERROSO**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DECANO  
VOCAL PRIMERO  
VOCAL SEGUNDO  
VOCAL TERCERO  
VOCAL CUARTO  
VOCAL QUINTO  
SECRETARIO**

**Dr. Ariei Abderraman Ortiz Lòpez  
Ing. Agr. Alfredo Itzep Manuel  
Ing. Agr. Manuei de Jesús Martínez Gvalle  
Ing. Agr. Erberto Raùl Alfaro Ortiz  
Br. Luis Antonio Raguay Pirique  
Br. Juan Manuel Corea Ochoa  
Ing. Agr. Pedro Pelaèz Reyes**

Guatemala, Agosto de 2,003

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos

Distinguidos miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**EFFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y TIPOS DE RECIPIENTES  
EN LA TUBERIZACIÓN IN VITRO DE LA PAPA  
(Solanum tuberosum L.)**

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo de ustedes.

Atentamente,



Erwin Enrique Gómez Delgado

## ACTO QUE DEDICO

- A:
- DIOS** Por darme sabiduría y guiarme en todo momento para alcanzar mis metas.
- MIS PADRES** José Guillermo Gómez González (+ )  
 María Elena Delgado  
 A quienes debo mi ser y en especial a mi madre por todo el gran cariño que le tengo y como recompensa a sus esfuerzos y sacrificios tesoneros en bien de mi superación .
- MIS ABUELOS** Ernesto Delgado Requena (+ )  
 Adela de Delgado  
 Seres abnegados y sublimes, que contribuyeron grandemente con sus enseñanzas a forjarme como un hombre de bien, por lo que viviré de ellos; eternamente agradecido.
- MI ESPOSA** Edna Beatriz del valle Cifuentes  
 Como una prueba de amor y ternura por solidarizarse con mi esfuerzo en las buenas y en las malas; como esposa y compañera.
- MIS HIJOS** Sindy Beatriz, Erwin Emilio, Enrique Salvador y Katherine Emilsa  
 Como un ejemplo de esfuerzo y superación que oriente el futuro de cada uno de ellos.
- MIS SUEGROS** Emilio Salvador del Valle  
 Heroína Cifuentes  
 Por su calidad humana y apoyo incondicional
- MIS TIOS(AS)** Marco Antonio, Jorge Erick, Marta, Amalia, Albertina, Elsa, Irma y Adela .  
 Con respeto y cariño.
- MI FAMILIA  
 EN GENERAL** Respetuosamente
- A MIS AMIGOS  
 Y COMPAÑEROS** Haroldo Quej Chen, Fredy Figueroa, Marco Antonio Ruiz, Mario Garcia, Carlos Roberto Morales, Bagner Lucero Gómez y Ligia Batres.  
 Con agradecimiento y aprecio, por el valor de su amistad .

## TESIS QUE DEDICO

A:

MI PATRIA GUATEMALA

VILLA DE SAN CRISTÓBAL VERAPAZ  
ALTA VERAPAZ

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS

INSTITUTO NORMAL MIXTO DEL NORTE  
"EMILIO ROSALES PONCE"

INSTITUTO MIXTO DE EDUCACIÓN BÁSICA POR COOPERATIVA

ESCUELA OFICIAL PARA VARONES

TODAS AQUELLAS PERSONAS E INSTITUCIONES QUE  
CONTRIBUYERON A MI FORMACIÓN

## AGRADECIMIENTOS

### A MIS ASESORES

Ing. Agr. Msc. Héctor Alfredo Sagastume  
Ing. Agr. Walter Garcia Tello

Por su valiosa orientación, colaboración experiencia y entusiasmo en apoyo a la realización de la presente investigación.

### LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLAS

Por el apoyo y fomento a la investigación en Guatemala y por los recursos invertidos en la realización esta investigación.

Por el apoyo personal recibido de su Gerente Ing. Agr. Msc. Wotzbeli Méndez.

### EL PERSONAL TÉCNICO Y ADMINISTRATIVO DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA.

Otto Osorio, Dario Fuentes, Isidro Chen, Juan Toj, Clara Velásquez, Julieta Batres, Ing. Héctor Sagastume, Ing. Luis Molina e Ing. Koichiro Kamada

Por la muestra de compañerismo .

## CONTENIDO

	INDICE DE CUADROS-----	x
	INDICE DE FIGURAS-----	xiii
	ABREVIATURAS-----	xiv
	RESUMEN-----	xvi
1	INTRODUCCIÓN-----	1
2	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA-----	3
3	MARCO TEORICO-----	4
	3.1 Marco Conceptual-----	4
	3.1.1 Cultivo <u>in vitro</u> -----	4
	3.1.1.1 Tipos de cultivo <u>in vitro</u> -----	4
	3.1.1.2 Requerimientos nutritivos para un crecimiento <u>in vitro</u> -----	5
	3.1.2 Cultivo de meristemos-----	6
	3.1.3 El ambiente químico en los cultivos-----	7
	3.1.3.1 Medio de cultivo-----	7
	3.1.3.2 Los medios de cultivo y sus componentes-----	7
	3.1.3.3 Preparación del medio de cultivo-----	8
	3.1.3.4 Condiciones ambientales para la incubación-----	8
	3.1.3.5 Medio semisólido-----	8
	3.1.3.6 Agentes solidificantes-----	9
	3.1.3.7 Medio líquido-----	10
	3.1.3.8 Vitaminas-----	10
	3.1.3.9 Sales inorgánicas-----	11
	3.1.3.10 Reguladores de crecimiento-----	11
	3.1.3.10.1 Auxinas-----	12
	3.1.3.10.2 Citoquininas-----	12
	3.1.3.10.3 Giberilinas-----	12
	3.1.3.10.4 Acido absicico-----	12
	3.1.3.10.5 Aminoacidos-----	13
	3.1.3.10.6 Carbohidratos-----	13
	3.1.3.10.7 Agua-----	13
	3.1.3.11 Suplementos no definidos-----	14
	3.1.4 pH-----	15
	3.1.5 El ambiente fisico en los cultivos <u>in vitro</u> -----	16
	3.1.5.1 La temperatura-----	15
	3.1.5.1.1 Control de la temperatura-----	17
	3.1.5.1.2 Control de la iluminación-----	17
	3.1.5.1.3 La luz-----	18
	3.1.5.1.4 La irradiación-----	18
	3.1.5.1.5 El espectro-----	19
	3.1.5.1.6 El fotoperíodo-----	20
	3.1.6 Principios generales de la propagación <u>in vitro</u> -----	20
	3.1.7 Micropropagación-----	22
	3.1.8 Cámaras de cultivo-----	24
	3.1.9 Cámara de flujo laminar-----	25
	3.1.10 La esterilización de utensilios y medios-----	25
	3.1.11 El autoclave-----	26
	3.1.12 Ventajas de la micropropagación-----	26

3.1.13	Desventajas de la micropropagación-----	27
3.1.14	La tuberización-----	28
3.1.15	Aspectos fitosanitarios e importaciones de minitubérculos-----	30
3.1.16	Inducción y Utilización de microtubérculos-----	31
3.1.17	Ventajas de la microtuberización <u>in vitro</u> -----	31
3.1.18	Recipientes-----	32
3.1.19	Normas de calidad e industrialización de la papa-----	33
3.1.20	Clasificación botánica del cultivo de la papa-----	34
3.1.21	Morfología y comportamiento del tubérculo-----	35
3.1.22	La dormancia-----	35
3.1.23	La respiración-----	36
3.1.24	La brotación-----	36
3.1.25	Origen de la papa-----	36
3.1.26	Composición química de la papa-----	37
3.1.27	Medio y condiciones de cultivo-----	37
3.1.28	Retardadores de crecimiento de las plantas-----	38
3.1.29	Efecto de la oscuridad-----	38
3.2	Marco Referencial-----	39
3.2.1	Características de los materiales experimentales-----	39
3.2.1.1	Clones de papa-----	39
3.2.2	Manejo del experimento-----	41
3.2.3	Medios de cultivo experimentales-----	42
3.2.4	Estudios realizados sobre microtuberización de papa-----	43
3.2.4.1	Establecimiento de una tecnología <u>in vitro</u> en dos variedades de papa-----	43
3.2.4.2	Evaluación de la inducción y utilización de Tubérculos <u>in vitro</u> de papa-----	44
3.2.4.3	Minitubérculos de papa: Tecnología de validación en México-----	46
4	OBJETIVOS-----	48
4.1	Objetivo General-----	48
4.2	Objetivos específicos-----	48
5	HIPÓTESIS-----	49
6	METODOLOGÍA-----	50
6.1	Localización del experimento-----	50
6.2	Material vegetal-----	50
6.3	Manejo del experimento-----	50
6.3.1	Fase de estandarización-----	50
6.3.2	Fase de ensayo o preevaluación-----	51
6.3.3	Fase de micropropagación-----	51
6.3.4	Establecimiento del experimento-----	52
6.4	Aleatorización-----	52
6.5	Condiciones ambientales de incubación-----	53
6.6	Medición de variables de respuesta-----	53
6.6.1	Número de microtubérculos-----	53
6.6.2	Peso de los microtubérculos-----	53
6.6.3	Longitud de los microtubérculos-----	53
6.6.4	Diámetro de los microtubérculos-----	53
6.6.5	Microtubérculos con brotes-----	54

3.1.13	Desventajas de la micropropagación-----	27
3.1.14	La tuberización-----	28
3.1.15	Aspectos fitosanitarios e importaciones de minitubérculos-----	30
3.1.16	Inducción y Utilización de microtubérculos-----	31
3.1.17	Ventajas de la microtuberización <u>in vitro</u> -----	31
3.1.18	Recipientes-----	32
3.1.19	Normas de calidad e industrialización de la papa-----	33
3.1.20	Clasificación botánica del cultivo de la papa-----	34
3.1.21	Morfología y comportamiento del tubérculo-----	35
3.1.22	La dormancia-----	35
3.1.23	La respiración-----	36
3.1.24	La brotación-----	36
3.1.25	Origen de la papa-----	36
3.1.26	Composición química de la papa-----	37
3.1.27	Medio y condiciones de cultivo-----	37
3.1.28	Retardadores de crecimiento de las plantas-----	38
3.1.29	Efecto de la oscuridad-----	38
3.2	Marco Referencial-----	39
3.2.1	Características de los materiales experimentales-----	39
3.2.1.1	Clones de papa-----	39
3.2.2	Manejo del experimento-----	41
3.2.3	Medios de cultivo experimentales-----	42
3.2.4	Estudios realizados sobre microtuberización de papa-----	43
3.2.4.1	Establecimiento de una tecnología <u>in vitro</u> en dos variedades de papa-----	43
3.2.4.2	Evaluación de la inducción y utilización de Tubérculos <u>in vitro</u> de papa-----	44
3.2.4.3	Minitubérculos de papa: Tecnología de validación en México-----	46
4	OBJETIVOS-----	48
4.1	Objetivo General-----	48
4.2	Objetivos específicos-----	48
5	HIPÓTESIS-----	49
6	METODOLOGÍA-----	50
6.1	Localización del experimento-----	50
6.2	Material vegetal-----	50
6.3	Manejo del experimento-----	50
6.3.1	Fase de estandarización-----	50
6.3.2	Fase de ensayo o preevaluación-----	51
6.3.3	Fase de micropropagación-----	51
6.3.4	Establecimiento del experimento-----	52
6.4	Aleatorización-----	52
6.5	Condiciones ambientales de incubación-----	53
6.6	Medición de variables de respuesta-----	53
6.6.1	Número de microtubérculos-----	53
6.6.2	Peso de los microtubérculos-----	53
6.6.3	Longitud de los microtubérculos-----	53
6.6.4	Diámetro de los microtubérculos-----	53
6.6.5	Microtubérculos con brotes-----	54

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1</b>	Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos	<b>5</b>
<b>CUADRO 2</b>	Principales fuentes de luz usadas en las cámaras de cultivo	20
<b>CUADRO 3</b>	Composición química de la papa	37
<b>CUADRO 4</b>	Evaluación de medios inductores de tuberización	44
<b>CUADRO 5</b>	Rendimiento <u>in vitro</u> de tubérculos y sus componentes	45
<b>CUADRO 6</b>	Comparación de tres métodos estándar	46
<b>CUADRO 7</b>	Número de microtubérculos variedades Atzimba y Juanita	47
<b>CUADRO 8</b>	Distribución de tratamientos por recipiente	57
<b>CUADRO 9</b>	Composición química de los medios de cultivo	58
<b>CUADRO 10</b>	Análisis de varianza de la variable Número promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	60
<b>CUADRO 11</b>	Prueba de Duncan para la variable Número promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	61
<b>CUADRO 12</b>	Análisis de varianza de la variable Peso promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	62
<b>CUADRO 13</b>	Prueba de Duncan para la variable Peso promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	63
<b>CUADRO 14</b>	Análisis de varianza para la variable Longitud promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	65
<b>CUADRO 15</b>	Prueba de Duncan para la variable Longitud promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	65
<b>CUADRO 16</b>	Análisis de varianza de la variable Diámetro promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	67
<b>CUADRO 17</b>	Prueba de Duncan para la variable Diámetro promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Magenta	68
<b>CUADRO 18</b>	Análisis de varianza para la variable Promedio de microtubérculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Magenta	68
<b>CUADRO 19</b>	Prueba de Duncan para la variable Promedio de micro-	69

	tubèrculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Magenta	
<b>CUADRO 20</b>	Resumen de resultados obtenidos en las 5 variables de respuesta, recipientes Magenta; los clones Ictafrit y Loman	70
<b>CUADRO 21</b>	Anàlisis de varianza de la variable Número promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	73
<b>CUADRO 22</b>	Prueba de Duncan para la variable Número promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	74
<b>CUADRO 23</b>	Anàlisis de varianza para la variable Peso promedio de	75
<b>CUADRO 24</b>	Prueba de Duncan para la variable Peso promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	75
<b>CUADRO 25</b>	Anàlisis de varianza para la variable Longitud promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	77
<b>CUADRO 26</b>	Prueba de Duncan para la variable Longitud promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	78
<b>CUADRO 27</b>	Anàlisis de varianza para la variable Diàmetro promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	79
<b>CUADRO 28</b>	Prueba de Duncan para la variable Diàmetro promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en recipientes Gerber	80
<b>CUADRO 29</b>	Anàlisis de varianza para la variable Promedio de microtubèrculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Gerber	81
<b>CUADRO 30</b>	Prueba de Duncan para la variable Promedio de microtubèrculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Gerber	81
<b>CUADRO 31</b>	Resumen de los resultados obtenidos en las 5 variables de respuesta, recipientes Gerber; clones Ictafrit y Loman	82
<b>CUADRO 32</b>	Anàlisis de varianza para la variable Número promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	85
<b>CUADRO 33</b>	Prueba de Duncan para la variable Número promedio de microtuberculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos	85
<b>CUADRO 34</b>	Anàlisis de varianza para la variable Peso promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	87
<b>CUADRO 35</b>	Prueba de Duncan para la variable Peso promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	88
<b>CUADRO 36</b>	Anàlisis de varianza para la variable Longitud promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	89
<b>CUADRO 37</b>	Prueba de Duncan para la variable Longitud promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	90
<b>CUADRO 38</b>	Anàlisis de varianza para la variable Diàmetro promedio de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	91

<b>CUADRO 39</b>	Prueba de Duncan para la variable Diámetro promedio de microtubérculos, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	92
<b>CUADRO 40</b>	Análisis de varianza para la variable Promedio de microtubérc. con brotes, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo	93
<b>CUADRO 41</b>	Prueba de Duncan para la variable Promedio de microtuberc. Con brotes, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo.	94
<b>CUADRO 42</b>	Resumen de los resultados obtenidos en las 5 variables de respuesta, clones Ictafrit y Loman en Tubos de cultivo.	95
<b>CUADRO 43A</b>	Datos originales Clon Ictafrit en recipientes Magenta en seis medios semisólidos microtuberizadores	107
<b>CUADRO 44A</b>	Datos originales Clon Loman en recipientes Magenta en seis medios semisólidos microtuberizadores	108
<b>CUADRO 45A</b>	Datos originales Clon Ictafrit en recipientes Gerber en seis medios semisólidos microtuberizadores	109
<b>CUADRO 46A</b>	Datos originales Clon Loman en recipientes Gerber en seis medios semisólidos microtuberizadores	109
<b>CUADRO 47A</b>	Datos originales Clon Ictafrit en recipientes Tubos de cultivo en seis medios semisólidos microtuberizadores	110
<b>CUADRO 48A</b>	Datos originales Clon Loman en recipientes Tubos de cultivo en seis medios semisólidos microtuberizadores	111
<b>CUADRO 49A</b>	Distribución de recipientes y explantes	112
<b>CUADRO 50A</b>	Distribución de medios (litros), clon Loman	112
<b>CUADRO 51A</b>	Distribución de medios (litros), clon Ictafrit	112
<b>CUADRO 52A</b>	Macronutrientes necesarios para una Solución Stock	113
<b>CUADRO 53A</b>	Micronutrientes necesarios para una Solución Stock	114
<b>CUADRO 54A</b>	Vitaminas y Myo-inositol para una Solución Stock	115

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Número de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Magentas	62
FIGURA 2	interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Peso de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Magentas	64
FIGURA 3	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable longitud de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Magentas	66
FIGURA 4	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable longitud de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Magentas	68
FIGURA 5	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable micro-Tubèrculos con brotes clones Ictafrit y Loman en Magentas	70
FIGURA 6	Relaciòn clon* medio de cultivo para la variable Peso de microtubèrculos, clones Ictafrit y Loman en Gerber	74
FIGURA 7	Relaciòn clon* medio de cultivo para la variable Número de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Gerber	76
FIGURA 8	Relaciòn clon* medio de cultivo para la variable Longitud de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Gerber	78
FIGURA 9	Relaciòn clon* medio de cultivo para la variable Diàmetro de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Gerber	80
FIGURA 10	Relaciòn clon* medio de cultivo para la variable micro-tubèrculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Gerber	82
FIGURA 11	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Diàmetro de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Tubos/cultivo	86
FIGURA 12	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Peso de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Tubos/cultivo	88
FIGURA 13	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Longitud de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Tubos/cultivo	90
FIGURA 14	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable Diàmetro de microtubèrculos clones Ictafrit y Loman en Tubos/cultivo	92
FIGURA 15	Interacciòn clon* medio de cultivo para la variable micro-tubèrculos con brotes, clones Ictafrit y Loman en Tubos/cultivo	94
FIGURA 16	Preparaciòn de medios de cultivo.	116
FIGURA 17	Fase de micropropagaciòn	117
FIGURA 18	Fase de microtuberizaciòn	118

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABA	Acido absìcico
AC	Agua de coco
Al	Aluminio
AG <sub>3</sub>	Acido giberélico
AIA	Acido Indolacético
AIB	Acido Indol-3-butírico
ANA	Acido Naftaleno acético
B	Boro
BAP	Bencilamino purina
B <sub>1</sub>	Tiamina
B <sub>3</sub>	Acido nicotínico
B <sub>5</sub>	Pantotenato de calcio
B <sub>6</sub>	Piridoxina
C	Carbono
CCC	Cloruro de colocolina/ Cholinechloride de Cycocel Basf
°C	Grado centigrado
Ca	Calcio
CIP	Centro Internacional de la Papa
Cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Anhídrido carbónico
Cu	Cobre
CH	Caseína hidrolizada
Fe	Hierro
g	Gramos
H	Hidrógeno
HCl	Acido Clorhídrico
H-S	Medio tuberizador desarrollado por Hussey y Stacey
I	Yodo
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

ABA	Acido absìcico
AC	Agua de coco
Al	Aluminio
AG <sub>3</sub>	Acido giberèlico
AIA	Acido Indolacètico
AIB	Acido Indol-3-butìrico
ANA	Acido Naftaleno acètico
B	Boro
BAP	Bencilamino purina
B <sub>1</sub>	Tiamina
B <sub>3</sub>	Acido nicotìnico
B <sub>5</sub>	Pantotenato de calcio
B <sub>6</sub>	Piridoxina
C	Carbono
CCC	Cloruro de colocolina/ Cholinechloride de Cycocel Basf
°C	Grado centigrado
Ca	Calcio
CIP	Centro Internacional de la Papa
Cm	Centimetros
CO <sub>2</sub>	Anhídrido carbònico
Cu	Cobre
CH	Caseina hidrolizada
Fe	Hierro
g	Gramos
H	Hidrògeno
HCl	Acido Clorhidrico
H-S	Medio tuberizador desarrollado por Hussey y Stacey
I	Yodo
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas

**EFFECTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y TIPOS DE RECIPIENTES  
EN LA TUBERIZACIÓN IN VITRO DE LA PAPA  
(Solanum tuberosum L.)**

**EFFECT OF CULTIVATION MEDIUM AND TYPES OF RECIPIENTES IN THE  
TUBERIZATION IN VITRO OF THE POTATO ( Solanum tuberosum )**

**RESUMEN**

La producción de papa en Guatemala es de primer orden, al igual que el maíz y el frijol forma parte de la dieta alimenticia de los guatemaltecos. El rendimiento nacional promedio puede considerarse bajo, si se compara con los rendimientos registrados en otros países donde se aplican métodos integrales de cultivo, debido a la degeneración de la semilla-tubérculo por enfermedades viróticas y bacteriales, al no existir planes ni programas de manejo integral del cultivo por parte del papicuitor guatemalteco, olvidando que después del suelo, la semilla constituye uno de los recursos más importantes.

La propagación in vitro y la tuberización in vitro permiten la producción de plantas y microtubérculos libres de enfermedades y bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y nivel de fitohormonas, por lo que la investigación realizada permitió identificar los protocolos más adecuados para la tuberización in vitro de la papa que inicialmente permitiera la obtención de microtubérculos libres de enfermedades y posteriormente incorporarlos a una fase de invernadero, para un programa de producción y certificación de semillas-tubérculos de papa.

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto de seis medios semisólidos: **W-H** desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu (1,982), **KIM** desarrollado por Kim Y.C. (1,982), **P-S** desarrollado por Palmer C.E y O.E Smith (1,969), **M-S**, medio desarrollado por Murashige y Skoog (1,962), **H-S** desarrollado por Hussey G. y Stacey (1,984) y el medio **KO**, desarrollado por Ken Okabe (1,998) y tres tipos de recipientes: Magentas, Gerber y Tubos de cultivo con densidades de siembra de 12, 5 y 1 explante de dos clones de papa: **Loman e Ictafrit** (con repeticiones de 12, 5 y 6 para un total de 2,676 explantes utilizados), en completa oscuridad, por sesenta días y temperatura de 21 °C.

Las variables de respuesta evaluadas fueron:

- 1) Número de microtubérculos
- 2) Peso de los microtubérculos (mg)
- 3) Longitud de los microtubérculos (mm)
- 4) Diámetro de los microtubérculos (mm) y
- 5) Microtubérculos con brotes.

Las principales conclusiones fueron:

- a) El experimento superó abundantemente las expectativas comparativas en relación a experimentos similares (11,43), donde en el mejor de los casos para un período de 4 meses, con otras composiciones de medios y clones; se obtuvo una

producción aproximada de 2.5 microtubérculos por cada 25 ml de medio tuberizador, en tanto que en la presente investigación:

Para el clon Loman y con el medio H-S en recipientes Magenta, se logró una producción de 151 microtuberculos en 1,200 mililitros de medio tuberizador (promedio de 3.15 microtubèrculos por cada 25 mililitros; es decir 31 microtubèrculos más de lo esperado).

Para el clon Ictafrit y con el medio H-S en recipientes Gerber, se tuvo una producción de 24 microtubèrculos en 150 mililitros de medio tuberizador (promedio de 4 microtubèrculos por cada 25 mililitros; es decir 9 microtubèrculos superior a lo esperado).

Para para el clon Ictafrit, los medios P-S y KIM, en tubos de cultivo; produjeron 12 microtubèrculos en 60 mililitros de medio tuberizador, es decir; se obtuvo un promedio de 5 microtubèrculos por cada 25 mililitros, lo que es lo mismo a decir que a través de esta investigación se obtuvo 6 microtubèrculos (50%), más de lo esperado.

- b) Los recipientes más adecuados para la producción *in vitro* de la papa, fueron los tubos cultivo para ambos clones, ya que los mismos, conteniendo 10 mililitros de medio tuberizador, permitieron la formación de hasta dos microtubérculos por explante, en la mayoría de los casos y el factor contaminación no fue significativo, de igual forma no se vieron afectados por hiperhidricidad causada por acumulación de etileno, factor determinante en la producción de microtubèrculos bajo una alta densidad de siembra y condiciones de poca ventilación con lo cual se favorece la formación de microtubèrculos con brotes, lo cual pudo observarse en recipientes Magenta, en los cuales la densidad de siembra fue de 16 explantes creciendo en 100 mililitros de medio tuberizador.
- c) La citocinina BAP tuvo relación directa en el proceso facilitador; influyendo específicamente sobre una microtuberización más acelerada, ya que se pudo comprobar, que los medios conteniendo diferentes concentraciones de BAP microtuberizaron rápidamente, específicamente 25 días posterior a la siembra.
- d) Se logró determinar, que a mayor concentración de sacarosa en el medio, se incrementó en mejor forma el porcentaje de tuberización y se incrementó el peso de los microtubèrculos y que las bajas concentraciones de sacarosa influyeron en gran medida inhibiendo el proceso tuberizador, aún con la presencia de cloruro de colocolina .

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de papa (*Solanum tuberosum* L.), en Guatemala es una actividad de primer orden; se siembran alrededor de 14,000 hectáreas anualmente, concentradas en regiones frías y templadas a altitudes que van de 1,500 msnm a 3,200 msnm. La producción nacional es de 140,000 toneladas métricas anuales, de las cuales 14,000 toneladas métricas son exportadas a Centro América y 126,000 toneladas métricas son consumidas en el mercado nacional (9,10,19).

Este cultivo ocupa el cuarto lugar en importancia y producción alimenticia a nivel mundial superado únicamente por los cultivos de trigo, arroz y maíz. Representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos; el producto llega a más de mil millones de consumidores de todo el mundo. La proteína de la papa posee un alto contenido de lisina, siendo de excelente calidad como elemento nutritivo siendo igual o mejor que la soya (22, 31,6).

La producción mundial de papa según estimaciones de la FAO para los años 1987-89 fue de 275 millones de toneladas, y para finales del siglo se esperaba un incremento de 312 millones de toneladas. En los países bajos, como Holanda para obtener papa de buena calidad para la exportación se aplican buenos e integrales métodos de cultivo, lo cual se ve reflejado en sus rendimientos de 40 a 45 toneladas métricas por hectárea (6,7,8).

En Guatemala la semilla tubérculo se ha ido degenerando paulatinamente, debido en gran medida a que por parte del papicultor, no existen planes ni programas de manejo integral del cultivo, lo cual ha incidido ostensiblemente en el apareamiento de enfermedades especialmente las viróticas y bacteriales, mismas que se encuentran diseminadas en los campos de cultivo (9,22,21).

La propagación in vitro y la tuberización in vitro permiten la producción de plantas y microtubérculos libres de enfermedades y bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y nivel de fitohormonas.

De esa cuenta la investigación realizada pretendió identificar los protocolos más adecuados para la tuberización in vitro de la papa, que inicialmente permitiría la obtención de microtubérculos libres de enfermedades que posteriormente pudieran ser trasladadas a una fase de invernadero para un programa de producción y certificación de semillas de papa, pudiendo en consecuencia el papicultor guatemalteco tener acceso a tubérculos semilla y poder aumentar su producción y la calidad de sus productos, ya que es preciso recordar que después del suelo, la semilla es uno de los recursos más importantes para obtener un alto rendimiento por unidad de superficie (9,22,21).

Para conseguir éste propósito se planteó inducir la microtuberización evaluando el efecto de seis medios semisólidos de cultivo: los medios **W-H**, desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ), **KIM** desarrollado por Kim Y.C. ( 1,982 ), **H-S**, desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), **P-S**, desarrollado por Palmer C.E y O.E. Smith ( 1,969 ), **M-S**, medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ) y el medio **KO**, desarrollado por Ken Okabe (1,998 ), éste último medio fue utilizado como testigo; además tres tipos de recipientes: Magentas, Gerber y Tubos de cultivo con densidades de siembra de 12, 5 y 1 explante de los clones Loman e Ictafrit, incubados en un cuarto de crecimiento, en completa oscuridad a una temperatura de 21<sup>0</sup>C por sesenta días. Se efectuó además el análisis de las variables de respuesta; número de microtubérculos, peso, longitud, diámetro y brotes de los microtubérculos.

El manejo del experimento consistió en cuatro (4) fases: a) Una fase de estandarización de medios, recipientes, densidad de siembra y repeticiones b) Una fase de ensayo o de pre-evaluación, cuyo propósito era determinar la consistencia de los medios, la respuesta de los clones y tiempo de incubación adecuado, elegido entre 60-90-100 días; por lo cual se utilizaron 3 repeticiones para clones y para medios c) Una fase de micropropagación, con el propósito de disponer de material suficiente y de un mismo período de crecimiento para la fase de tuberización d) La fase de microtuberización que consistió en la inducción de la tuberización a través de la evaluación de efectos de seis medios, tres recipientes y dos clones para la tuberización in vitro de la papa.

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (I.C.T.A.). En la investigación se utilizaron 3 diseños independientes de Bloques completamente al azar con arreglo ( 2\*6 ) combinatorio

- a) Para recipientes Magenta se utilizaron 12 repeticiones para clones y para medios, una unidad experimental lo constituyó una Magenta conteniendo 16 explantes creciendo en 100 ml de medio tuberizador (2,304 explantes en total).
- a) Para recipientes Gerber se utilizaron 5 repeticiones para clones y para medios, una unidad experimental lo constituyó un Gerber conteniendo 5 explantes creciendo en 30 ml de medio (300 explantes en total).
- b) Para Tubos de cultivo se utilizaron 6 repeticiones para clones y para medios, una unidad experimental lo constituyó un Tubo de cultivo creciendo en 10 ml de medio de cultivo (72 explantes en total).

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En Guatemala el cultivo de la papa es producido en los departamentos de Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Totonicapán, Sololá y Quiché, en el altiplano occidental; Chimaltenango y Guatemala, en el Altiplano Central; la montaña de Jalapa, en la parte Oriental; Alta y Baja Verapaz, en el Norte de la república ( 9 ).

Los productores de papa, son agricultores de subsistencia, por esa razón si este cultivo perdiera su valor comercial; el costo social que habría que pagar sería muy alto en términos de pobreza, posiblemente provocaría la migración de los agricultores a centros urbanos.

Actualmente el clon Loman constituye la semilla tubérculo de mayor demanda para la siembra, por su adaptabilidad hasta 2,500 msnm y por su aceptación culinaria al momento de su comercialización .

El rendimiento nacional promedio puede considerarse bajo, si se compara con los rendimientos registrados en otros países, donde las variedades más exitosas son aquellas que se cultivan en regiones con climas favorables en donde poseen programas de mejoramiento genético y recurren al vasto germoplasma de Solanum para desarrollar variedades mejor adaptadas a condiciones climáticas o biológicas particulares donde las diversas relaciones de la planta con su ambiente no significan limitaciones a la producción y se superan por medio del manipuleo genético alcanzando rendimientos de 40-60 toneladas métricas ( 19,22,26,46)

Dentro de este contexto la producción de tubérculos libres de virosis, constituye el impacto potencial de una biotecnología apropiada a la producción agrícola vegetal, orientada a proveer salidas alternativas a los problemas agrícolas ( 7,9,37 ).

En esta investigación y utilizando los clones: LOMAN e ICTAFRIT, materiales enviados del CIP para el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) se pretende evaluar una serie de medios basales para poder establecer los protocolos para la micropropagación y la microtuberización, lo cual permitirá obtener tubérculos en cualquier estación del año y realizar la siembra en la fecha óptima de la plantación evitando con ello los picos productivos que se presentan en la producción de vitroplantas .

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1 CULTIVO in vitro

Pierik (1987) define cultivo in vitro de plantas superiores como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

El término cultivo in vitro es un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, in vitro quiere decir "dentro de vidrio", es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado (7,26,4).

Existen otros términos cuyo significado se solapa parcialmente con el significado de cultivo in vitro:

- **Cultivo de tejidos vegetales:** se refiere al cultivo in vitro de partes de la planta (tejidos o frecuentemente órganos).
- **Micropropagación:** se usa para referirse a la utilización de las técnicas de cultivo in vitro aplicadas a la propagación vegetativa de plantas.

##### 3.1.1.1 TIPOS DE CULTIVO in vitro

El material vegetal con el que se inicia un cultivo in vitro puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos de tallo, raíz, hoja, meristemas, embriones, es decir, tejidos somáticos, pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, microesporas, óvulos, etc. Según sea el explante utilizado se hablará de cultivo de secciones nodales, cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc. (28,41).

Las condiciones de cultivo pueden pretender la proliferación desorganizada de las células del explante hasta dar lugar a un callo o incluso a un cultivo de células cuando se separan éstas del callo. Si se elimina la pared celular de las células se obtiene un cultivo de protoplastos. En otros casos se puede pretender la regeneración de la planta completa (morfogénesis) mediante la formación de raíces (rizogénesis) y/o de tallos. La morfogénesis se produce a partir del explante inicial mediante la formación de raíces y/o tallos en posición normal o en posición no normal

(adventicias/os). Sí la morfogénesis se produce después de la formación de un callo, entonces se habla de morfogénesis indirecta, mientras que si se produce directamente del explante sin que este pase por una fase de callo, entonces se habla de morfogénesis directa (4,27,39,6).

Una situación particular surge cuando en el explante se producen unas estructuras bipolares que presentan las propiedades morfológicas de los embriones zigóticos. Estas estructuras se denominan embriones somáticos. Según que estos embriones somáticos surjan directamente del explante o bien de un callo se habla de embriogénesis directa o indirecta, respectivamente

### 3. 1.1.2 Requerimientos nutritivos para un crecimiento in vitro

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento in vitro óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener (27,41).

**Cuadro 1 Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos**

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	Elementos	
Azúcares	N	Fe
Aminoácidos	P	Zn
Auxinas	K	B
Citoquininas	Ca	Mn
Giberelinas	Mg	Cu
Acido abscisico	S	Ni
		Co
		Al
		Mo
		I
<b>Mezclas de sustancias poco definidas:</b>		
Extracto de levadura		
Leche de coco		
Extractos vegetales		
Hidrolizados de caseína		
Peptona y triptona		

Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones para los medios de cultivo. El medio M-S o de Murashige y Skoog (1,962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas, existen numerosas variaciones comerciales de este medio.

El medio B5 o de Gamborg et al. (1,968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en la regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios M-S y B5 es la menor concentración de nitratos en el medio B5. El medio WPM (1,980), de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (23,3,41,44).

### 3.1.2 Cultivo de Meristemas

Es el cultivo *in vitro* del domo apical (meristemo apical que como media mide 100x100 µm) más los primeros primordios foliares

El cultivo de meristemas es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma.

La razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan los virus que van contaminando a la planta. Existen otros factores:

- El meristemo apical tiene una mayor velocidad de crecimiento y en consecuencia el virus "no alcanza" al meristemo.
- En una célula meristemática el virus tiene mayor dificultad de acoplamiento con los ribosomas, debido a que éstas células tienen un código de trabajo muy definido.
- Existe una competencia por uso de algunos metabolitos entre células y virus. (23, 41)

El tamaño óptimo a utilizar se decide tomando en cuenta dos factores: tamaño óptimo para la liberación del virus y tamaño óptimo para facilitar el cultivo. Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus si sólo se aísla el meristemo, pero la posibilidad de que el meristemo sobreviva sin primordios foliares es muy pequeña. Por otro lado, utilizar meristemas más grandes (con más primordios foliares) hace que la probabilidad de obtener plantas libres de virus sea pequeña.

De manera general se puede decir que los meristemas apicales tienen más probabilidad de estar libres de virus que los meristemas axilares, y que si los meristemas provienen de una planta en plena actividad hay mayor probabilidad de obtener plantas libres de virus,

reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el biotopo de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados.

Cuando no se realiza un estudio con todo el ser vivo sino con solo una parte de él (explante) a la dificultad de reproducir las condiciones naturales se debe añadir la dificultad de suministrar a la parte todo aquello que antes obtenía del sistema completo.

En resumen el cultivo *in vitro* de plantas superiores es una técnica que exige un control absoluto del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Conviene por tanto conocer cuales son los principales factores que conforman el ambiente del explante y que deberán ser controlados.

Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectarán al desarrollo del cultivo *in vitro* (41,17,18).

### 3.1.3 El ambiente químico en los cultivos

#### 3.1.3.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones (28,4, 16).

Las combinaciones de las tres concentraciones de cada grupo producen un total de  $3^4 = 81$  medios diferentes, de los que se elige el óptimo. A partir de aquí se puede ir afinando las concentraciones tanto como se crea conveniente: si por ejemplo, en el primer experimento la concentración de auxina óptima fue de  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ , la siguiente serie de auxina que se deberá probar será:  $0.05 - 0.1 - 0.3 - 0.5 - 0.8 - 1.5 \text{ mg l}^{-1}$ .

#### 3.1.3.2 Los medios de cultivo y sus componentes

Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo *in vitro* de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no solo sus componentes sino su preparación.

En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contienen entre 15 y 32 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes, minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento, compuestos orgánicos naturales, agentes gelificantes (en el caso de los medios semisólidos).

### 3.1.3.3 Preparación del medio de cultivo

Es necesario preparar el medio de cultivo en agua bidestilada o agua desmineralizada destilada. Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas para su preparación deben de ser de un alto grado de pureza.

El procedimiento para la preparación de los medios dependerá: del tipo de medio, de su consistencia y de la presencia de componentes termolábiles. En general, se puede distinguir los siguientes tipos:

- Medios semisólidos sin sustancias termolábiles
- Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles.
- Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles. (27, 41, 34, 28)

### 3.1.3.4 Condiciones Ambientales para la Incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refieren a la luz y a la temperatura. Las respuestas morfogenéticas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación, así como, por la calidad, intensidad y duración de luz.

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (tipo "luz de día") y lámparas incandescentes (tipo "bombillas 100 watts"), que brinden entre 1,000 y 4,000 lux de iluminación, recientemente se han estado utilizando lámparas especiales tipo "grow-green" y "agro-light", que proporcionan una longitud de onda de mejor calidad (450 -500  $\mu\text{m}$ ), para los explantes, pero su uso no es generalizado. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad existiendo algunas variantes como 12 horas por 12 horas, o 18 horas por 6 horas. En general, temperaturas entre 25 - 28 °C son adecuados para el establecimiento de los cultivos, con una humedad relativa entre 70 a 80% (27,1,25).

### 3.1.3.5 Medio sólido

Medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La dureza del medio depende

principalmente de dos factores:

- **pH:** es necesario un pH de 3.5 – 4.0 como mínimo para que el gelificante actúe; a pH menor de 3.5 el medio se puede licuar. Hay que tener en cuenta que después del autoclavado el pH baja en promedio medio punto y que sigue bajando durante el cultivo.
- **Composición química del medio:** algunos gelificantes (p.e. Gelrite) solidifican en presencia de iones divalentes, por lo que si el medio a utilizar es bajo en sales puede resultar conveniente añadir una cierta concentración de un ión divalente.

### 3.1.3.6 Agentes solidificantes

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de "soporte" para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- a) Con agua el agar forma geles que se derriten a 100 °C y se solidifican a 45 °C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b) El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c) El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- d) No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar, sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el "Gelrite". Debido a que el agar tiene un costo económico más alto, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte.

Los gelificantes más usados en el cultivo *in vitro* son:

- a) **Agar** : es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. La planta no puede digerirlo ni adsorberlo, además no interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100 °C), solidifica alrededor de los 40 °C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0.6 - 1%. El principal problema con este gelificante es su elevado costo.
- b) **Gelrite** : es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar. Se puede usar a una concentración de 0,15-0,30%. Los geles de gelrite son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente. El costo de la gelrite es menor que el del agar. (17, 26, 27, 11, 38).

### 3.1.3.7 Medio Líquido

Medio líquido es aquel en el que la solución de nutrientes y reguladores no ha sido solidificada por la adición de ningún agente gelificante. El uso de medio líquido ofrece las siguientes ventajas e inconvenientes respecto al uso de medio sólido:

- a) Facilita la absorción de nutrientes por parte del explante.
- b) Es más fácil la manipulación para cambiar medios.
- c) Cualquier exudado de la planta se diluye con mayor facilidad.
- d) Se puede utilizar como medio puente para agregar algún compuesto en una determinada etapa del cultivo en medio sólido.
- e) Existen algunas especies que crecen mal en medio líquido.
- f) Si resulta posible el cultivo en medio líquido, se debe considerar el problema de la aireación. Se puede cultivar el explante parcialmente sumergido y si se necesita una inmersión total se debe utilizar agitador. (1, 26,27)

### 3.1.3. 8 Vitaminas

La mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades infraóptimas. Para lograr un buen crecimiento es necesario a menudo suplementar al medio con una o más vitaminas. La tiamina (B<sub>1</sub>) es la que más se utiliza y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro*, como son: pirodoxina (B<sub>6</sub>), ácido nicotínico (B<sub>3</sub>), pantotenato cálcico (B<sub>5</sub>).

Las plantas verdes se consideraban normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la pirodoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria. Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades.

Las vitaminas más empleadas son:

- a) **Tiamina** (vitamina B<sub>1</sub>) se añade como tiamina HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.
- b) **Acido nicotínico (niacina), pirodoxina (vitamina B<sub>6</sub>): Se añade como pirodoxina-HCl.**  
**Mio-inositol:** no es propiamente una vitamina, sino un azúcar alcohol. Tiene un efecto

estimulante sobre la morfogénesis, partiendo probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.

- c) **Acido pantoténico:** ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.
- d) **Acido fólico:** disminuye la proliferación del tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzóico.
- e) **Riboflavina:** es inhibidor del crecimiento de raíces.
- f) **Vitamina E:** ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células (24, 14,15).

### 3.1.3.9 Sales inorgánicas

Los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el magnesio es parte de la molécula de clorofila, el calcio es constituyente de la pared celular, el nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el hierro, zinc y molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del C, H y O se conocen otros 12 elementos esenciales para el crecimiento de la planta: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno. Los 6 primeros son requeridos en cantidades relativamente grandes y se conoce como macroelementos, los seis últimos son requeridos en cantidades pequeñas (<de 0.5 mmol l<sup>-1</sup>) y se les denomina microelementos.

Cuando se elige una mezcla de macro y micro sales, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- a) La concentración total de sales puede ser importante. Existen medios "ricos" en sales (p.e. MS) y medios "pobres" en sales (p.e. White).
- b) La forma más frecuente de añadir nitrógeno (N) es en forma de iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Las necesidades totales de N, varían entre 12 - 60 mmol l<sup>-1</sup>. La mayor parte de las plantas prefieren el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> al NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

### 3.1.3.10

### Reguladores de crecimiento

Adicionalmente a los nutrientes, generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos. Por otro lado, los

requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo in vitro.

#### 3.1.3.10.1 Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros.

En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El AIB y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio ( 15,41,45 ).

#### 3.1.3.10.2 Citoquininas

Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo in vitro, se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), quinetina y 2-ip (isopentenil-adenina).

Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio ( 46).

#### 3.1.3.10.3 Giberelinas

Existen multitud de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el AG<sub>3</sub>, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor (pierde el 90% de su actividad después del autoclaveado).

Comparado con las auxinas y citoquininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales.

El AG<sub>3</sub> es soluble en agua fría hasta 1000 mg l<sup>-1</sup>.

#### 3.1.3.10.4 Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos in vitro, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular ( 41,27 ).

### 3.1.3.10.5 Aminoácidos

Aunque las células cultivadas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios, la adición de L-glutamina (2 - 8 mM) o una mezcla de aminoácidos es a menudo beneficiosa. Esto es particularmente importante en cultivo de células y protoplastos.

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor (1,28).

### 3.1.3.10.6 Carbohidratos

Normalmente para el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, debido a que el crecimiento *in vitro* tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1 - 6% de sacarosa en el medio, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. El azúcar blanco refinado que se vende en los supermercados puede resultar adecuado para la micropropagación en muchos casos. Se trata de un producto purificado y de acuerdo con los análisis se compone de 99.94% de sacarosa, 0.02% de agua y 0.04% de otras sustancias (no hay indicaciones de que estos últimos constituyentes puedan causar toxicidad *in vitro*) (1,27).

### 3.1.3.10.7 Agua

El agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada, de cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final. (1,27)

### 3.1.3.11 Suplementos no definidos

Algunos de los suplementos utilizados son:

- a) Levadura y extracto de malta: la levadura y el extracto de malta de cebada generalmente se suministran en concentraciones respectivas de 0.5% - 1% v/v. Estas dos sustancias se pueden considerar también como buenas fuentes de nitrógeno reducido, de precursores potenciales de las adenilcitoscininas e incluso de las mismas adenil-citoscininas.
- b) Agua de coco: un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco (AC), a niveles relativamente bajos (50% -10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por si sola era ineficiente.

El uso del AC y de 2,4-D en tubérculos de papa (Steward et al 1951) y del C y ANA por Morel et al. (1951) en las monocotiledóneas, fueron otros progresos importantes (16.27).

El agua de coco (AC) es un medio muy complejo con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el AC es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene son indispensables y se pueden reemplazar por un medio salino basal. El contenido de azúcar de alrededor de 2.5% no es algo fuera de lo común y se puede reemplazar (se ha identificado sustitutos como glucosa, fructosa, sacarosa y otros azúcares). Adicionalmente se encuentra en ella nitrógeno no proteínico soluble en forma de aminoácidos

- c) Caseína hidrolizada (CH): la CH digerida enzimáticamente se ha utilizado de forma rutinaria como un suplemento de medios de cultivo para plantas (Steward et al., 1954); se prefiere esta caseína porque la hidrólisis ácida destruye el triptófano presente en la sustancia
- d) Antioxidantes, como el ácido ascórbico, y absorbentes como el carbón activado

### 3.1.4 pH

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes, se procede a ajustar el pH final al valor deseado, añadiendo NaOH 0.1 N o HCl 0.1N al medio. Una vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio. El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones:

- Valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos.
- Si la evolución del pH del medio lo hace bajar por debajo de 3.5 se puede producir su licuación.
- El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo.
- El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (p.e. la absorción de iones  $\text{NO}_3^-$  aumenta con la acidez del medio)
- El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas.

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general, no obstante, en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8. Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para, después, evolucionar nuevamente durante el curso del cultivo, de forma que habitualmente se irá acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del explante.

El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. A pesar de su importancia, en muchos experimentos este control se limita a fijar su valor inicial sin reparar en los posibles efectos de su dinámica. (1, 16,27,3,38).

### 3.1.5 El ambiente físico en los cultivos *in vitro*

#### 3.1.5.1 La Temperatura

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado *in vitro* afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo.

Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperíodo, etc.

Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura óptima de crecimiento y otros factores como la luz, la composición del medio (p.e: en algunos casos se ha comprobado que se obtiene mayor rendimiento haciendo fluctuar la temperatura según el fotoperíodo).

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 °C y 28 °C.

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5°C) permiten superar los periodos de dormancia de algunas especies leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20 °C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas ( 36,41,37 ).

Los resultados de experimentaciones muestran que el incremento diario del peso de los microtubérculos es mayor a temperaturas relativamente bajas ( 19-22 °C ) Wang et al 1,990.

Aunque el crecimiento *in vitro*, se da entre los 20 y 22 °C, para la iniciación del proceso es conveniente disminuir la temperatura, por esto se opta por incubar las plantas entre 18 y 19°C en el día y +/- 1°C menos en la noche, el rango de temperatura empleado se considera normal. Las bajas temperaturas ( 15-20 °C) promueven la formación de microtubérculos en ausencia de citoquininas, al igual que las altas temperaturas ( 20-25 °C ) con presencia de ella. Palmer y Smith, 1969 ( 41,1,37 ).

Por otro lado, el desarrollo de los tubérculos es óptimo con patrones de altas temperaturas durante las etapas tempranas del crecimiento y con bajas temperaturas durante las etapas posteriores. Cao y Tibbitts, 1,994 .

No obstante, el exceso de temperatura puede ser negativo, cuando los explantes utilizados son bastante jóvenes, pues en la edad temprana de las plantas, éstas tienen mayor capacidad

para incrementar los niveles endógenos de giberelinas en las yemas axilares, que como ya es conocido inhiben el proceso .

### 3.1.5.1.1 Control de la temperatura

La temperatura de la cámara de cultivo viene afectada por: la temperatura ambiente de la sala donde se sitúe y el calor generado por las fuentes de luz de que dispone.

El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo *in vitro* se efectúa mediante un sistema de refrigeración - calefacción controlado a través de un termostato. El sistema de refrigeración - calefacción debe estar correctamente dimensionado a fin de conseguir que la temperatura de la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados.

Para poder caracterizar adecuadamente el funcionamiento respecto de la temperatura de una cámara de cultivo conviene conocer:

- La homogeneidad de temperatura: es decir la variación de la temperatura en diferentes zonas de la cámara. Se puede aumentar la homogeneidad haciendo circular el aire dentro de la cámara mediante un sistema de ventilación
- La estabilidad de la temperatura: es decir, una medida de la variación de la temperatura de la cámara de cultivo a lo largo del tiempo .

Todas las cámaras disponen de un programador que permite regular la temperatura a la que está la cámara en cada momento. (26, 35,33)

### 3.1.5.1.2 Control de la iluminación.

Las cámaras de cultivo disponen de una serie de unidades productoras de luz situadas de tal forma que iluminen toda la superficie útil de la cámara. Las unidades productoras de luz acostumbran a ser fluorescentes y pueden estar situadas de formas distintas:

**Horizontales:** las baterías fluorescentes se colocan sobre el techo de cada área de cultivo. Este sistema tiene la ventaja de que consigue una distribución más uniforme de la luz en toda el área, pero tiene el inconveniente de que calienta el techo y éste suele ser, a la vez, la base de otro nivel de cultivo, por lo cual puede dar lugar a una distribución irregular de la temperatura.

**Verticales:** las baterías fluorescentes se colocan en los laterales de la cámara de cultivo, de forma que producen una distribución más irregular de la luz en el área de cultivo, pero generan menos problemas en la distribución del calor.

### 3.1.5.1.3 La luz

La luz, definida como una forma de energía radiante que se nos manifiesta mediante la visión es, en realidad, parte de un fenómeno físico más amplio: la energía radiante (radiación), que puede ser descrito según dos modelos diferentes: el modelo ondulatorio (radiación electromagnética) y el modelo corpuscular.

Los diferentes tipos de radiación electromagnética se pueden clasificar según sea su longitud de onda, así podemos obtener un espectro electromagnético formado por las diferentes longitudes de onda de la radiación electromagnética, que van desde los  $10^{-16}$  m hasta los  $10^4$  m. De todas estas longitudes de onda sólo las comprendidas entre 380 y 775 nm pueden ser percibidas por el ojo humano; ese conjunto de radiaciones es el que denominamos luz en el lenguaje coloquial.

Como quiera que sólo una parte de la energía radiante (la luz y algunas de las radiaciones infrarrojas y ultravioletas próximas) tiene influencia conocida sobre el desarrollo de las plantas, a veces, se usa el término luz para referirse a ese conjunto de radiaciones cuando en realidad se refiere al conjunto de radiaciones electromagnéticas con efectos fisiológicos.

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos in vitro.

Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos in vitro son:

- La cantidad de luz: **la irradiación**.
- Calidad de la luz: **el espectro**.
- La alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad: **el fotoperíodo** (26, 23, 16)

### 3.1.5.1.4 La Irradiación

La cantidad de luz que incide sobre las superficies fotosintéticas de las plantas determinará en gran medida la capacidad fotosintética de éstas. Esta cantidad de luz puede ser medida de formas diversas, bien midiendo la iluminación de una superficie y expresándola en lux (en realidad se trata de una unidad definida en términos de percepción del ojo humano); o bien midiendo la irradiación, es decir, la energía radiante que llega a una superficie dada en un intervalo de tiempo. La irradiación puede ser expresada en función de la energía:  $\text{Wm}^{-2}$ ; o en función de los fotones:  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Cuando el sensor del equipo con el que se mide la irradiación está diseñado para detectar solo las longitudes de onda comprendidas entre 400 y 700 nm, obtenemos una medida de la radiación fotosintéticamente activa (PAR).

Se asume que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vitro*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica. Además, una irradiación excesiva produciría un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo debido al efecto invernadero.

La irradiación habitual en el campo (a plena insolación puede llegar a  $450 \text{ W m}^{-2}$ ) es nociva en condiciones *in vitro*. Es habitual usar irradiaciones mucho menores (un 10% o incluso menos del valor de plena insolación) ( 41).

#### 3.1.5.1.5 El Espectro

La luz es esencial para las plantas debido a que proporciona la energía necesaria para la fotosíntesis. La clorofila y los demás pigmentos fotosintéticos captan la energía contenida en diferentes radiaciones para incorporarla a las diversas reacciones químicas que constituyen el proceso.

Pero la luz también puede intervenir en otros procesos fisiológicos, como el fototropismo, la germinación, la floración, etc.

Todos estos fenómenos no son producidos en igual medida por todos los tipos de luz (radiaciones de cualquier longitud de onda) sino que algunas radiaciones concretas tienen un efecto notable mientras que otras tienen poco o ningún efecto.

Es por ello que es preciso conocer el espectro de la radiación que es activo en el proceso fisiológico estudiado. La cámara de cultivo deberá reproducir lo mejor posible ese espectro de luz activo, por lo tanto conviene conocer cual es el espectro que emiten nuestras fuentes de luz y en que medida se adapta éste a las necesidades de nuestro cultivo.

---

**Cuadro 2** Principales fuentes de luz usadas en las cámaras de cultivo.

<b>LAMPARAS INCANDESCENTES</b>	Producen la luz por fenómenos de incandescencia del filamento calentado por el paso de la corriente eléctrica. Buena parte del espectro se halla en la zona del rojo/rojo lejano. Producen gran cantidad de calor y mucho consumo de electricidad.
<b>LAMPARAS FLUORESCENTES</b>	Producen la luz por fenómenos de fluorescencia del gas sometido a un arco voltáico. El espectro de la luz producida es rico en la zona del azul, existen fluorescentes especiales con un espectro rico en la zona azul y roja. Consumen menos electricidad.
<b>LAMPARAS DE VAPOR DE MERCURIO Y SODIO</b>	Producen la luz por efecto del paso de la corriente eléctrica a través de gases calientes de mercurio (azul y verde) y sodio (naranja). Son altamente eficientes en el consumo de electricidad.

De todas ellas, son los fluorescentes las fuentes de luz más usada en las cámaras de cultivo, aunque también se pueden encontrar, generalmente en instalaciones industriales, lámparas de vapor. (41)

#### 3.1.5.1.6 El fotoperíodo

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización etc) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo *in vivo* será también el mejor fotoperíodo *in vitro*.

#### 3.1.6 Principios generales de la propagación *in vitro*.

El cultivo de tejido *in vitro* comprende en su amplia aceptación un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante, (parte separada de un vegetal, por ejemplo protoplastos, células, tejidos u órganos), se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba bajo condiciones ambientales controladas. Dentro de esta amplia aceptación se considera características comunes en el establecimiento de los cultivos *in vitro* como las siguientes:

- a. Explantes
- b. Normas de asepsia
- c. Medios de cultivo y,
- d. Condiciones ambientales de incubación.

La interacción de estos factores determinará el tipo de respuestas, positivas o negativas, que se pueden obtener del cultivo *in vitro*.

- 1) **Explante:** puede definirse como una porción separada de un vegetal, esta porción puede ser tan pequeña (5 - 100 u) que sólo contenga algunos protoplastos o células o puede ser un poco más grande (1 -10mm), abarcando una porción de tejido u órgano, Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas, se pueden emplear potencialmente para obtención directa o para la obtención de grupos celulares amorfos (que comúnmente se le denomina callo). Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemos caulinares, hojas entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos.

El tipo de explante se seleccionará por razones prácticas, como: disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta al cultivo *in vitro*. La elección de un explante apropiado se complica, si se pretende la regeneración de plantas completas a partir de callos.

Existe un tamaño mínimo del explante variable, según el material vegetal, por debajo del cual no se obtiene proliferación celular u otras respuestas deseables, el cultivo de explantes muy pequeños requiere de medios más complejos o de los denominados "MEDIOS ACONDICIONADOS" (1, 41, 33, 27)

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, entre estos factores están: la época del año en que realizan los cultivos, las condiciones de crecimiento de las plantas donantes y los pre-tratamientos que se realizan a los explantes.

- 2) **La Asepsia:** evitar las contaminaciones con patógenos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su posterior incubación y manipulación.

Para establecer cultivos *in vitro* asépticos es conveniente tomar en cuenta lo siguiente

- Trabajar en ambientes adecuados.
- Esterilizar los medios de cultivo.
- Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos.
- Realizar las disecciones y transferencias en ambientes controlados estériles .

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden usar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el uso de "etanol" al 70% v/v y de hipoclorito de sodio, del 1 al 3% v/v.

En algunos casos resulta útil agregar un agente tenso activo, por ejemplo, Twen-20 al 0.01 - 0.1% v/v pero puede ser innecesario y los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol, es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante (80 a 150 rpm).

Por asepsia en el establecimiento y posterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de transferencia.

Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara de transferencia, con etanol al 70% igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril antes de introducirlos a la cámara de transferencia.

Es necesario que las manos y eventualmente los antebrazos del operador, sean desinfectados con etanol al 70% el uso de las mascarillas no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujo laminar de aire estéril. (41, 27, 14, 1 )

- a) Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol al 95%, el material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (caja Petrie) debe estar esterilizado.
- b) Realizar las operaciones de transferencia a disección lo más cerca posible a la llama de un mechero, evitando exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en un recipiente abierto.

### 3.1.7 Micropropagación

Micropropagar es el proceso de multiplicar plantas *in vitro*. A través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, es posible obtener poblaciones uniformes en condiciones de asepsia.

Este proceso incluye varias fases:

- **FASE 0:** preparación de la planta madre
- **FASE I:** establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia
- **FASE II:** multiplicación de brotes
- **FASE III:** enraizamiento
- **FASE IV:** aclimatación

- **FASE 0: preparación de la planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses, en un invernadero, en que se va a intentar cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición, del fotoperíodo y de la irradiación recibida.

- **FASE I: establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia**

Una vez escogida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes.

Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia.

Ya en condiciones de asepsia (se trabajará en cámaras de flujo laminar) se extraerán los explantes del material vegetal y se pondrán en cultivo en un medio de iniciación dentro de un tubo de cultivo, para poder controlar la sanidad y la viabilidad de los explantes (41,1,25,27).

- **FASE II: multiplicación de los brotes**

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la FASE I originan brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos.

Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar.

- **FASE III: elección de un medio de enraizamiento de los explantes para enraizar los explantes**

se utilizan principalmente dos métodos:

- **ENRAIZAMIENTO *in vitro***

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que

éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis.

- **ENRAIZAMIENTO *ex vitro***

Los explantes se deben transferir a un sustrato limpio, aunque no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita.

Con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse.

Los explantes deben de plantarse en contenedores cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en el laboratorio, o ponerlos en "multipots" dentro de un invernadero en un área sombreada con "fog-system" o "mist-system".

- **FASE IV: aclimatación de los explantes enraizados**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación.

Tanto si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. (41, 1, 27)

### 3.1.8 Cámaras de cultivo

Una cámara de cultivo es un receptáculo diseñado para permitir el control de algunas variables del ambiente físico. Habitualmente se pueden controlar la temperatura, la iluminación y el fotoperíodo y en algunos casos, menos frecuentes, la humedad del aire y su composición. Existen muchos modelos de cámaras de cultivo, en unos casos se trata de espacios reducidos,

frecuentemente móviles, mientras que en otros casos son verdaderos recintos acondicionados para permitir el control del ambiente interior.

### 3.1.9 Cámara de flujo laminar

Buena parte de las manipulaciones propias del cultivo *in vitro* deben realizarse en condiciones de esterilidad total para evitar la contaminación de los cultivos. Para disponer de una superficie de trabajo estéril que no ponga en peligro la esterilidad de los cultivos se usan las cámaras de flujo laminar.

Una cámara de flujo laminar es un receptáculo en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo. La esterilidad de la zona de trabajo se consigue porque se hace circular a través del interior de la cámara una corriente de aire que previamente ha sido microfiltrada para eliminar toda partícula extraña. Para evitar que el aire del exterior pueda entrar en la cámara de flujo sin pasar previamente por los filtros se procura que la presión interior sea ligeramente superior a la presión exterior, con lo cual el aire siempre circula de dentro hacia fuera y nunca al revés.

Según el grado de sofisticación de la cámara, puede disponer de elementos accesorios como son: fuente de luz, lámpara de esterilización por luz ultravioleta, pilotos indicadores de funcionamiento diversos, contador de horas de funcionamiento, indicador de presión interior, etc.

Existen dos tipos de cámaras de flujo laminar según sea la forma en la que se hace circular el aire: cámaras de flujo horizontal y cámaras de flujo vertical. En las primeras el flujo se produce desde el fondo de la cámara hasta el frente, de forma que las partículas se mueven horizontalmente a la superficie de trabajo. En las segundas, el flujo se produce desde el techo hacia la superficie de trabajo de forma que las partículas se mueven perpendicularmente a ella.

(41)

### 3.1.10 La esterilización de utensilios y medios

La esterilización, tanto del material y medios frescos, como de los medios ya usados que haya sufrido contaminación, es un proceso esencial en todo laboratorio de cultivo *in vitro*. Esta esterilización suele efectuarse con calor húmedo en unos aparatos denominados autoclaves. En situaciones especiales, como en el caso de que algún componente del medio sea termolábil, puede usarse un sistema de esterilización por filtración.

### 3.1.11 El autoclave

El autoclave es un instrumento habitual en los laboratorios de cultivo *in vitro*. En esencia, un autoclave es un recipiente en el que se consigue exponer el material a esterilizar a temperaturas superiores a la de ebullición del agua, gracias a aumentar la presión. (41,37,34)

- **FASE DE ESTERILIZACIÓN.** Una vez cerrada la válvula de purgado y alcanzada la temperatura de esterilización previamente seleccionada se inicia el proceso de esterilización.
- **FASE DE DESCARGA.** Terminado el proceso de esterilización, deja de funcionar la resistencia calefactora, con lo que deja de producirse vapor y la presión y temperatura del calderín empiezan a bajar poco a poco. Hay que tener en cuenta algunas normas para una correcta esterilización del material:
- Para que la esterilización de medios de cultivo sea eficaz, la temperatura y el tiempo seleccionados deben alcanzarse en todo el líquido. Como quiera que la transmisión del calor en el líquido de los recipientes se realiza de fuera hacia dentro, es evidente que la eficacia del proceso dependerá del volumen de líquido. En general, no conviene esterilizar juntos recipientes grandes y pequeños. En todo caso la selección de la temperatura y tiempo se efectuará según sea el volumen de los recipientes
- Los recipientes con cierre hermético deben ser introducidos en el autoclave sin cerrar totalmente el tapón, para facilitar la entrada del vapor durante el proceso. Al vaciar el autoclave después de la esterilización procederemos a cerrar totalmente estos recipientes.
- Los recipientes vacíos precisan de un tiempo de esterilización mayor que los recipientes con líquido en su interior. (41,35,1)

### 3.1.12 Ventajas de la Micropropagación

La micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en plantas ornamentales y aún en leñosas. La metodología de la micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales: (1, 14)

- A) Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo: un explante teóricamente puede producir un infinito número de plantas es por esta razón que se necesitan muy pocas plantas de donde tomar los explantes que producirán miles de plantas.
- B) Ahorro y garantía de espacio: un espacio reducido permite mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo por área disponible. Permite hacer uso del área vertical, acumulando varios niveles para el efecto a bajo costo y en un tiempo económicamente costeable.
- C) Reducción del tiempo de multiplicación.
- D) Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos, debido a las condiciones asépticas en que se tienen los explantes están libres de contaminantes por lo que se cuenta con material que tiene la capacidad de someterse a las pruebas más rigurosos de cuarentena permitiendo transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- E) Disponibilidad inmediata y permanente del material: permite el acceso oportuno en épocas en que las condiciones del campo no son adecuadas con la posibilidad además de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos. (6, 24, 27, 6, 30)

### 3.1.13 Desventajas de la micropropagación.

Las desventajas están basadas en los altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorios, la necesidad de tener mano de obra calificada, la falta de presión de selección de los materiales con que se cuenta y la pérdida de variabilidad que para algunas técnicas no es posible evitar.

En el cultivo de meristemos la planta no queda inmune al virus, al regresar al campo puede contaminarse de nuevo, por lo que si se quiere erradicar completamente el virus debe de establecerse un programa de renovación de material cada cierto tiempo. Además de que no todas las plantas pueden cultivarse por medio de meristemos, esto debido a que no conocen detalladamente sus requerimientos nutricionales ( 4,24,40,4).

Las plantas obtenidas por medio de estas técnicas tienen una estrecha base genética, lo que las hace vulnerables a plagas, enfermedades y estrés. En virtud de que los medios de cultivo en

el proceso de propagación contienen reguladores de crecimiento, se han encontrado casos de inestabilidad genética, principalmente en medios de altas concentraciones de reguladores de crecimiento (4,24,40,4)

### 3.1.14 La tuberización

En la producción de tubérculos se dan una serie de procesos anatómicos y bioquímicos que determinan la expresión del tubérculo formado. Los procesos anatómicos se basan básicamente en el ensanchamiento de las células de la médula, el incremento en la tasa de división celular en la zona subapical y el elevamiento en grosor y división celular del corte.

Los procesos bioquímicos están relacionados con el incremento de almidón, elevada acumulación de patatina y aumento en la síntesis de antocianinas en las células sub-epidérmicas, los procesos mencionados están influenciados por una serie de factores que pueden ser externos o internos (31,41,8).

Los procesos externos que favorecen la tuberización son: fotoperíodo corto, intensidad de luz, temperatura, déficit de agua (stress de agua) cantidad de fertilización nitrogenada, así como la cantidad de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>). Los factores internos no están bien definidos pero básicamente están relacionados con la edad fisiológica del estolón necesitándose ocho nudos mínimos para poder inducir la formación de tubérculos.

La translocación de hormonas tales como las citocininas favorece la tuberización contrariamente al ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) que la inhibe.

A diferencia de otros cultivos alimenticios, la parte económicamente más importante en la papa, es un tejido somático: el tubérculo que es un tallo modificado que ha sido diferenciado para constituirse en un órgano de reserva de almidón y proteínas. Comúnmente se sabe que los tubérculos se forman por engrosamiento de la punta de los estolones, debido al crecimiento radial de las células parenquimáticas, sin embargo, cualquier ápice del tallo, inclusive las yemas axilares, yemas florales, yemas apicales, puntas de estolones y brotes de tubérculos son capaces de tuberizar (Ewing 1985).

Existen dos teorías que tratan de explicar el fenómeno sobre los mecanismos del inicio de la tuberización. Una teoría sostiene que la tuberización es el resultado de la acumulación de

fotosíntatos y nutrientes en el ápice del estolón mientras que la otra teoría propone la participación de una hormona asociada con el fotoperíodo.

Otra teoría, la teoría nutritiva sostiene que las condiciones que incrementan la concentración de compuestos fotosintéticos en los extremos del estolón (producción elevada y reducida utilización el crecimiento de las otras partes de la planta) promueven la formación de tubérculos. La iniciación de tubérculos parece estar acompañada de un incremento en la tasa de fotosíntesis (Moorby, 1970), sin embargo, este incremento puede deberse principalmente a la remoción de asimilatos por los tubérculos en desarrollo, más que a un inherente efecto de inducción .

Parece que existe una acumulación de azúcares en los ápices inmediatamente antes de la iniciación del tubérculo. Lowell y Booth (1967) sostienen que la síntesis de almidón en los estolones es el primer signo detectante de la tuberización y que se produce antes de que se produzca algún tipo de evidencia histológica.

(31, 24, 30,41)

Gregory (1956) mostró utilizando esquejes que el estímulo de tuberización en Solanum tuberosum sp tuberosum puede ser transmitido por injerto. Kumar y Wareing (1973) obtuvieron similares resultados con esquejes de Solanum tuberosum sp andigena. Este último caso, solamente cuando los vástagos provenían de plantas expuestas a días cortos, los esquejes tuberizaban. Además, se ha determinado que en el estímulo para la tuberización puede moverse tanto en dirección aeropetal como basipetal.

En relación con la teoría hormonal, el grupo de hormonas que más se han estudiado en relación a la tuberización son las giberelinas. Se ha establecido que la inducción de la tuberización es acompañada por una declinación en la actividad de compuestos como las giberelinas, sin embargo, el mecanismo que controla la inducción de la tuberización sería un balance hormonal más que la concentración de una sola hormona. Las citoquininas son compuestos importantes en este balance.

En suma, la exposición de las plantas a condiciones que inducen tuberización produce en las hojas una disminución en la actividad de gibereinas, ligado a un incremento en la concentración de ácido absicico.

Resulta claro por consiguiente que aún no existe una explicación fisiológica satisfactoria para el inicio de la tuberización, necesitándose de mayor investigación al respecto. (27,7,8,16)

Es importante destacar que más del 90% de la materia seca acumulada en los tubérculos proviene de la fotosíntesis que ocurre después del inicio de la tuberización, por lo que la tasa de crecimiento de los tubérculos dependerá principalmente de la fotosíntesis neta registrada durante la tuberización y de la capacidad inherente de las plantas para translocar y acumular los fotosíntatos en los tubérculos. Se ha determinado que el principal carbohidrato que se transloca e ingresa al tubérculo es la sacarosa, ocurriendo allí la síntesis de almidón. (Moorby 1970). (9, 14)

### 3.1.15 Aspectos fitosanitarios de la papa e importación de minitubérculos

La papa, como cultivo de propagación vegetativa es propensa a la infección acumulativa por bacterias, hongos, virus y viroides, proceso conocido como "degeneración". Estas infecciones pueden tener un efecto dramático sobre el rendimiento y la calidad comercial del cultivo, pudiendo afectar también la distribución comercial del germoplasma de papa.

En Guatemala la calidad del tubérculo producido ha ido decreciendo debido a la degeneración de la semilla tubérculo, principalmente por la contaminación de enfermedades viróticas y bacteriales, ya que estos se encuentran diseminados por toda las áreas donde se siembra papa (9,21). En nuestro país desde aproximadamente 35 años, existe prohibición para la importación de papa fresca de países donde se tiene la presencia de "nemátodo dorado" (*Globodera rostochiensis*), que además de ser la peor plaga para la papa (*Solanum tuberosum*), afecta además 250 productos agrícolas entre hortalizas, leguminosas y frutas (12,19,20).

Las empresas Productos Alimenticios René (Fabricante de Fillers) y la Mexicana Sabritas, establecieron una alianza estratégica uniéndose al programa nacional de competitividad, que coordina el Ministerio de Economía para el desarrollo de éste cultivo; importando inicialmente en el año 1,999, **30,000 minitubérculos** (38.40 kg) de la variedad Atlantis y producidos en el Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola de México a un costo de Q.60,239.79 y posteriormente en el mismo año, importaron **35,000 minitubérculos** (45.36 kg.), procedentes de un estado de Canadá libre de "nemátodo dorado", a un costo de Q. 113,222.6, siendo la empresa Maine Farmer Exchange la exportadora del producto (36,20).

Esto sin tomar en consideración las importaciones de papa congelada y precocida para restaurantes de comida rápida.

### 3.1.16 Inducción y utilización de microtubérculos de papa

Las técnicas *in vitro*, tales como el cultivo de meristemas, desarrolladas en los últimos veinte años, permiten la erradicación de éstas enfermedades ( Schilde-Rentschler y Schmiediche, 1,984). Las plantas de papa obtenidas por cultivo de meristemas pueden ser examinados para comprobar la presencia ó ausencia de patógenos, el material libre de patógenos constituye el núcleo de un programa de semillas. Desde hace mucho tiempo los fitofisiólogos han tenido interés en la fisiología del desarrollo y control hormonal de la tuberización de la papa.

En estudios en plantas enteras y en esquejes de tallo con un solo nudo, se ha demostrado que el proceso de tuberización es extremadamente complejo y existen muchas formas de alterar el balance hormonal de la planta e inducir así la tuberización. Algunos científicos han modificado las concentraciones de cotoquininas-auxinas en el medio de cultivo: Hussey y Stacey, 1,984 (43); Kim, 1,982 (44); Wang y Hu, 1,982 (45) , mientras que en el CIP se han agregado antigiberilinas, tales como el cloruro de clorocolina (CCC), habiéndose encontrado diferencias en las características y el tiempo necesario para la inducción de los mismos .

El centro de internacional de la papa (CIP) ha desarrollado investigaciones para inducir tubérculos *in vitro* en un rango amplio de genotipos de papa. En promedio una de 10 yemas axilares de plántulas cultivadas *in vitro* desarrolló estolones con pequeños tubérculos en sus extremos. Cada tubérculo de peso de 3 a 38 miligramos, con dos o más ojos y aún siendo pequeño su tamaño, expresaba, caracteres como el color y la forma. (42, 5,11)

### 3.1.17 Ventajas de la microtuberización *in vitro*

Generalmente para abastecerse de semillas micropropagadas, son necesarias tres fases :

- A) Micropropagación
- B) Formación de minitubérculos y
- C) Producción de semillas.

De esta manera son necesarias dos siembras en invernadero, protegido de plagas, utilizando grandes espacios, en cambio si se pudiera producir tubérculos formados *in vitro*, se eliminaría una fase de producción ( 14,24,40 ).

La formación de microtubérculos *in vitro* presenta como principales ventajas las siguientes:

- a) Se obtienen tubérculos en cualquier estación del año.
- b) Es posible almacenar los microtubérculos en espacios reducidos y realizar la siembra en la fecha óptima de plantación evitando los picos productivos que se presentan con la producción de vitroplantas.
- c) Sirven para siembras tempranas en campo permitiendo así un escalonamiento de la producción.
- d) Se pueden transportar más fácilmente.
- e) Aumenta el número de minitubérculos por planta en comparación con el número obtenido en invernadero.
- f) Evita riesgos de daños en la producción en invernadero.
- g) Eliminación de la fase de adaptación y facilidades en la plantación de campo.

Esta técnica en algunos casos ha presentado como principal limitante el bajo número de tubérculos que se obtienen por planta (máximo 1.0 - 1.5) y el pequeño calibre de los mismos, lo cual dificulta la conservación de largo plazo y la supervivencia en el transplante. (24,14,4,1).

### 3.1.18 Recipientes

El tipo de recipiente algunas veces es factor limitante del crecimiento de las plantas, este factor puede ser variable, dependiendo de las condiciones del laboratorio, por ejemplo, la altura sobre el nivel del mar, la temperatura, composición del gas atmosférico, etc.

Considerando éste fenómeno la definición del tipo de recipientes a usar en el laboratorio es muy importante.

- a) **Recipientes de vidrio.** Este tipo de recipiente tiene buena transparencia, por eso el abastecimiento de luz es más efectivo que en los recipientes de plástico. Dependiendo del tipo de tapaderas, es necesario o no la aireación, debido al incremento del gas etileno que acelera el envejecimiento o causa callosidad. Afortunadamente existen bastantes tipos de

recipientes con diversidad de ventajas y desventajas, así como también de costos. Una de las ventajas de los recipientes de vidrio es que se pueden flamear la boca del mismo, lo que protege del ingreso de contaminación. Algunas de las desventajas es que son pesados y con facilidad se quiebran.

**b) Recipiente de plástico.** Están hechos de un material muy liviano, lo cual es muy conveniente para trasladar las vitroplantas de un lugar a otro. actualmente se está utilizando el policarbonato, cuya transparencia se asemeja mucho al vidrio, sin embargo, ésa transparencia fácilmente se pierde por su utilización continua. En Guatemala todos los tipos de recipientes para cultivo de tejidos se deben importar de países desarrollados, por lo que son muy costosos. La duración de éstos recipientes es menor que los de vidrio, por eso al comprarlos se debe considerar esto bien. Es recomendable varios tipos de recipientes en pequeñas cantidades para probarlos primero, antes de hacer la compra definitiva.

Existen algunas otras alternativas, por ejemplo, las pachas que se utilizan para leche de bebes (marca Gerber) son de policarbonato y resiste muy bien el autoclaveado, con una pequeña modificación hecha al mamón lo hace útil para el cultivo de tejidos. Además el mamón sirve también como empaque de la boca de la pacha. Estas pachas tienen la ventaja de que se pueden conseguir fácilmente en el mercado local, a un precio entre Q.6.00 y Q.12.00 por unidad y no se necesita esperar tanto tiempo por importarlas (dos a tres meses) como en los otros casos (37,38,8,7).

**c) Bolsa.** Existen en el mercado unas bolsas esterilizadas que se pueden utilizar como recipientes desechables de cultivo de tejidos. Recientemente, existen unos tipos de películas que dejan pasar los gases. Estos se pueden hacer en forma de bolsa y se obtiene un recipiente con aireación. Estos materiales nuevos son más costosos porque son desechables y el presupuesto de armonización se debe poner de una vez. Sin embargo, es difícil que les entre contaminación y reduciría el espacio del cuarto de crecimiento .

### **3.1.19 Normas de calidad e industrialización de la papa.**

En Guatemala no existen normas de calidad oficiales para la papa, ya que estas varían de acuerdo a las exigencias de los consumidores, aunque para consumo en fresco las normas de

calidad mínima, indican que la papa debe de estar lavada, sin tierra, de consistencia dura y evitar al máximo las que se encuentran con manchas verdes causadas por la solanina, cuando la papa se encuentra expuesta al sol por períodos prolongados.

Las normas de calidad mínimas que debe poseer la papa para que sea aceptable para el proceso industrial de papalinas son :

- No debe presentar **podrición bacterial acuosa, Fusarium y Pseudomonas infestans** daño y presencia de insectos.
- Se considera daño serio la presencia de pudriciones e insectos afectando más del 10 % en peso del tubérculo individual.
- Defectos ( rajadura por crecimiento, sarna, enverdecimiento, crecimiento secundario, adherencia ***Rhizoctonia***, moho, rajadura de aire, corazón negro, corazón hueco, daños mecánicos por lesiones y magulladuras y daños por congelación (36).

Es posible utilizar la papa en diversas formas, en Guatemala se utiliza para la fabricación de harinas, almidones, papalinas y sopas; pero tiene además otras opciones industriales, por ejemplo: puede extraerse almidón industrial para ser utilizado en alimentación, tintes, caramelos, dextrosa, textiles, papeles, colas, detergentes, fósforos, fotografías, alcohol etílico del cual se elaboran cauchos sintéticos, disolventes para transformaciones químicas en farmacia, perfumería, explosivos, bebidas, acetonas y butanol ( 36 ).

La deficiencia de la industria de Guatemala se manifiesta como ya se mencionó en el creciente aumento en la importación de microtubérculos, tubérculos y papa congelada para ser utilizado en restaurantes de comida rápida y supermercados .

### 3. 1. 20 CLASIFICACION BOTÁNICA DEL CULTIVO DE LA PAPA.

DIVISIÓN	<i>Thacheopyta</i>
SUBDIVISIÓN	<i>Pynophytina</i> (Gymnospermae )
SUBCLASE	<i>Dicotiledóneas</i>
ORDEN	<i>Polemoniales</i>
FAMILIA	<i>Solanaceae</i>
GENERO	<u><i>Solanum</i></u>
ESPECIE	<u><i>tuberosum</i></u>

### 3.1.21 Morfología y comportamiento del tubérculo

Los tubérculos de papa, son órganos vegetales vivos, que consumen oxígeno y desprenden dióxido de carbono, calor y etileno. El comportamiento de éste tejido vivo durante el almacenamiento está afectado no sólo por el medio ambiente, sino también por la variedad genética, las prácticas agronómicas durante su cultivo, los ataques de plagas y enfermedades y particularmente por las condiciones físicas del tubérculos ( 32,1,13 ).

El tubérculo que, botánicamente, es un tallo subterráneo, se origina por engrosamiento de un estolón que a su vez, es un tallo subterráneo que crece más ó menos horizontalmente, formando pequeñas hojuelas. La longitud del estolón al formar el tubérculo es variable y depende de la variedad y otras condiciones como : duración del día, temperatura y precipitación .

El número de ojos del tubérculo es bastante variable, dependiendo de la variedad, tamaño del tubérculos y condiciones de crecimiento. Estos se encuentran colocados en espiral sobre la superficie del tubérculos y en forma similar a la de los botones laterales de un tallo aéreo.

El borde de la cavidad en la que están situadas las yemas del ojo, es el remanente de una hojuela; constituyendo el ojo la axila de una hoja en una parte del tallo (32, 33 ,1,13).

En el centro del ojo, se encuentra en muchos casos el botón principal, presentando a ambos lados un botón lateral; próximos a los botones laterales se notan protuberancias que son el comienzo del desarrollo de las raíces .

El fruto es una baya bilocular de 15-30 mm de diámetro, color verde-amarillento o verde azulado. Cada fruto contiene, aproximadamente, 200 semillas ( 41 ).

### 3.1.22 La dormancia

La dormancia es un período de receso normal después de la cosecha y varía dependiendo de la variedad y edad fisiológica de los tubérculos. En éste período los tubérculos no brotan, aunque estén en medio adecuado para éste proceso. Las temperaturas bajas prolongan el tiempo de reposo, pero temperaturas altas por 3 ó 4 semanas pueden interrumpirlo. La diferencia entre dormancia y latencia es que en el primer caso, la paralización temporal del crecimiento de los meristemas es debido a causas internas, mientras que en la latencia, la inhibición del crecimiento es por causas externas ( 32,41 ).

### 3.1.23 La respiración

Es un proceso que ocurre en la fase de almacenamiento de los tubérculos; la respiración ocurre por el hecho de que el tubérculo es un órgano viviente. La energía requerida para los procesos de vida se produce mediante la respiración, liberando en consecuencia bióxido de carbono, humedad y calor, a partir de oxígeno y carbohidratos .

La temperatura, humedad, el oxígeno y dióxido de carbono influyen en la velocidad de respiración del tubérculo y en su duración en el almacenamiento, por lo tanto, un buen manejo puede ayudar a controlar la velocidad de las pudriciones ( 33,8 ).

### 3.1.24 La brotación

La brotación y el período de dormancia, son los factores más importantes para determinar el tiempo de almacenaje de la papa.

Después de la cosecha, el período de dormancia está sujeto a varias condiciones como : variedad, edad fisiológica a la cosecha y temperatura de almacenamiento, por ello la dormancia será más larga, si durante el cultivo hubo poca humedad y alta temperatura .

Los brotes siempre causarán una cierta cantidad de pérdidas, pues las papas pierden peso como consecuencia de una elevación en la respiración y evaporación. El etileno que producen los tubérculos al estar almacenados es una de las principales causas de la inducción al brotamiento, cuando no se posee un buen sistema de ventilación ( 32,41).

### 3.1.25 Origen de la papa

Nadie puede dudar, que la papa sea originaria de América; lo que se necesita determinar es de que parte de éste vasto continente .

Existe abundante evidencia arqueológica que demuestra que la papa ha sido cultivada en la región Andina de América del Sur desde tiempos muy antiguos. Se considera que el centro de origen habría estado localizado en las tierras altas del Sur de Perú, en un área comprendida entre el Cuzco y los alrededores del lago Titicaca. De allí se habría difundido por el Sur hacia Bolivia, Argentina y Chile y por el norte hacia Ecuador, Colombia, Venezuela, Guatemala y México ( 41,43,44,5 ).

### 3.1.26 Composición química de la papa

La composición química de la papa, puede variar dependiendo del clima, fertilización, variedad y almacenaje, pero en términos generales en la literatura se identifica la presencia de los siguientes componentes ( cuadro 3 ).

Las papas tienen un alto valor nutritivo, siendo ricas en vitaminas aminoácidos y minerales. Tienen menos calorías que el arroz, queso y otros productos. Posee los carbohidratos necesarios para una dieta adecuada y la tercera parte de la vitamina C que un adulto debe tomar diariamente. Además posee hierro, tiamina, bajo contenido de sodio y total ausencia de grasas ( 36 ).

**Cuadro 3** Composición química de la papa

Componente	g/ 100 g de peso fresco
Agua	77.44
Sólidos	22.6
Proteína	2.7
Grasas	0.1
Carbohidratos	17.4
Fibra cruda	0.06
Cenizas	0.9
Hierro (mg / 100 g )	0.8
Calcio (mg /100 g )	14.7
Fosfatos	89.0
Vitamina C ( mg/ 100 g )	21.4
Niacina ( mg / 100 g )	1.4
Tiamina ( mg / 100 g )	52.6
Riboflavina ( mg/ 100 g)	33.7

Fuente: Christiansen, J.A. y Vargas Machuca, R. 1981 ( 36 ).

### 3.1.27 Medio y condiciones de cultivo

De manera general, el medio de cultivo debe ser rico en elementos minerales, en particular el potasio debe estar en un nivel alto para una mejor multiplicación vegetativa; desde este punto de vista, el medio Murashige y Skoog es conveniente.

Los meristemos se cultivan generalmente sobre medio sólido, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos (empleando puente de papel). El pH normalmente se sitúa entre 5.4 – 6.0.

El contenido de sacarosa es de un 2 - 4%. Frecuentemente se utilizan las siguientes vitaminas: vitamina B<sub>1</sub>, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico. Los reguladores que se suelen utilizar en bajas concentraciones (0.1 – 0.5 mg. l<sup>-1</sup>); son auxinas y citoquininas para promover la división celular; el AG<sub>3</sub> es mucho menos utilizado.

Los tubos con los meristemos se ponen bajo luz fluorescente (en general de 1,000 a 3,000 lux) en ocasiones es necesario utilizar una irradiación menor en los primeros días después del aislamiento- bajo un fotoperíodo de 14-16 horas y a una temperatura de 23 - 25 °C. (41,26,28)

### 3.1.28 Retardadores de crecimiento de las plantas

Varios compuestos han sido producidos para inhibir el crecimiento de las plantas y ha sido demostrado que inhiben la biosíntesis del ácido giberélico ; como AMO1618 Y CCC (Cloruro de clorocolina), fosfon D y ancymidol fueron llamados "retardantes del crecimiento". El ancymidol inhibe la conversión de kaureno a kaurenol. Las giberelinas, como las auxinas, pueden ser metabolizadas a giberelinas conjugadas con glucosa ( 41,39,40).

### 3.1.29 Efecto de la oscuridad

No se puede dejar de un lado uno de los factores que incide fuertemente en el proceso tuberizador como lo es la oscuridad, ya que la formación del rizoma y del futuro tubérculo, se da dentro de la tierra por el geotropismo negativo que posee la raíz, sitio por donde se inicia el engrosamiento, *in vitro*, la condición se controla mediante el acondicionamiento de cuartos oscuros, en los que se incuban las plantas completas, por lo tanto, la raíz es el único sitio en donde se forma el estolón y esta función en gran medida se atribuye a las yemas axilares que se encuentran en la base del peciolo de la hoja, sin embargo en algunas ocasiones también se forman microtubérculos en las raíces; en la oscuridad, el proceso fotosintético se ve detenido y es por lo que en algunos casos los cuartos se acondicionan para reducir el fotoperíodo, es decir se

acortan las horas de luz y se aumenta el período de oscuridad con el fin de que la plántula no deje de elaborar sus propias sustancias, aunque en poca cantidad y que esto contribuya así mismo a la formación de órganos de reserva.

A este respecto, en nuestro caso las plántulas no se sometieran a horas luz, sino por el contrario a oscuridad total, esto con el fin de observar como se desarrolla el proceso.

En los experimentos de Wang et al (1,990), la inducción de los tubérculos no se vio afectada por la baja intensidad lumínica, ni por la ausencia de luz ( oscuridad total ), sin embargo, los microtubérculos formados con baja intensidad lumínica no presentaron dormancia ( estado de latencia ), mientras que los otros presentaron profunda dormancia (41).

## 3.2 MARCO REFERENCIAL

### 3.2.1 Características de los materiales experimentales

#### 3.2.1.1 Clones de papa

##### A. Loman

Predomina a nivel comercial, ya que es el clon de mayor preferencia en el gusto de las amas de casa, por lo tanto facilita su comercialización. Además de constituirse en el clon que ocupa el mayor porcentaje, en términos de área sembrada a nivel comercial en nuestro país

Los rendimientos son bajos, debido a la degeneración de la semilla-tubérculo producido en el país, por la contaminación de enfermedades viróticas, debido a que los agricultores siembran su propia semilla con alto grado de infección; además la papa destinada para semilla se almacena inadecuadamente a menudo con luz directa, lo que da como resultado un alto porcentaje de tubérculos exhibiendo dominancia apical, brotes alargados y débiles lo cual se traduce en bajos rendimientos ( 9,10,19,21 ).

#### Características Clon Loman:

- Adaptabilidad: 1,700 - 2,500 msnm
- Altura : 0.6 a 0.7 m.
- Tallos: erectos al principio, luego con la madurez alcanzan un tipo rastrero.
- Color del follaje: verde oscuro.
- Forma de los tubérculos: alargados y ligeramente aplanados, extremo terminado en punta.
- Color interno del tubérculo: amarillo crema.

- Susceptibilidad a tizón tardío (Phytophthora infestans De Bary) muy susceptible.
- Ciclo del cultivo: 90-100 días.
- Distancia de siembra: entre surcos 0.60 m. Entre plantas 0.30m
- Adaptación culinaria: muy aceptable.
- Rendimiento : de 15 a 20 ton/ ha
- Ojos blancos superficiales
- Floración: por lo regular no florea. ( 8)

### Características del Clon ICTAFRIT

Material experimental enviado por el Centro Internacional de la papa (CIP), al Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), en el mes de Mayo del año 1,997, como parte del programa de transferencia de tecnología e investigaciones colaborativas entre instituciones que generan investigación, y como parte del programa del CIP que distribuye continuamente germoplasma de papa conservado in vitro, a más de 50 países en vías de desarrollo ( 8,9 ,21).

Es el resultado del cruce experimental entre Solanum andigena y Solanum tuberosum. Inicialmente el CIP envió este material a la ciudad de Panamá, en este país Centroamericano el Instituto de Investigación, le denominó IDIAFRIT, la terminación FRIT obedeció a las características especiales que para fritura posee este clon, aunque se le considera de doble propósito ya que también su calidad culinaria es muy aceptada por las amas de casa y porque morfológicamente es muy similar al clon Loman.

En nuestro país inicialmente fue evaluado en la población de Chiquirichapa, aunque los resultados no fueron concluyentes por inundaciones que afectaron el área, posteriormente se evaluó este clon en la aldea Xeabaj del Municipio de Santa Apolonia, Chimaltenango, en investigación inferencial realizada en 1,998, en la cual se definieron sus bondades agronómicas ( 9,21,22,19 ).

### **Características**

- Adaptación: 2,400-3,000 msnm
- Altura de la planta: 1.10 m
- Tallos: erectos y fuertes.

- Color del follaje: verde oscuro.
- Color de las flores: moradas.
- Forma del tubérculo: oblongo-alargado (relación 2:1 respecto a largo por ancho)
- Ojos o yemas: no profundos de color morado.
- Color externo: crema
- Resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans* De Bary) muy tolerante.
- Ciclo: 120 días
- Rendimiento de 25-30 ton/ ha
- Distancia de siembra: 0.40 m entre plantas y 1.0 m. entre surcos.
- Tipo de calza: requiere de una calza ancha por la altura que alcanza.

### 3.2.2 Manejo del Experimento

Inicialmente se prepararon soluciones Stock

- de macronutrientes MS (\*10)
- de micronutrientes MS (\*100)
- Soluciones Stock de hierro MS (\* 200)
- Soluciones Stock de vitaminas MS (\*200)

La elaboración de soluciones Stock obedece a que una vez escogida la formulación del medio de cultivo, se podrían pesar las cantidades necesarias de todos y cada uno de los componentes del medio, ello no obstante sería una operación larga y tediosa, además de muy imprecisa puesto que obligaría a pesar algunas cantidades muy pequeñas ( 41,21 ).

Es habitual trabajar con una solución Stock de macronutrientes, una de micronutrientes, una de hierro con un agente quelante, otra de vitaminas y Myo-inositol, así como soluciones específicas para los demás componentes del medio (reguladores, etc) .

Puede apreciarse en los cuadros **52A, 53A y 54A** del Apéndice; proceder de ésta forma simplifica la preparación del medio MS, que contiene un total de 20 sustancias, a partir de soluciones Stock su preparación se reduce a cuatro medidas de volumen y una pesada (sacarosa).

Obtenido el volumen de medio deseado se procedió a ajustar su pH mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1 - 1N. En función al medio a preparar se añadió en primer lugar el agente solidificante, se fundió por calentamiento breve para finalmente ser dosificado en los recipientes elegidos. ( cuadros 52A, 53A Y 53A del Apéndice )

### 3.2.3 Medios de cultivo experimentales

Para el desarrollo de la presente investigación inicialmente se utilizó el medio para iniciación "P2" para la fase de Micropropagación y los medios de KO, M-S, W-H, KIM, P-S y el medio H-S, para la fase de Microtuberización. La composición de cada medio de cultivo puede observarse en el cuadro 9 y la elaboración de los medios basales en los cuadros 49A , 50A Y 51A del apéndice.

#### A. Medio para iniciación " P2 "

Con el propósito de rejuvenecer el material experimental de los clones: Loman e ICTAFRIT, se procedió a micropropagarlos con el propósito de poder disponer para la fase de microtuberización de material suficiente y de un mismo tiempo de crecimiento para lo cual se utilizaron 5.4 litros de medio en 535 tubos de cultivo, para un número igual de microesquejes (explantes) en medios.

Se utilizó el medio de cultivo "P2" desarrollado por el Ing. Ken Okabe, basado en los macronutrientes de Ken Okabe, adicionalmente a las vitaminas de Gamborg B<sub>5</sub> (1967), sacarosa al 3%, agar al 6% ácido fólico (1,000 ppm), L-arginina (4,000 ppm), pantotenato de calcio y putrescina (10,000 ppm). (37).

#### B. Medios microtuberizadores

Posterior a la fase de iniciación se procedió un mes después a trasladar las plántulas obtenidas a la cámara de flujo laminar , donde se disectaron y se obtuvieron un promedio de 5 explantes por planta contabilizando un total de 2,676 explantes, mismos que fueron sembrados en los recipientes tubos de cultivo, Magentas y Gerber, creciendo en seis medios semisólidos tuberizadores:

- a) **Medio H-S:** medio basal en estado semisólido, desarrollado por Hussey G. y Stacey (1,984) formado por elementos orgánicos, modificado con 70,000 mg/l de sacarosa y 2 mg/l de BAP.

- b) **Medio M-S** : medio basal en estado semisólido, desarrollado por Murashige y Skoog (1962) conformado por elementos orgánicos e inorgánicos, modificado con 90,000 mg/l de sacarosa (41,46)
- c) **Medio KO** : medio basal semisólido, desarrollado por Ken Okabe (1,998), toma como base el medio M-S suplementado con vitaminas de Nitch y Nitch, sulfato de putrescina, L-Arginina, Pantotenato de calcio y 90,000 mg/l de Sacarosa (37).
- d) **Medio P-S** : medio basal semi sólido, desarrollado por C.E Palmer C.E y O.E Smith (1,969), toma como base el medio Murashige y Skoog, suplementado con reguladores de crecimiento Kinetina 2.5 mg/l y 500 mg/l de chloro cholinechloride de cycocel<sup>Basf</sup> (CCC) y 90,000 mg/l de sacarosa (39).
- e) **Medio W-H** : medio basal semisólido, desarrollado por Po-Jen Wan y Ching Ye Hu (1,982), y suplementado con 10 mg/l de Bencil aminopurina BAP y 60,000 mg/l de sacarosa (45).
- f) **Medio KIM** : medio basal semi sólido, desarrollado por Kim Y.C. (1,982), toma como base el medio de Murashige y Skoog, suplementado con 5 mg/l de Bencil Aminopurina BAP y 60,000 mg/l de sacarosa (11,13,15).

### 3.2.4 Estudios realizados sobre microtuberización de papa

#### 3.2.4.1 Establecimiento de una tecnología in vitro en dos variedades de papa

*Solanum tuberosum L, subespecie(spp) andígena.*

Chaparro Catalina Astrid (11), realizó este estudio en la Universidad Javeriana de Colombia, con la colaboración específica del Laboratorio de papa de las instalaciones del Programa Regional Agrícola de Corpoica. El experimento consistió en evaluar las variedades de papa Parda pastusa y Diacol Monserate en medio líquido y sólido; distribuidos en dos fases :

#### A. Fase de propagación inicial

Utilizando el medio líquido M-S (1,962), se sembraron los esquejes en 80 erlenmeyer de 500 ml por 30 días.

## B. Fase de microtuberización

En cámara de flujo laminar y con la ayuda de pipetas estériles de 15 y 25 ml y succionadores se extrajo el medio líquido M-S de propagación inicial y a cada erlenmeyer se le aplicó medio tuberizador y se llevaron a cuarto oscuro por 60 días.

**Cuadro 4 Evaluación de medios inductores de tuberización**

Variante	Sacarosa %	CCC (mg/l)	BAP (mg/l)	No. Microtubérculos
I	8	500	5	59 tubérculos en 750 ml.
II	7	----	2	Cercano al mayor
III	----	1000	2	BAJO
IV	3	500	----	BAJO
V	3	----	----	BAJO

**Nota :** Cycocel Basf o CCC= Cloruro de clorocolina, BAP =Bencilaminopurina.

El experimento permitió identificar que el CCC no influye determinante en la producción de microtubérculos sin la acción conjunta de una fuente de carbono de alta concentración. Las variantes I, II y III mostraron una producción muy baja ,demostrándose que la ausencia o bajas concentraciones de sacarosa inhiben el proceso aún con la presencia de CCC, aún así la ausencia de BAP en las variantes IV y V pudo influir en el proceso retardándolo.

### 3.2.4.2 Evaluación de la inducción y utilización de tubérculos in vitro de papa

Schilde Rentschler y P.E. Schmrchinem, 1984, especialistas investigadores del Centro internacional de la Papa del Perú (CIP), realizaron dos investigaciones consistentes en identificar el rendimiento en número, peso en gramos y diámetro en milímetros en la evaluación de 10 clones de papa y además establecer la comparación entre cuatro métodos estándar para la inducción in vitro de tubérculos.

Para el primer estudio se utilizaron combinaciones de medios líquidos y medios sólidos en 2 etapas:

### A. ETAPA 1 Esquejes de tallo para medios líquidos

En un medio líquido de propagación, se colocaron tallos completos de plántulas *in vitro* obtenidos en la primera etapa, sin raíces ni hojas, los frascos con los segmentos fueron puestos en un agitador orbital a 60 rpm, bajo 16 horas de iluminación con intensidad de 1000 lux y temperatura de 22 °C.

Las yemas axilares a lo largo del tallo crecieron rápidamente y a dos o tres semanas desarrollaron plántulas.

### B. ETAPA 2 Inducción de microtubérculos

Se indujo la formación de microtubérculos como resultado de la adición al medio líquido de propagación de Cloruro de Colocolina (CCC) y Bencil Aminopurina (BAP) y un incremento en la concentración de sacarosa, luego los erlenmeyer conteniendo medios se llevaron a un cuarto oscuro de incubación por 30 días.

**Cuadro 5 Rendimiento *in vitro* de tubérculos y sus componentes para diez clones, con el método estándar utilizado en el CIP (combinación de medios líquidos y sólidos en erlenmeyer**

<b>VARIEDADES</b>	<b>No.promedio/microtubérculos</b>	<b>Peso promedio (mg )</b>	<b>Diámetro promedio (mm)</b>
Mariva	10	131.2	7
LT-2	12	105.0	6
DT0-2	10	97.4	6
LT-7	24	143.5	5
DT0-33	8	78.1	6
LT-1	16	87.8	5
Piñaza	20	72.8	3
Atacama	9	49.8	5
702867	14	139.2	6
Atzimba	10	77.7	5

**Cuadro 6 Comparación de aspectos, en tres métodos estándar ( líquidos y semisólidos), respecto al medio estandar del CIP, para la inducción *in vitro* de microtubérculos.**

Aspectos	CIP	Wang y Hu	KIM	Hussey y Stacey
Material vegetal	Tallos de plántulas in vitro	Tallos de plántulas in vitro	Esquejes de tallo in vitro	Esquejes de tallo In vitro
Medios de Propagación	MS+0.5 BAP+ 0.4 AG+ 0.01 ANA	MS +0.05 ANA	MS + 0. 1 AG+ 0.5 cinetina	-----
Medios de tuberización	MS+ 5.0 BAP+ 500.CCC + 8 % de sacarosa	MS + 10.OBAP+ 8% de sacarosa	MS+ 5.0 BA + 6.0 de sacarosa	MS +2.0 BAP + 6% sacarosa
Temperatura °C	18	20	20	20
Horas (luz)	0	8 (100 lux)	0	8
Rendimiento	10 tubérculos por Erlenmeyer	50 tubérculos por Erlenmeyer	1-2 tubérculos por esqueje	1 tubérculo por esqueje.
Tiempo	4 semanas	16 semanas	8 semanas	8 semanas.

**Nota:** todas las preparaciones se basaron en la mezcla de sales (MS) de Murashige y Skoog (1,962).

La adición de reguladores de crecimiento está dada en ppm, se agregaron :  
BAP=Bencilaminopurina, AG= Acido giberélico, ANA=Acido naftaleno acético, KIN=cinetina;  
CCC =cloruro de clorocolina.

### 3.2.4.3 Minitubérculos de papa: Tecnología de validación en México

Lozoya-Saldaña ( 30 ), estudió el efecto de cuatro medios de cultivo inductores de tuberización en los clones Atzimba y Juanita bajo tres diferentes regímenes de iluminación.

El proceso de tuberización se inició a los 20 días después de la siembra, para todas las combinaciones de cultivar-luz-medio, pero esta estimulación temprana no estaba relacionada con el rendimiento del tubérculo. Atzimba tuberizó más que Juanita y un fotoperíodo de 8 horas fue mejor que los otros tratamientos con menos luz. Específicamente, el medio de Wang-Hu (W-H), favoreció la más alta tuberización para Atzimba (1.98 mg/planta) y el de Palmer-Smith (P-S) para Juanita (290 mg/planta). No obstante se obtuvo una respuesta más general y uniforme para ambas variedades en el medio P-S.

**Cuadro 7** Número de microtubérculos de las variedades de papa: Atzimba y Juanita, producidos en cuatro medios inductores de tuberización.

ASPECTOS	P-S (1,969)	W-H (1,982)	WA (1,983)	ST (1,972)
Medio tuberizador	MS + 2.5 mg/l de cinetina + 60g de sacarosa	MS+10mg/l bencylamino purina + 80g de sacarosa	MS + 3.5 mg/l de cinetina + 60g de sacarosa	MS+ 25 mg/l de coumarina + 60 g de sacarosa
No.tubérculos a 8 horas (luz) a 2,500 Lux 30°C	<b>Atzimba</b> 1.7 <b>Juanita</b> 1.5	<b>Atzimba</b> 1.3 <b>Juanita</b> 0.1	<b>Atzimba</b> 1.7 <b>Juanita</b> 1.1	<b>Atzimba</b> 1.0 <b>Juanita</b> 0.3
No. tubérculos con luz difusa a 100 Lux 25°C	<b>Atzimba</b> 1.1 <b>Juanita</b> 1.1	<b>Atzimba</b> 0.5 <b>Juanita</b> 0.3	<b>Atzimba</b> 1.1 <b>Juanita</b> 1.2	<b>Atzimba</b> 0.4 <b>Juanita</b> 0.7
No.tubérculos Completa oscuridad a 25°C	<b>Atzimba</b> 1.5 <b>Juanita</b> 1.2	<b>Atzimba</b> 0.8 <b>Juanita</b> 0.7	<b>Atzimba</b> 1.2 <b>Juanita</b> 1.0	<b>Atzimba</b> 0.3 <b>Juanita</b> 0.6

**Nota:** P-S = Palmer-Smith, W-H = Wang-Hu, WA = Wattimena, ST = Sallknech.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General:

- 4.1.1 Determinar la respuesta de los clones Loman e Ictafrit de papa (*Solanum tuberosum* L.) a la técnica de tuberización *in vitro*.

### 4.2 Específicos:

- 4.2.1 Determinar el recipiente adecuado para la producción *in vitro* de tubérculos de papa, en los clones LOMAN e ICTAFRIT.
- 4.2.2 Determinar el medio de cultivo mas adecuado para la producción *in vitro* de tubérculos de papa en los clones LOMAN e ICTAFRIT.
- 4.2.3 Identificar los medios de cultivo, que inducen la formación de brotes en microtubérculos de los clones LOMAN e ICTAFRIT.

## 5. HIPÓTESIS.

- 5.1 Para la microtuberización existe al menos un medio de cultivo que favorece la formación de un mayor número de microtubérculos , para los clones Loman e Ictafrit.
  
- 5.2 Para la microtuberización existe al menos un tipo de recipiente que favorece la formación de un mayor número de microtubérculos , para los clones Loman e Ictafrit.
  
- 5.3 Existe un medio de cultivo que induce la formación de brotes en microtubérculos de los clones Loman e Ictafrit.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Localización del Experimento.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), localizado en el Km. 21.5 carretera a Amatlán, Barcenas, Villa Nueva.

### 6.2. Material vegetal

Los materiales vegetales utilizados, corresponden a dos variedades de papa ( *Solanum tuberosum* L.sub. sp *Andígena*. Germoplasma enviado del Centro Internacional de la Papa (CIP), como parte del programa de cooperación interinstitucional entre centros de investigación. Previo a su exportación y distribución a estos materiales se les aplicó un diagnóstico por medio de técnicas inmunoenzimáticas ELISA, para los virus PLRV, PVY y PVX.

### 6.3 Manejo del experimento

El trabajo de investigación consistió en 4 fases :

#### 6.3.1 Fase de estandarización de los medios, recipientes, densidad de siembra y repeticiones

Habiendo definido a los clones LOMAN e ICTAFRIT como los materiales vegetativos *in vitro* a evaluar, en función de los niveles de fitohormonas y concentración de sacarosa, y partiendo de investigaciones que sobre el tema se han realizado se procedió a la selección de los seis medios semisólidos: **KO** (MEDIO TESTIGO), **M-S**, **W-H**, **P-S**, **H-S**, y **KIM**, para ser evaluados en el proceso de microtuberización , en completa oscuridad .

La composición de los medios basales tuberizadores puede verse en el **cuadro 9**.

**-Recipiente Magenta :** Para cada recipiente Magenta box de Sigma, se estableció un volúmen de 100 ml de medio tuberizador, para una densidad de siembra de 16 explantes y 12 repeticiones, para cada uno de los seis medios semisólidos por cada clon .

Se estableció un cálculo de 14.4 litros de medio tuberizador para ser distribuidos en un total de 144 recipientes Magenta.

**-Recipiente Gerber** : para cada recipiente gerber de 5 cm de diámetro por 7 cm de alto, se estableció un volumen de 30 ml de medio tuberizador, con una densidad de siembra de 5 explantes y 5 repeticiones de cada uno de los seis medios por cada clon.

Se estableció un cálculo de 1.8 litros de medio tuberizador para ser distribuidos en un total de 60 recipientes.

**-Recipiente Tubos de cultivo** : para cada tubo de cultivo de 25 mm por 150 mm, se estableció un volumen de 10 ml de medio tuberizador, con una densidad de siembra de 1 explante y 6 repeticiones para cada uno de los seis medios por cada clon. Para un volumen de 0.72 litros de medio tuberizador para ser dispensado en 72 recipientes.

La distribución de explantes y medios puede verse según **cuadros 49A, 50A Y 51A del apendice** .

### 6.3.2 Fase de ensayo o de Preevaluación

Habiendo estandarizado los factores de investigación, previo a establecer el experimento definitivo, se estableció un ensayo preliminar que permitiera evaluar la consistencia de los medios y la posible respuesta de los clones a la microtuberización y sobre todo identificar el tiempo óptimo de incubación, para lo cual se utilizaron 3 repeticiones por medio y por clon y lecturas de comportamiento y respuesta a los 60, 90 y 100 días.

Lecturas de comportamiento y respuesta a los 60 , 90 y 100 días posteriores a la siembra, identificándose que 60 días era el período óptimo para que se estableciera el proceso microtuberizador ya que después de éste período de tiempo no hubo variación significativa.

### 6.3.3 Fase de micropropagación

Con el propósito de disponer de material suficiente de un mismo período de crecimiento para la fase de microtuberización, se procedió a micropropagar material vegetativo *in vitro* de los clones Loman e Ictafrit disponible en los cuartos de crecimiento, material expuesto a 16 horas de fotoperíodo y una temperatura de 22 °C.

-Se procedió a seleccionar un stock de 108 vitroplantas distribuidos en 54 del clon Loman y 54 del clon Ictafrit.

- Se prepararon 1.08 litros de medio de iniciación "P2", se dispensaron en 108 tubos de cultivo conteniendo 10 ml de medio basal con pH de 5.6-5.7.
- Se procedió a esterilizar los tubos conteniendo medio en autoclave a 15 libras por pulgada cuadrada de presión por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C.
- En cámara de flujo laminar, asépticamente las 108 vitroplantas, se disectaron con la ayuda de pinzas y tijeras esterilizadas con alcohol al 70 % y flameo constante .
- De las 108 vitroplantas se obtuvieron 536 explantes mismos que fueron sembrados en igual número de tubos de cultivo y trasladados a cuartos de crecimiento por 30 días.

#### 6.3.4 Fase del establecimiento definitivo del experimento

Se dispuso para esta fase de las 536 plántulas obtenidas en la fase de micropropagación, distribuidas en 268 para el clon Loman y 268 para el clon Ictafrit. Se procedió a la formulación de los seis medios microtuberizadores, en base a nivel de fitohormonas y porcentaje de sacarosa presente en cada medio a un pH de 5.6-5.7.

- Los recipientes conteniendo medio se llevaron a autoclave para su esterilización a 15 libras por pulgada cuadrada de presión por 20 minutos a 121<sup>0</sup>C.
- Los materiales se llevaron a la cámara de flujo laminar y asépticamente se extrajeron de los tubos de cultivo las plantas micropropagadas y con ayuda de pinzas y tijeras esterilizadas con alcohol al 70 %, se disectaron obteniéndose un total de 2,680 explantes (5 por planta).
- Se sembraron en los recipientes Magentas, Gerber y tubos de cultivo y trasladados a cuartos de crecimiento por 60 días en completa oscuridad .

#### 6.4 Aleatorización

Los tratamientos se aleatorizaron dentro de cada bloque de la siguiente manera; se sorteó el orden de siembra estableciéndose una distribución en función a una relación: medio, clon y recipiente **puede apreciarse en el cuadro 8**, con tres experimentos independientes, uno por cada uno de los tres recipientes, estableciéndose doce tratamientos para el recipiente Magenta, doce

tratamientos para tubos de cultivo y 12 tratamientos para recipientes Gerber. (según cuadros 49A, 50A y 51A del apéndice).

## **6.5 Condiciones ambientales de incubación**

Los materiales sembrados en los medios de cultivo, se trasladaron a cuartos de crecimiento con una temperatura de 22 grados centígrados, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por un tiempo de incubación de sesenta días; aunque el experimento se estableció considerando completa oscuridad, esto se logró conservando cada tratamiento en recipientes plásticos, mismos que posteriormente fueron cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz.

## **6.6 Medición de las variables de respuesta**

### **6.6.1 Número de microtubérculos**

Para la toma de datos para dar respuesta a esta variable se procedió de la siguiente manera: a los sesenta días después del establecimiento del experimento, se extrajeron de los recipientes conteniendo medio tuberizador, los microtubérculos producidos y se realizó el respectivo recuento por tratamientos, posteriormente se obtuvo el promedio por tratamiento.

### **6.6.2 Peso de los microtubérculos**

Habiendo extraído los microtubérculos de los respectivos recipientes, posteriormente a eliminar los residuos de medios, se les clasificó y se procedió a pesarlos en miligramos, posteriormente se obtuvo el promedio respectivo por tratamiento.

### **6.6.3 Longitud de los microtubérculos**

Sobre la longitud de los microtubérculos producidos, se realizó mediante la medición del largo de los mismos en milímetros, para lo cual se utilizó una cinta y una regla graduada. Posteriormente se obtuvo el promedio respectivo de los tratamientos.

### **6.6.4 Diámetro de los microtubérculos**

Los datos de medición del diámetro de los microtubérculos producidos se obtuvieron mediante la determinación del ancho de los microtubérculos producidos, tomados de la parte media; para lo

cual se utilizó una cinta y una regla calibrada, obteniéndose posteriormente el promedio respectivo para cada tratamiento.

### 6.6.5 Microtubérculos con brotes

Para la determinación de los microtubérculos con presencia de brotes, se utilizó una valoración subjetiva ya que sólo se identificó si existía o no presencia de brotes y fueron contabilizados en número, no importando el largo que estos presentaban y su robustez.

## 6.7 Diseño Experimental

Se realizó un experimento para cada tipo de recipiente por lo que, se utilizaron los siguientes diseños independientes:

- a) El diseño Bloques Completamente al Azar con arreglo bifactorial ( $2 \times 6$ ) en arreglo combinatorio de los tratamientos y 12 repeticiones por medio de cultivo y por clon, como **unidad experimental un recipiente Magenta box de Sigma Co. Ltda.** conteniendo 100 ml de medio semisólido tuberizador y creciendo en él 16 explantes, para una siembra de 1,152 explantes por cada uno de los clones ( 2,304 explantes en total en 144 magentas).  
**(cuadros 49A, 50A y 51A del apéndice).**
- b) El diseño Bloques completamente al azar con arreglo ( $2 \times 6$ ) combinatorio de los tratamientos y 5 repeticiones por medio de cultivo y por clon, como **unidad experimental un recipiente tipo Gerber** de 5 cm de diámetro por 7 cm de alto, conteniendo 30 ml de medio semisólido tuberizador y creciendo en él 5 explantes, para una siembra de 150 explantes por cada uno de los clones ( 300 explantes en total en 60 recipientes tipo Gerber).  
**(cuadros 49A, 50A y 51A del apéndice)**
- c) El diseño Bloques completamente al azar con arreglo bifactorial ( $2 \times 6$ ) en arreglo combinatorio de los tratamientos y 6 repeticiones por medio de cultivo y por clon, como **unidad experimental un tubo de cultivo** de  $25 \times 150$  mm, conteniendo 10 ml de medio semisólido tuberizador y creciendo en él 1 explante, para una siembra de 36 explantes por cada uno de los clones.

(72 explantes en total para un número igual de tubos de cultivo).

(cuadros 49A, 50A y 51A del Apéndice)

## 6.8 Factores y niveles :

### 6.8.1 Medios microtuberizadores

- A. KO = Medio tuberizador desarrollado por Ken Okabe (1,998)
- B. W-H = Medio tuberizador desarrollado por Po-Jen Wan y Ching -Ye Hu (1,982)
- C. M-S = Medio tuberizador desarrollado por Murashige y Skoog (1,984) modificado.
- D. KIM = Medio tuberizador desarrollado por Y.C Kim (1,982)
- E. H-S = Medio tuberizador desarrollado por Hussey G. y Stacey (1,984)
- F. P-S = Medio tuberizador desarrollado por Palmer y Smith (1,969)

### 6.8.2 Tiempo de incubación y condiciones lumínicas

- Sesenta días de incubación
- Completa oscuridad.

### 6.8.3 Modelo estadístico

Para cada experimento, establecido en función de cada tipo de recipiente, se utilizó el siguiente modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = u + A_i + B_j + AB_{ij} + R_k + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$	=	Variable de respuesta
$u$	=	Efecto de la media general
$A_i$	=	Efecto del i-ésimo clon
$B_j$	=	Efecto del j-ésimo medio de cultivo
$AB_{ij}$	=	Efecto de la interacción entre el i-ésimo clon y el

		j-ésimo medio de cultivo
R <sub>k</sub>	=	Efecto del k-ésimo bloque
E <sub>ijk</sub>	=	Error experimental asociado a la ijk-ésima unidad experimental.

#### 6.8.4 Unidad experimental

Las unidades experimentales lo constituyeron tubos de cultivo de 25\* 150 milímetros, recipientes tipo Gerber de 5 cm de diámetro por 7 cm de alto y recipientes Magentas Box de Sigma Co. Ltda. De 4 "x 4 " x 6 " (largo, ancho y alto), para los clones Loman e Ictafrit.

#### 6.8.5 Tratamientos

Para el experimento con tubos de cultivo, se utilizaron:

- 36 tubos de cultivo por clon conteniendo cada uno 10 ml de medio semisólido tuberizador con crecimiento de 1 explante por tubo de cultivo y 36 explantes por clon ( 72 explantes en total ).
- 30 Gerber por clon conteniendo cada recipiente 30 ml de medio semisólido tuberizador con crecimiento de 5 explantes por Gerber y 150 explantes por clon ( 300 explantes en total ).
- 60 Magentas por clon conteniendo cada recipiente 100 ml de medio semisólido tuberizador con crecimiento de 16 explantes por Magenta y 1,0152 explantes por clon ( 2,304 explantes en total )  
(cuadros 49A, 50A y 51A del Apéndice).

Cuadro 8 Distribución de Tratamientos por Recipientes

No.de tratamientos	Medios de cultivo	clones	Recipientes
1	M-S	LOMAN	Tubos de cultivo
2	M-S	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
3	KO	LOMAN	Tubos de cultivo
4	KO	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
5	P-S	LOMAN	Tubos de cultivo
6	P-S	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
7	W-H	LOMAN	Tubos de cultivo
8	W-H	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
9	KIM	LOMAN	Tubos de cultivo
10	KIM	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
11	H-S	LOMAN	Tubos de cultivo
12	H-S	ICTAFRIT	Tubos de cultivo
1	M-S	LOMAN	Gerber
2	M-S	ICTAFRIT	Gerber
3	KO	LOMAN	Gerber
4	KO	ICTAFRIT	Gerber
5	P-S	LOMAN	Gerber
6	P-S	ICTAFRIT	Gerber
7	W-H	LOMAN	Gerber
8	W-H	ICTAFRIT	Gerber
9	KIM	LOMAN	Gerber
10	KIM	ICTAFRIT	Gerber
11	H-S	LOMAN	Gerber
12	H-S	ICTAFRIT	Gerber
1	M-S	ICTAFRIT	Magenta
2	M-S	LOMAN	Magenta
3	KO	ICTAFRIT	Magenta
4	KO	LOMAN	Magenta
5	P-S	ICTAFRIT	Magenta
6	P-S	LOMAN	Magenta
7	W-H	ICTAFRIT	Magenta
8	W-H	LOMAN	Magenta
9	KIM	ICTAFRIT	Magenta
10	KIM	LOMAN	Magenta
11	H-S	ICTAFRIT	Magenta
12	H-S	LOMAN	Magenta

Cuadro 9 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

CONCENTRACIÓN QUÍMICA EN CADA MEDIO DE CULTIVO (mg/l)						
CONSTITUYENTES INORGÁNICOS ORGANICOS Y REGULADORES DE CRECIMIENTO	MEDIO K-O	MEDIO M-S	MEDIO W-H	MEDIO KIM	MEDIO H-S	MEDIO P-S
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650	1,650
KNO <sub>3</sub>	1,900	1,900	2,200	1,900	1,900	1,900
Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	440	440	440	440	440
MgsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	370	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85	170	170	170
KI	083	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
MnsO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnsO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA. 2 H <sub>2</sub> O	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
Inositol	100	100	100	100	100	100
Acido nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Pantotenato /calcio	2.0 ml	---	---	---	---	---
Sulfato /putrescina	4.0	---	---	---	---	---
Vitaminas/Nich <sup>2</sup>	0.4 ppm	---	---	---	---	---
Sacarosa	90,000	70,000	90,000	70,000	70,000	90,000
Agar (Phitagel)	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
Cinetina	---	---	---	---	---	2.5
BAP	---	---	10.0	5.0	2.0	---
CCC.	---	---	---	---	---	500

## NOTA:

1. **KO** = Medio Ken Okabe ( 1,998 )
2. **M-S** = Medio Murashige y Skoog ( 1,962 )
3. **W-H** = Medio Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 )
4. **KIM** = Medio Y.C Kim ( 1,982 )
5. **H-S** = Medio Hussey G. y Stacey ( 1,984 )
6. **P-S** = Medio Palmer y Smith ( 1,969 )

### **6.8.6 Análisis de la información**

Para el procesamiento de la información derivada de las variables de respuesta planteadas para el presente experimento, se procedió a realizar un análisis de varianza para cada variable de respuesta, utilizando el diseño Bloques Completamente al Azar con arreglo bifactorial ( $2 \times 6$ ) en arreglo combinatorio de los tratamientos por medio de cultivo y por clon,. Como unidad experimental un recipiente Magenta, un recipiente Gerber y un tubo de cultivo para tres diseños experimentales independientes.

En los casos en los que se obtuvo diferencias significativas entre tratamientos o por variables de respuesta, se efectuaron análisis utilizando prueba de medias Duncan al 10 %.

### **6.8.7 Presentación de resultados**

Para la presentación de resultados mediante una cámara digital, se tomaron fotografías de las diferentes fases del experimento y se elaboraron cuadros y gráficas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos fueron distribuidos respecto a los recipientes, en función de las variables de respuesta propuestas para su análisis.

### 7.1 Recipiente Magenta

#### 7.1.1 Número de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de microtubérculos creciendo en 12 recipientes magenta, con 16 microesquejes creciendo en medios semisólidos de cultivo ( **Cuadro 10** ), no arrojó diferencias significativas para los clones Ictafrit y Loman, mas sí se encontraron diferencias altamente significativas para medios y para la interacción clon por medio.

**Cuadro 10** Análisis de varianza para la variable número de microtubérculos en recipiente Magenta.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE $F_c$	Pr > $F_c$
Clon	1	0.109	0.02	0.8805 NS
Medio	5	103.795	4.33	0.0013 **
Clon * Medio	5	103.795	4.33	0.0013 **
Error	99	474.957		
Total Corregido	121	743.836		

**C.V.**=18.92495

**R-cuadrado** = 0.361476

**Media general** = 11.57377049

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

NS No significativo ( > 5 % )

Pr >  $F_c$  = probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

#### 7.1.1.1 Número de microtubérculos según interacción clones por medio de cultivo

Como puede observarse en el **Cuadro 11**, el mayor número de microtubérculos para el clon Ictafrit se obtuvo con los medios: H-S, con una producción promedio de 140 microtubérculos y los medios W-H y M-S; con producción de 125 microtubérculos cada uno, en tanto que para el clon Loman, el mayor número promedio de microtubérculos se obtuvo con el medio H-S, con producción de 151 microtubérculos. De acuerdo al promedio general fue el clon Loman quien produjo un mayor número de microtuberculos 734 respecto a 714 microtubérculos producidos por el clon Ictafrit, resultado de la evaluación de seis medios.

**Cuadro 11 Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidos de la Interacción Clon \* Medio de cultivo para la variable número de microtubérculos producidos en recipientes Magenta.**

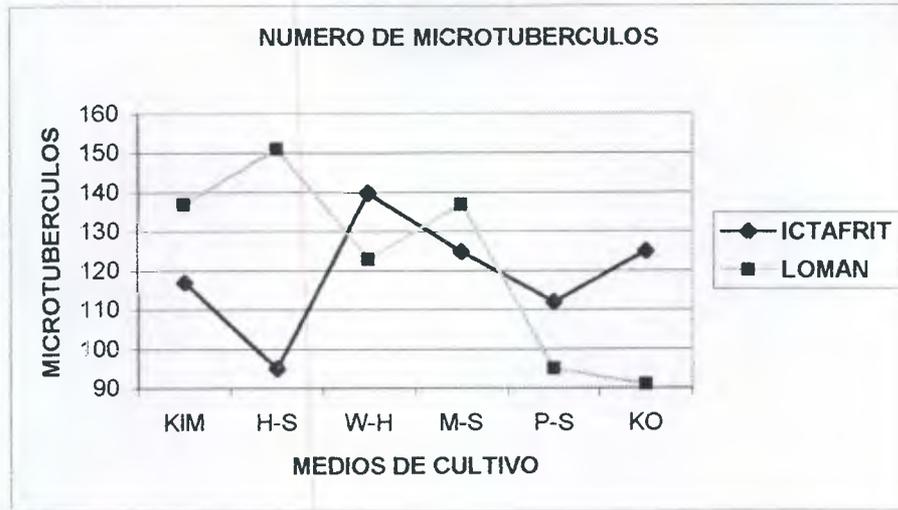
No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Número microtuberculos	Prueba de Duncan al 10%			
1	ICTAFRIT	H-S	140	A			
2	ICTAFRIT	W-H	125	A	B		
3	ICTAFRIT	M-S	125	A	B		
4	ICTAFRIT	P-S	117	A	B	C	
5	ICTAFRIT	KO	112			C	D
6	ICTAFRIT	KIM	95				D
7	LOMAN	H-S	151	A			
8	LOMAN	P-S	95	A	B		
9	LOMAN	KIM	137		B		
10	LOMAN	M-S	137		B	C	
11	LOMAN	W-H	123			C	D
12	LOMAN	KO	91				D

El comportamiento manifestado a través del número de microtubérculos producidos en promedio mediante el uso comparativo de seis medios semisólidos de cultivo: KIM, H-S, W-H, M-S, P-S y KO, en recipiente Magenta, para la inducción de microtubérculos en los clones: LOMAN; e ICTAFRIT, permite identificar: que para el clon Loman, el mejor medio evaluado para la variable número de microtubérculos fue: H-S conteniendo 2.0 mg / l de BAP y 70,000 mg / l de sacarosa que produjo un número de 151 microtubérculos.

Para el clon Ictafrit, de igual forma el mejor medio fue H-S, quien produjo un número de 140 microtubérculos, lo que permitió demostrar que la citoquinina BAP, tuvo relación directa en el proceso facilitador influyendo sobre una microtuberización más acelerada; ya que de igual forma pudo comprobarse que los medios conteniendo diferentes concentraciones de BAP (WH-KIM y H-S) microtuberizaron rápidamente, específicamente 25 días posterior a la inducción siendo los primeros medios en mostrar brotes de microtubérculos.

Comprobándose fehacientemente lo establecido en los estudios de Palmer y Smith, 1,964 (47) en relación a que las citocininas pueden actuar estimulando la inducción de tubérculos acelerando los procesos metabólicos, pero sin estar asociado directamente con la síntesis de una proteína específica.

**Figura 1. Interacción CLON \* MEDIO DE CULTIVO para la variable número de microtubérculos, producidos en recipientes Magenta.**



**REFERENCIA:** KO : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,993 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H:** medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S:** medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ) . **KIM :** medio desarrollado por Y.C. Kim ( 1,982), **H-S:** medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S :** medio desarrollado por Palmer y Smith (1,969).

### 7.1.2 Peso de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta peso de microtubérculos creciendo en recipiente magenta ( **Cuadro 12** ) muestra diferencias altamente significativas para los factores clones, medio y la interacción clon por medio.

**Cuadro 12. Análisis de varianza para la variable peso de microtubérculos producidos en recipientes Magenta.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	83364.684	72.73	0.0001 **
Medio	5	96819.663	16.89	0.0001 **
Clon * Medio	5	33857.503	5.91	0.0001 **
Error	99	113478.696		
Total corregido	121	338986.341		

C.V.= 29.61847

R-Cuadrado = 0.665241

Media General =114.3080911

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

NS No significativo ( >5 % )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

### 7.1.2.1 Peso de microtubérculos, según la interacción clones por medio de cultivo

Como se puede observar en el cuadro 13, el mayor peso promedio en miligramos, de los microtubérculos producidos para el clon ICTAFRIT, se obtuvo con los medios de KO, con un peso promedio de 2,125 miligramos, y el medio M-S con 1,996 miligramos respectivamente; en tanto que para el clon LOMAN, los valores más altos en términos de rendimiento en peso de los microtubérculos, se obtuvo con los medios M-S con 1,454 miligramos y el medio de H-S, con 1,026 miligramos.

**Cuadro 13. Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidas de la interacción clones \* Medio de cultivo para la variable peso de microtubérculos, en recipientes Magenta.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Peso de microtuberculos(mg)	Prueba de medias Duncan al 10%			
1	ICTAFRIT	KO	2,125	A			
2	ICTAFRIT	M-S	1,996	A			
3	ICTAFRIT	P-S	1,336		B		
4	ICTAFRIT	H-S	1,324		B	C	
5	ICTAFRIT	W-H	1,096			C	D
6	ICTAFRIT	KIM	793				D
7	LOMAN	M-S	1,454	A			
8	LOMAN	H-S	1,026	A	B		
9	LOMAN	KO	950		B		
10	LOMAN	KIM	778		B	C	
11	LOMAN	P-S	728			C	D
12	LOMAN	W-H	565				D

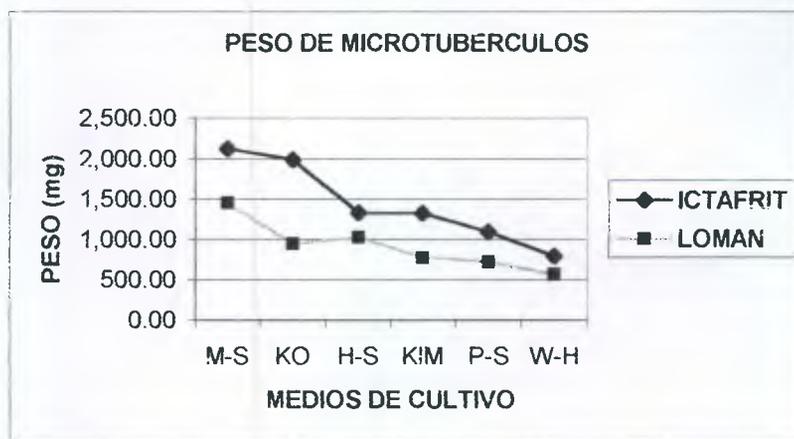
El peso de los microtubérculos, no es del todo el reflejo de su tamaño, lo cual quedó demostrado en la etapa de toma de datos sobre la variable peso en miligramos de los microtubérculos producidos, ya que por medio de la balanza analítica se logró observar casos en los cuales microtubérculos de mayor tamaño presentaban un peso menor y microtubérculos de menor tamaño presentaban un peso mucho mayor que uno de mayor tamaño, debido en cierta forma a que algunos microtubérculos guardan mayor cantidad de agua mientras otros, poseen más contenido de materia seca y no tanto contenido de agua.

Comparativamente la sumatoria del valor promedio de pesos en miligramos de los microtubérculos producidos con los clones Ictafrit y Loman evaluados en seis medios semisólidos de cultivo, demuestra que el clon Ictafrit produjo un total en peso de 8,670.0

miligramos en 714 microtubérculos y el clon Loman produjo un total en peso de 5,501 miligramos en 734 microtubérculos producidos. ( cuadro 43A y 44 A del apéndice), destacando para los dos clones; los medios KO y M-S como los mejores productores de microtubérculos de mayor peso en miligramos, información por demás importante, cuando se requiera la implementación de otras fases de multiplicación de materiales, como en los programas de certificación de semillas, donde se requieren cantidades altas de material inicial (microtubérculos), la elección para garantizar buenos resultados, es el uso del clon Loman y cuando se requiera de una mayor producción en peso, la elección debe ser el clon Ictafrit.

Simko, 1,994 y Abbot y Belcher 1,986, determinaron, que incrementando la concentración de sacarosa en el medio, se incrementa el porcentaje de tuberización e incrementa el peso de los mismos, y que las bajas concentraciones de sacarosa influyen en gran medida inhibiendo el proceso aún con presencia de clorocolina CCC lo cual quedó demostrado con el medio KO Y P-S.

**Figura 2 Interacción CLON \* MEDIO DE CULTIVO, para la variable peso de microtubérculos en miligramos, para el recipiente Magenta.**



**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por C. E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.1.3 Longitud de los microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta longitud de microtubérculos promedio (en milímetros), para el recipiente Magenta ( Cuadro 14 ), permitió establecer diferencias altamente significativas para el factor clon, medio y clon por medio de cultivo.

**Cuadro 14. Análisis de varianza para la variable longitud de microtubérculos en Recipientes magenta.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	238.053	79.09	0.0001 **
Medio	5	142.143	9.45	0.0001 **
Clon * Medio	5	36.372	2.42	0.0412 **
Error	99	297.977		
Total corregido	121	724.301		

**R-cuadrado**  
0.588601

**C.V.**  
11.14283

**Media General**  
15.5696267

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

NS No significativo ( 5 % )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

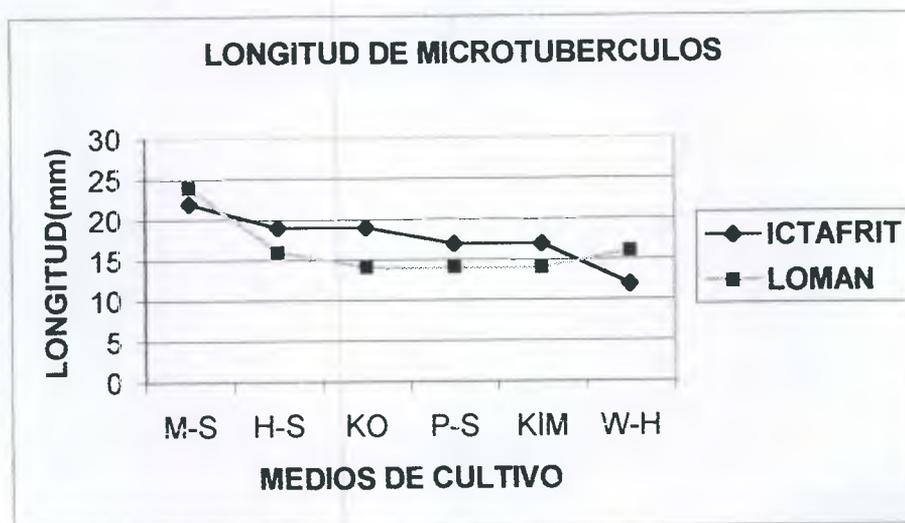
#### 7.1.3.1 Longitud de microtubérculos según interacción clones por medio de cultivo.

Con la utilización de la prueba de medias Duncan ( Cuadro 15 ) se pudo determinar que para la interacción clones Ictafrit y Loman en seis medios semisólidos de cultivo; para la variable de respuesta longitud de microtubérculos con el clon experimental Ictafrit, el mejor medio fue M-S con microtubérculos con producción promedio de 22 milímetros, en tanto que para el clon comercial Loman el medio que favoreció en mejor forma la elongación de los microtubérculos fue M-S con microtubérculos de 24 milímetros en promedio.

**Cuadro 15. Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidas de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable longitud de microtubérculos en recipientes magenta.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Longitud microtuberculos(mm)	Prueba de Duncan al 10%			
1	ICTAFRIT	M-S	22	A			
2	ICTAFRIT	H-S	19		B		
3	ICTAFRIT	KO	19		B		
4	ICTAFRIT	W-H	17		B	C	
5	ICTAFRIT	P-S	17		B	C	
6	ICTAFRIT	KIM	12			C	D
7	LOMAN	M-S	24	A			
8	LOMAN	H-S	16		B		
9	LOMAN	KO	14		B	C	
10	LOMAN	P-S	14		B	C	
11	LOMAN	KIM	14		B	C	
12	LOMAN	W-H	16				D

La **figura 3** muestra el comportamiento de las longitudes de los microtubérculos en milímetros según medio de cultivo, cabe indicar que el factor longitud, se vio afectado por las características genotípicas y fenotípicas de los materiales experimentales, que a decir de los resultados; son bastantes similares.



**Figura 3.** Interacción CLON \*MEDIO DE CULTIVO, para la variable de respuesta longitud de los microtubérculos para el recipiente Magenta.

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C. Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por C.E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

#### 7.1.4 Diámetro de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta; diámetro de microtubérculos en milímetros, producidos en recipientes magenta ( **Cuadro 16** ) arrojó diferencias altamente significativas para clones y medios y la interacción clon por medio, reflejada en términos de diámetros promedios (en milímetros) de los microtubérculos producidos.

Destacando para el clon Ictafrit, como el mejor medio, H-S con microtubérculos de 9 milímetros en promedio y para el clon Loman el mejor medio fuè M-S con microtubèrculos de 9 milímetros en promedio. (**cuadro 17**).

**Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable Diámetro de microtubérculos, clones Loman e Ictafrit, creciendo en recipientes Magenta.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	17.329	13.27	0.0004 **
Medio	5	56.826	8.7	0.0001 **
Clon * Medio	5	25.746	3.94	0.0027 **
Error	99	129.283		
Total corregido	121	252.882		

**C. V. = 18.64684                      R-Cuadrado = 0.488761                      Media General = 6.12841885**

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

**NS** No significativo ( >5% )

**Pr > Fc** Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

#### 7.1.4.1 Diámetro de microtubérculos según interacción clones por medio de cultivo.

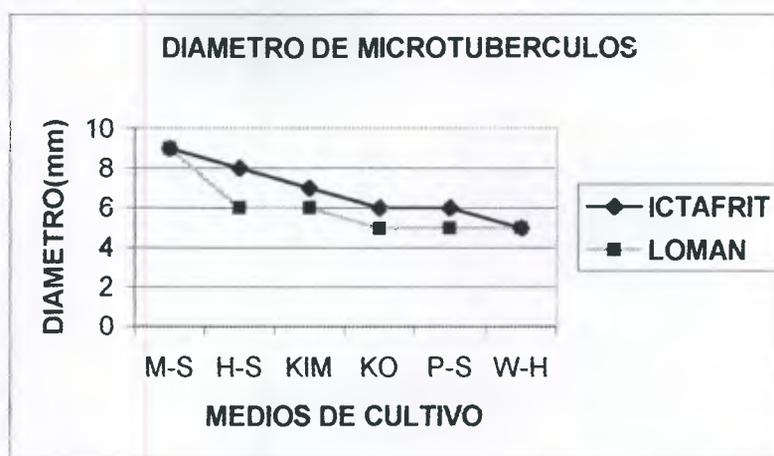
En el cuadro 17 puede apreciarse claramente que como resultado de la interacción clon \* medio para la variable de respuesta diámetro de microtubérculos producidos en promedio, el mejor medio, para el clon Ictafrit fue : H-S, con diámetros de 9 mm y para el clon Loman el mejor medio fue M-S con 9 mm.

**Cuadro 17 Prueba de medias Duncan al 10 % resultado de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable diámetro de microtubérculos en Magentas.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Diámetro de microtuberculos(mm)	Prueba Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	H-S	9	A		
2	ICTAFRIT	M-S	8	A	B	
3	ICTAFRIT	KO	7	A	B	
4	ICTAFRIT	W-H	6		B	
5	ICTAFRIT	P-S	6		B	
6	ICTAFRIT	KIM	5			C
7	LOMAN	M-S	9	A		
8	LOMAN	H-S	6		B	
9	LOMAN	KIM	6		B	
10	LOMAN	KO	5		B	C
11	LOMAN	P-S	5		B	C
12	LOMAN	W-H	5		B	C

La respuesta de los clones Ictafrit y Loman, evaluados en seis medios semisólidos de cultivo, permitió demostrar una similar respuesta de los diferentes medios y para ambos clones en términos de diámetro en milímetros de los microtubérculos producidos, como puede apreciarse en el cuadro 17 y en la figura 4 y verificado a través de la prueba de Duncan al 10% lo cual permite indicar que, tanto la longitud como el diámetro de los microtubérculos, son

factores intrínsecamente ligados a las características genotípicas y fenotípicas de los materiales. El aspecto a destacar es que el ccc y la cinetina contenida en el medio P-S no ayuda a incrementar el diámetro de los microtubérculos, de igual forma el BAP por si solo tampoco favorece el incremento de los diámetros de los microtubérculos, en tanto que la cinetina acompañada de BAP favorece el incremento del diámetro en los microtubérculos como se puede apreciar en los medios KO y M-S.



**Figura 4. Interacción CLON \* MEDIO DE CULTIVO, para la variable diámetro de Microtubèrculos, para el recipientes Magenta.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), **W-H**: medio desarrollada por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y. C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por C. E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

#### 7.1.5 Microtubérculos con brotes.

El análisis de varianza para la variable de respuesta microtubérculos con brotes, producidos en recipientes magenta ( **Cuadro 18** ) demuestra diferencias altamente significativas para medios y la interacción clon por medio.

**Cuadro 18. Análisis de varianza para la variable microtubérculos con brotes para los clones Loman e ictafrit producidos en recipientes magenta.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > F
Clon	1	1604.27	18.92	0.0001 **
Medio	5	3001.824	7.08	0.0001 **
Clon * Medio	5	2278.692	5.37	0.002 **
Error	99	8394.79		
Total corregido	121	16516.358		

C.V. = 11.14283

R-cuadrado = 15.56962672

Media General = 0.588601

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

NS No significativo ( 5% )

Pr &gt; Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada.

### 7.1.5.1 Microtubérculos con brotes según interacción clon\* medio, producidos en recipientes magenta.

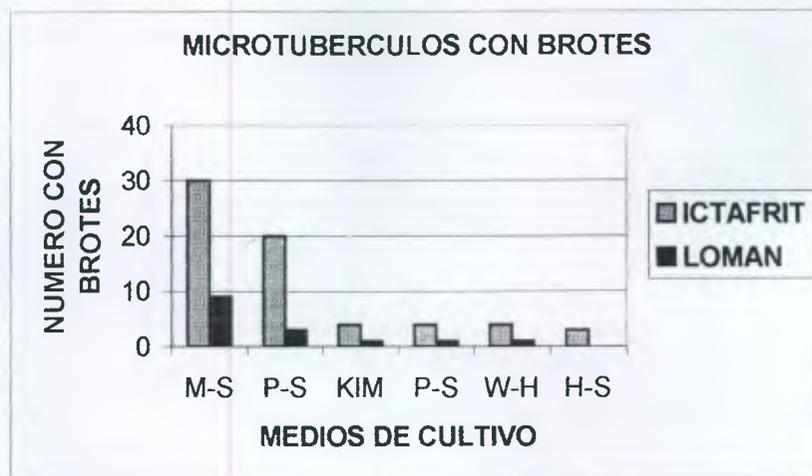
Puede apreciarse claramente en el Cuadro 19 que para la variable microtubérculos con brotes producto de la interacción de los clones Ictafrit y Loman evaluados en seis medios semisólidos, los mejores resultados se obtuvieron; para el clon Ictafrit, con el medio KO con 30 microtubérculos con brotes y M-S con 20 microtubérculos con brotes, en tanto que para el clon Loman, el mejor medio fue M-S con producción de 9 microtubérculos con brotes.

**Cuadro 19. Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidos de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable microtubérculos con brotes en recipientes magenta.**

No. tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Microtubérculos con brotes	Prueba de Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	KO	30	A		
2	ICTAFRIT	M-S	20	A	B	
3	ICTAFRIT	KIM	4		B	C
4	ICTAFRIT	H-S	4		B	C
5	ICTAFRIT	W-H	4		B	C
6	ICTAFRIT	P-S	3			C
7	LOMAN	M-S	9	A		
8	LOMAN	P-S	3	A	B	
9	LOMAN	KIM	1		B	C
10	LOMAN	P-S	1		B	C
11	LOMAN	W-H	1		B	C
12	LOMAN	H-S	0			C

El cuadro 19 y figura 5 reflejan el comportamiento de los microtubérculos formados a partir de los clones Ictafrit y Loman evaluados en seis medios semisólidos para la variable microtubérculos con brotes, donde se puede observar que los datos no fueron homogéneos para el clon Loman ya que se produjeron altibajos en los valores, a excepción del clon Ictafrit donde fue manifiesto que los medios KO y M-S fueron los que abundantemente produjeron

mas microtubèrculos con brotes, para ambos clones en todos los seis medios semisólidos evaluados.



**Figura 5. Interacción CLON\* MEDIO DE CULTIVO, para la variable microtubérculos con brotes, para el recipiente magenta.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po- Jen Wan y Ching-Yeh hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por C. E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

**Cuadro 20. Resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de cinco variables de respuesta en 144 recipientes Magenta, 6 medios semisólidos de cultivo, 2 clones con 16 explantes creciendo en cada recipiente ( 2,304 en total ) con un tiempo de incubación de sesenta días.**

Tratamiento	Clon	Medio	No. microtubérculos	Peso (mg)	Longitud (mm)	Diámetro(mm)	con Brotes
1	ICTAFRIT	H-S	140	1,324	19	9	4
2	ICTAFRIT	M-S	125	1,996	22	8	20
3	ICTAFRIT	W-H	125	1,096	17	6	4
4	ICTAFRIT	P-S	117	1,336	17	6	3
5	ICTAFRIT	KO	112	2,125	19	7	30
6	ICTAFRIT	KIM	95	793	12	5	4
7	LOMAN	P-S	195	728	14	5	3
8	LOMAN	H-S	151	1,026	16	6	0
9	LOMAN	KIM	137	778	14	6	1
10	LOMAN	M-S	137	1,454	24	9	9
11	LOMAN	W-H	123	565	16	5	1
12	LOMAN	KO	91	950	14	5	1

Los resultados obtenidos son bastante significativos si se tiene en cuenta que la literatura revisada sobre microtuberización en países como Chile, Colombia y México; reporta que a través del uso de la técnica de la tuberización *in vitro* se obtuvo 2.5 microtubérculos por cada 25 ml de medio tuberizador en el mejor de los casos y obtenidos en un lapso de 4 meses luego

de establecido el experimento, aunque con el uso de otras composiciones; de medios ya estandarizados.( 31) . Para el caso de este experimento y a manera de establecer una comparación con los valores de referencia bibliográfica y los mejores resultados obtenidos en la presente investigación, queda fehacientemente demostrado que con el uso por ejemplo del medio H-S para el clon Loman se obtuvo 151 microtuberculos en 1,200 mililitros de medio tuberizador, distribuidos en recipientes Magenta ( **Cuadro 49A, 50A y 51A del Apéndice, sobre distribución de medios**), es decir si la bibliografía reporta un promedio de 2.5 microtubèrculos por cada 25 mililitros de medio tuberizador , la presente investigación reporta un promedio de 3.15 microtubèrculos por cada 25 mililitros, es decir se tuvo una producción de microtubèrculos superior en 31 microtubèrculos màs de lo que reportan otras investigaciones.

Para el clon Ictafrit la presente investigación reporta que con el medio H-S se tuvo una producción de 140 microtubèrculos en un total de 1,200 mililitros distribuidos en recipientes Magenta, con un promedio de 2.9 microtubèrculos producidos en 25 mililitros, es decir 20 microtubèrculos màs de lo que reportan otras investigaciones.

Para el clon Ictafrit el medio que produjo un mayor número de microtubèrculos fue el medio H-S con producción de 140 microtubèrculos de un total esperado de 192 microtubèrculos, en 12 unidades experimentales conteniendo cada una 16 explantes y 12 repeticiones, en tanto que comparativamente el medio que produjo un menor número de microtubèrculos fue el medio de KIM con producción promedio de unicamente 95 microtubèrculos producidos.

Para el clon Ictafrit, el medio que produjo microtuberculos de mayor peso promedio en miligramos fue el medio KO con 2,125 miligramos en unicamente 112 microtubèrculos producidos, respecto a H-S que produjo 140 microtubèrculos pero de menor peso. En tanto que comparativamente el medio que produjo microtubèrculos de menor peso promedio, fue KIM con 793 miligramos en unicamente 95 microtubèrculos de un total esperado de 192 microtubèrculos.

Para el clon ictafrit, el medio que produjo microtubèrculos de mayor tamaño promedio en términos de diámetro en milímetros y longitud en milímetros fue el medio M-S con diámetros promedio de 8 milímetros y longitud promedio de 22 milímetros, en tanto el medio que produjo menor tamaño promedio fue KIM, con diámetro promedio de 5 y longitud promedio de 12 milímetros.

Para el clon Ictafrit, el medio que produjo un mayor número de microtubérculos con brotes fue KO con 30 microtubérculos con brotes y el medio que produjo un menor número fue P-S con escasamente 3 microtubérculos con brotes.

Para el clon Loman el medio que produjo un mayor número de microtubérculos fue el medio H-S, con producción promedio de 151 microtubérculos de un total esperado de 192 microtubérculos en 12 unidades experimentales; conteniendo cada una 16 explantes creciendo en seis medios de cultivo y 12 repeticiones, en tanto que comparativamente el medio que produjo un menor número de microtubérculos, fue el medio KO, con producción promedio de 91 microtubérculos de un total esperado de 192 microtubérculos.

Para el clon Loman, el medio que produjo microtubérculos de mayor peso promedio; fue el medio M-S con 1,454 miligramos en 137 microtubérculos producidos; 14 microtubérculos menos que el medio H-S, que fue el mayor productor, con 151 microtubérculos. En tanto que comparativamente el medio que produjo microtubérculos de menor peso fue P-S, con 728 miligramos en únicamente 95 microtubérculos de un total esperado de 192 microtubérculos.

Para el clon Loman, el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño promedio, en términos de diámetro en milímetros y longitud en milímetros, fue el medio M-S, con diámetro promedio de 9 milímetros y longitud de 24 milímetros, en tanto que comparativamente el medio que produjo microtubérculos de menor tamaño promedio fue W-H, con diámetro promedio de 5 milímetros y longitud promedio de 13 milímetros.

Para el clon Loman, el medio que produjo un mayor número de microtubérculos con brotes, fue M-S, con formación de 9 microtubérculos con brotes y el medio H-S, no produjo brotes.

## 7.2 Recipiente Gerber

### 7.2.1 Número de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de microtubérculos producidos en 5 recipientes Gerber, con 5 microesquejes sembrados por cada medio de cultivo ( **Cuadro 21** ) no arrojó diferencias significativas para clones, ni para la interacción clon por medio, lo cual es un indicativo de que ambos clones produjeron un igual número de

microtubérculos en cada medio. Cabe indicar que entre medios de cultivo sí se encontraron diferencias significativas, lo cual se demuestra en el **Cuadro 21**.

**Cuadro 21. Análisis de varianza para la variable número de microtubérculos producidos en recipientes Gerber.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	442.64	1.75	0.1975 NS
Medio	5	5935.58	4.70	0.037 **
Clon * Medio	5	1073.58	0.85	0.5277 NS
Error	25	6313.33		
Total corregido	36	14508.11		

C.V = 20.99921

R-cuadrado = 0.564841

Media general = 75.67567568

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

NS No significativo ( > 5% )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

#### 7.2.1.1 Número promedio de microtubérculos producidos por medio de cultivo en recipientes Gerber.

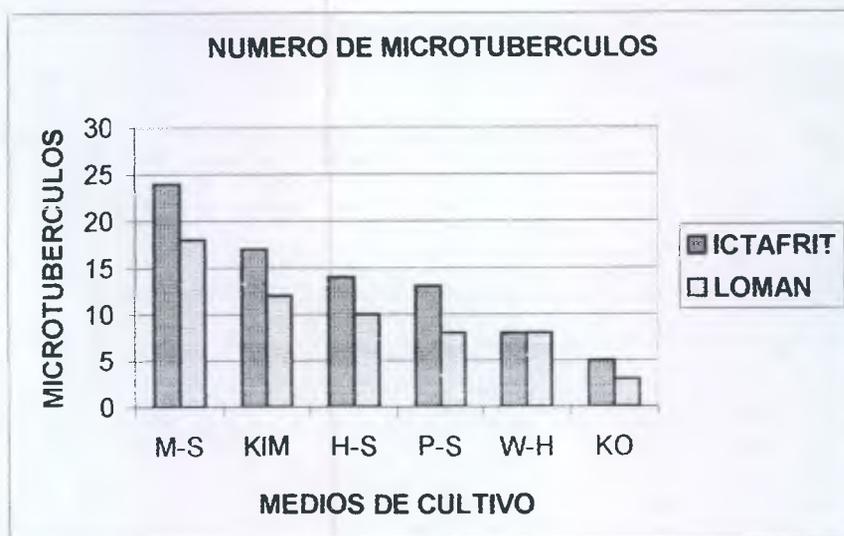
Sobre esta variable el modelo es significativo y no se identificó interacción clon por medio, ni efecto de clon, en cambio si se encontró alta significancia para medios, lo cual es un indicativo de que el medio es un factor determinante en la producción de un mayor número de microtubérculos.

La prueba de medias Duncan (**Cuadro 22**), nos indica la relación existente entre medios y el número de microtubérculos producidos, donde destaca que para el clon Ictafrit el medio H-S, favoreció la formación de 24 microtubérculos para un promedio total de 81 microtubérculos producidos con los seis medios evaluados; en tanto que para el clon Loman, el medio M-S, produjo 18 microtubérculos, para un promedio total de 59 microtubérculos, mediante la evaluación de los distintos medios evaluados.

**Cuadro 22** Prueba de medias Duncan al 10 %, obtenidos de la variable número de microtubérculos promedio, en recipientes Gerber.

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Numero de Microtubérculos	Prueba Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	H-S	24	A		
2	ICTAFRIT	P-S	17	A	B	
3	ICTAFRIT	KIM	14		B	
4	ICTAFRIT	W-H	13		B	
5	ICTAFRIT	KO	8		B	C
6	ICTAFRIT	M-S	5			C
7	LOMAN	M-S	18	A		
8	LOMAN	KIM	12	A	B	
9	LOMAN	H-S	10		B	
10	LOMAN	P-S	8		B	C
11	LOMAN	W-H	8		B	C
12	LOMAN	KO	3			C

En el **Cuadro 22** puede observarse el comportamiento de los medios respecto al número de microtubérculos producidos donde destaca que el medio H-S, con concentraciones de 70,000 mg/l de sacarosa y concentraciones de BAP, constituyó el mejor de los seis medios evaluados para ambos clones, quedando con ello demostrado una vez más que la concentración de sacarosa en asociación con concentraciones de BAP estimulan la inducción de microtubérculos, la relación medio de cultivo y producción de microtubérculos puede apreciarse en la **figura 6**.



**Figura 6.** Relación medio de cultivo\* número de microtubérculos producidos

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y. C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por Palmer C.E. y O.E. Smith ( 1,969 ).

## 7.2.2 Peso de Microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta peso de microtubérculos, no arrojó diferencias significativas ni para clones, ni para la interacción clon por medio, pero sí existe alta significancia para el factor medio, lo cual nos indica que este influye en forma determinante en el peso de los microtubérculos, según puede identificarse en el **Cuadro 23**.

**Cuadro 23** Análisis de varianza para la variable Peso promedio de microtubérculos en Recipientes Gerber.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	1564.172	0.25	0.6226 NS
Medio	5	153133.688	4.86	0.0030 **
Clon * Medio	5	17207.177	0.55	0.7395 NS
Error	25	157467.242		
Total Corregido	36	328749.56		

C.V. =51.80729

R-Cuadrado = 0.521012

Media General =153.19135135

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

NS No significativas

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

### 7.2.2.1 Peso promedio de los microtubérculos producidos en los diferentes medios

La prueba de medias Duncan (**Cuadro 24**), permite determinar el comportamiento de los pesos de los microtubérculos producidos en recipientes magenta mediante la evaluación de los medios KO, M-S, H-S, W-H y KIM donde destaca que para clon Ictafrit, el mejor medio lo constituyó P-S con un promedio en peso de los microtubérculos producidos de 1,079 miligramos correspondiente a un total de 21 microtubérculos .

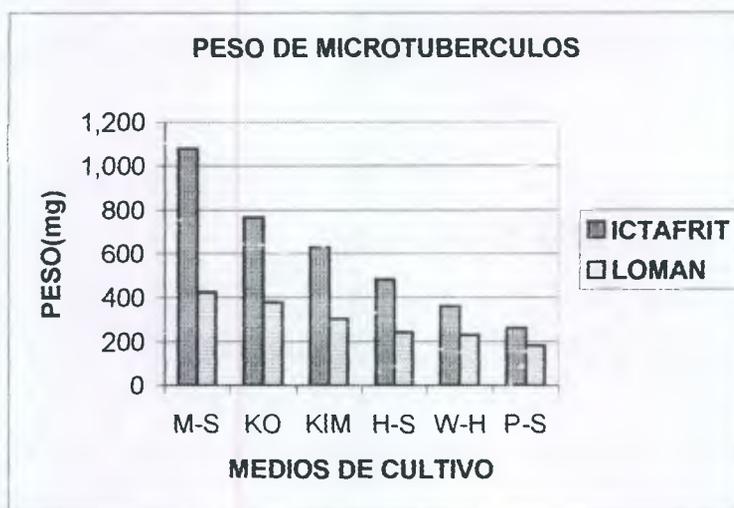
Para el clon Loman el mejor medio fue M-S con un promedio en peso de los microtubérculos producidos de 424 miligramos correspondiente a un total de 18 microtubérculos.

**Cuadro 24. Prueba de medias Duncan al 10% obtenida de la variable peso promedio de microtubérculos en recipientes Gerber.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Peso de microtuberculos(mg)	Prueba de medias Duncan al 10%			
1	ICTAFRIT	P-S	1,079	A			
2	ICTAFRIT	KO	766	A	B		
3	ICTAFRIT	H-S	628		B		
4	ICTAFRIT	W-H	484		B	C	
5	ICTAFRIT	KIM	362			C	D
6	ICTAFRIT	M-S	262				D
7	LOMAN	M-S	424	A			
8	LOMAN	KO	380	A	B		
9	LOMAN	KIM	303		B		
10	LOMAN	H-S	242		B	C	
11	LOMAN	W-H	231			C	D
12	LOMAN	P-S	181				D

Utilizando la prueba de medias Duncan (**Cuadro 24**) se determinó que el mayor peso en miligramos de los microtubérculos producidos para el clon Ictafrit, corresponde al medio P-S, el cual puede identificarse como el mejor medio y para el clon Loman corresponde al medio M-S, para los diferentes medios de cultivo evaluados.

La diferencia establecida se explica para algunos casos, en la posibilidad de que algunos microtubérculos almacenan una mayor cantidad de agua, mientras que otros poseen una mayor cantidad de materia seca.



**Figura 7. Peso promedio de microtubérculos.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por Palmer C.E. y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.2.3 Longitud promedio de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta Longitud de los microtubérculos en milímetros, para el recipiente Gerber ( **Cuadro 25** ), nos demuestra que no existe diferencia significativa para el factor medio, ni para la interacción clon por medio, lo cual indica que las elongaciones de los microtubérculos producidos obedecen a un patrón similar.

**Cuadro 25** Análisis de varianza para la variable Longitud de microtubérculos, en recipientes Gerber.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr Fc
Clon	1	0.34400057	4.71	0.0398 *
Medio	5	0.70609170	1.93	0.1246 NS
Clon * Medio	5	0.41628267	1.14	0.3661 NS
Error	25	1.82738667		
Total corregido	36	3.76642703		

**C.V** = 15.47744

**R-cuadrado** = 0.541009

**Media General** = 17.6518018

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

**NS** No significativo ( 5 % )

**Pr > Fc** Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

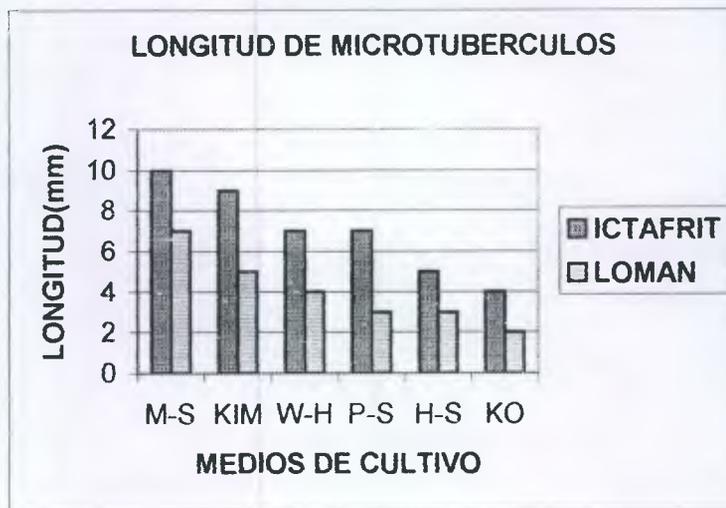
#### 7.2.3.1 Longitud promedio de los microtubérculos producidos con los diferentes medios en recipientes Gerber

El **Cuadro 26** permite identificar que el medio P-S, produjo microtubérculos con longitud medible en promedio de 10 milímetros, respecto a un promedio total de 42 milímetros correspondiente a los seis medios evaluados correspondientes al clon Ictafrit; en tanto que para el clon Loman el mejor de los medios fue M-S, que produjo microtubérculos con longitud medible en promedio de 7 milímetros, comparativamente a un promedio total de 24 milímetros alcanzados con la evaluación de los seis medios.

**Cuadro 26. Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidos de la variable longitud de microtubérculos en recipientes Gerber.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Longitud microtuberculos(mm)	Prueba de Duncan al 10%			
1	ICTAFRIT	P-S	10	A			
2	ICTAFRIT	H-S	9		B		
3	ICTAFRIT	W-H	7		B		
4	ICTAFRIT	KO	7		B		
5	ICTAFRIT	KIM	5			C	
6	ICTAFRIT	M-S	4				D
7	LOMAN	M-S	7	A			
8	LOMAN	KIM	5		B		
9	LOMAN	W-H	4		B	C	
10	LOMAN	P-S	3			C	
11	LOMAN	H-S	3			C	
12	LOMAN	KO	2				D

La figura 8 nos muestra el comportamiento de los valores arrojados de la variable longitud de microtubérculos, característica influenciada por las propiedades fenotípicas y genotípicas de los materiales en estudio y puede afirmarse en base a los resultados que los mismos no difieren en gran medida de clon a clon. ( Cuadro 26 ) .



**Figura 8. Longitud promedio de microtubérculos.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), **W-H** medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por Palmer C.E. y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.2.4 Diámetro de microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta; diámetro de microtubérculos en recipientes Gerber, no arrojó diferencias significativas para la interacción clon por medio, ni para el factor medio, únicamente para el factor clon, lo cual es un indicativo de que el diámetro de los microtubérculos formados se encuentran influenciados en gran medida por el genotipo de los materiales experimentales y no del medio de cultivo, como puede apreciarse en el Cuadro 27.

**Cuadro 27. Análisis de varianza para la variable Diámetro promedio de microtubérculos para los clones Loman e Ictafrit en recipientes Gerber.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr	Fc
Clon	1	0.00030827	0.01	0.9361	NS
Medio	5	1.59767536	6.79	0.0004	**
Clon * Medio	5	0.33976820	1.44	0.2434	NS
Error	25	1.17667000			
Total Corregido	36	3.24161081			

C.V = 17.68475

R-Cuadrado = 0.637011

Media General = 1.22675676

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas al ( 5% )

NS No significativo ( 5% )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

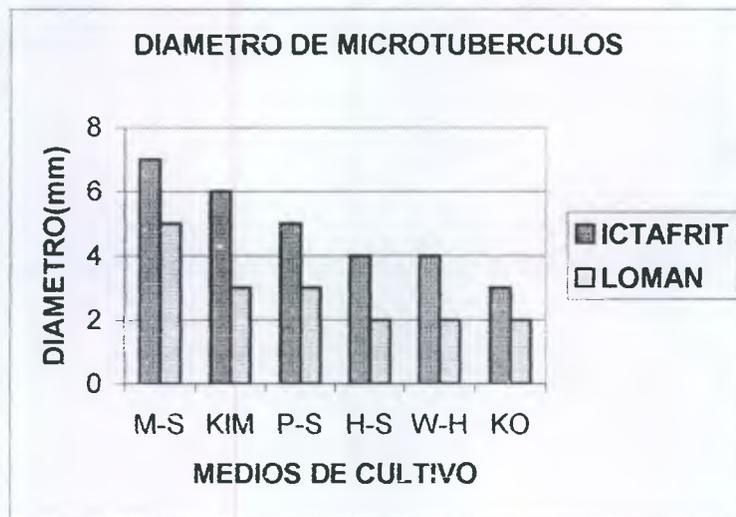
#### 7.2.4.1 Diámetro promedio de los microtubérculos producidos en seis medios de Cultivo en recipientes Gerber.

El cuadro 28 permite determinar que el clon Ictafrit produjo microtubérculos con mayor diámetro promedio total de 29 milímetros como diámetro, resultado de la evaluación de los seis medios de cultivo, donde destaca que el medio P-S con producción de microtubérculos de 7 milímetros de diámetro y para el clon Loman se obtuvo un promedio total en milímetros de 17 milímetros como diámetro, donde destaca el medio M-S, como el mejor con 5 milímetros, lo cual se evidencia en la prueba de medias Duncan al 10% .

**Cuadro 28 Prueba de medias Duncan al 10 % resultado de la interacción Clon\* Medio de cultivo para la variable diámetro de microtubérculos en Gerber.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Diámetro de microtubérculos(mm)	Prueba Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	P-S	7	A		
2	ICTAFRIT	H-S	6	A	B	
3	ICTAFRIT	KO	5		B	
4	ICTAFRIT	W-H	4		B	
5	ICTAFRIT	KIM	4		B	
6	ICTAFRIT	M-S	3			C
7	LOMAN	M-S	5	A		
8	LOMAN	KIM	3		B	
9	LOMAN	P-S	3		B	
10	LOMAN	H-S	2		B	C
11	LOMAN	W-H	2		B	C
12	LOMAN	KO	2		B	C

La figura 9 muestra el comportamiento de los microtubérculos producidos para los clones Ictafrit y Loman evaluados con los seis medios semisólidos de cultivo; para la variable diámetro de los microtubérculos en milímetro, donde se aprecia la respuesta positiva de los medios P-S y M-S como los mejores.



**Figura 9. Relación medio de cultivo por diámetro de microtubérculos.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por Palmer C.E. y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.2.5 Microtubérculos con brotes.

El factor clon no mostró diferencias significativas en cuanto a microtubérculos con brotes (Cuadro 29), lo que permite indicar que el apareamiento de brotes en los microtubérculos producidos, no se ve afectado por el factor clon. En el factor medio de cultivo, la respuesta de los explantes a la brotación mostró diferencias altamente significativas, lo cual es un indicativo de que la presencia de brotes en los microtubérculos producidos se ve afectado por el factor medio de cultivo.

**Cuadro 29 Análisis de varianza para la variable porcentaje de microtubérculos con brotes para los clones Ictafrit y Loman producidos en recipientes Gerber.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr	Fc
Clon	1	237.99	0.76	0.3942	NS
Medio	5	4,338.65	2.76	0.0456	**
Clon * Medio	5	1,036.52	0.66	0.6581	NS
Error	21	6,604.07			
Total corregido	36	15,480.48			

C.V = 213.9594

R-cuadrado = 0.573394

Media general = 8.28828829

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 1 % )

NS No significativos ( 5 % )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la Fcalculada.

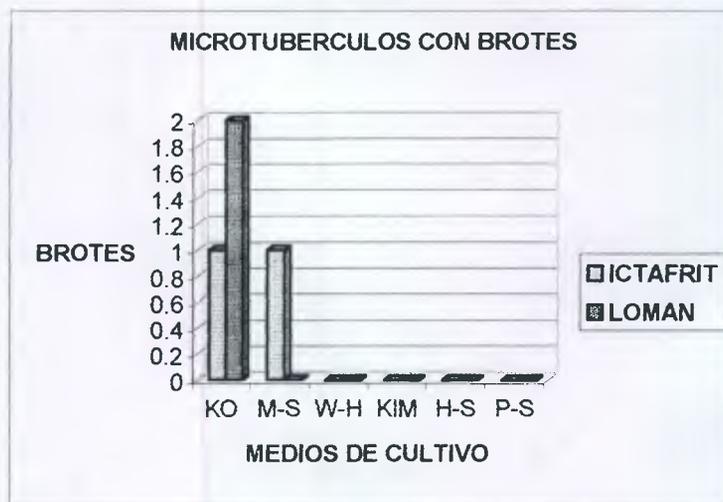
#### 7.2.5.1 Microtubérculos con brotes, clones Loman e Ictafrit en recipientes Gerber

El comportamiento de los microtubérculos producidos, demuestra que el apareamiento de brotes en los microtubérculos producidos no fue significativo, como puede apreciarse en el cuadro 30.

**Cuadro 30. Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidas de la variable microtubérculos con brotes en recipientes Gerber.**

No. tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Microtubérculos con brotes	Prueba de Duncan al 10%
1	ICTAFRIT	MS	1	A
2	ICTAFRIT	KIM	1	A
	ICTAFRIT	KO	0	
4	ICTAFRIT	W-H	0	
5	ICTAFRIT	H-S	0	
6	ICTAFRIT	P-S	0	
7	LOMAN	KO	2	A
8	LOMAN	M-S	0	
9	LOMAN	W-H	0	
10	LOMAN	KIM	0	
11	LOMAN	H-S	0	
12	LOMAN	P-S	0	

En el Cuadro 30, se puede observar que de los seis medios semisólidos evaluados, para los clones Ictafrit y Loman, fueron pocos los medios que manifestaron una reacción positiva, respecto a la producción de microtubérculos con brotes.



**Figura 10 Relación medio de cultivo por número de microtubérculos con brotes.**

**REFERENCIA:** **KO** : medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) **W-H**: medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ). **M-S**: medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ). **KIM** : medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982), **H-S**: medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S** : medio desarrollado por Palmer C.E. y O.E. Smith ( 1,969 ).

**Cuadro 31 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de cinco variables de respuesta, en 60 recipientes Gerber, 6 medios semisólidos de cultivo. 2 clones con 5 explantes creciendo en cada recipiente ( 300 en total ), con un tiempo de incubación de 60 días.**

Tratamiento	Clon	Medio	No. microtubérculos	Peso (mg)	Longitud (mm)	Diámetro(mm)	con Brotes
1	ICTAFRIT	H-S	24	628	9	6	0
2	ICTAFRIT	P-S	17	1,079	10	7	0
3	ICTAFRIT	KIM	14	362	5	4	1
4	ICTAFRIT	W-H	13	484	7	4	3
5	ICTAFRIT	KO	8	766	7	5	0
6	ICTAFRIT	M-S	5	262	4	3	1
7	LOMAN	M-S	18	424	7	5	0
8	LOMAN	KIM	12	303	5	3	0
9	LOMAN	H-S	10	242	3	2	0
10	LOMAN	W-H	8	231	4	2	0
11	LOMAN	P-S	8	181	3	3	0
12	LOMAN	KO	3	380	2	2	2

Los resultados generales obtenidos de la evaluación de las variables de respuesta en recipientes Gerber, permite indicar al igual que con el uso de recipientes Magenta, aquí también se superaron los promedios que reporta la literatura sobre evaluación de medios tuberizadores, en Chile, Colombia y lo descrito en los estudios de Roca 1,991; que indica que en los mejores de los casos y en cuatro meses de incubación se obtuvieron aproximadamente 2.5 microtubérculos por cada 25 mililitros de medio tuberizador, comparativamente, se puede demostrar por ejemplo que para el clon Ictafrit el medio H-S, produjo 24 microtubérculos en 150 mililitros de medio tuberizador, es decir; se obtuvo un promedio de 4 microtubérculos por cada 25 mililitros, lo que es lo mismo a decir que a través de esta investigación se obtuvo 9 microtubérculos más de lo esperado en otras investigaciones similares; aunque es preciso aclarar que con otros medios tuberizadores y clones diferentes.

Para el clon Ictafrit, el medio que produjo un mayor número de microtubérculos fue el medio H-S, con producción promedio de 24 microtubérculos de un total esperado de 25 microtubérculos, en 5 unidades experimentales, conteniendo cada una 5 explantes y 5 repeticiones, en tanto que comparativamente el medio que produjo, un menor número de microtubérculos; fue el medio M-S, con producción promedio de 5 microtubérculos de un total esperado de 25 microtubérculos.

Para el clon Ictafrit, el medio que produjo microtubérculos de mayor peso promedio, fue P-S, con 1,079 miligramos en 17 microtubérculos producidos, 7 menos que H-S que produjo 24 microtubérculos, pero de menor peso. En tanto que, comparativamente, el medio que produjo microtubérculos de menor peso promedio fue M-S, con 262 miligramos en únicamente 5 microtubérculos de un total esperado de 25 microtubérculos.

Para el clon Ictafrit, el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño promedio, en términos de diámetro en milímetros y longitud en milímetros, fue el medio P-S, con diámetro promedio de 7 milímetros y longitud promedio de 10 milímetros, en tanto que el medio que produjo, microtubérculos de menor tamaño promedio fue M-S, con diámetro promedio de 3 milímetros y longitud promedio de 4 milímetros.

Para el clon Ictafrit, los únicos medios que produjeron 1 microtubérculo con brote, fueron; el medio KIM, con un microtubérculo con brote de 14 producidos y M-S con un microtubérculo con brote de 5 producidos.

Para el clon Loman, el medio que produjo un mayor número de microtubérculos, fue el medio M-S, con producción promedio de 18 microtubérculos, de un total esperado de 25 microtubérculos, en 5 unidades experimentales; conteniendo cada una 5 explantes y 5 repeticiones.

En tanto que comparativamente, el medio que produjo un menor número de microtubérculos, fue el medio KO, con producción promedio de 3 microtubérculos de un total esperado de 25 microtubérculos.

Para el clon Loman, el medio que produjo microtubérculos de mayor peso promedio, fue M-S, con 423 miligramos, coincidentemente; el medio que produjo, un mayor número de microtubérculos. En tanto que el medio que produjo microtubérculos de menor peso promedio fue P-S, con 181 miligramos en únicamente 8 microtubérculos, de un total esperado de 25 microtubérculos.

Para el clon Loman, el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño promedio en términos de diámetro en milímetros y longitud en milímetros; fue el medio M-S, con diámetro promedio de 5 milímetros y longitud promedio de 7 milímetros, en tanto que el medio, que produjo microtubérculos de menor tamaño promedio fue KO, con diámetro promedio de 2 milímetros y longitud de 2 milímetros.

Para el clon Loman, el único medio que produjo microtubérculos con brotes, fue KO que produjo 2 microtubérculos con brotes.

### **7.3 Recipiente Tubo de cultivo.**

#### **7.3.1 Número de microtubérculos**

El análisis de varianza para la variable de respuesta número de microtubérculos creciendo en recipientes tubos de cultivo, arrojó diferencias altamente significativas para los factores: clon por medio y la interacción clon por medio, lo cual nos indica que el número de microtubérculos producidos, fueron altamente afectados por estos factores.

**Cuadro 32 Análisis de varianza para la variable Número promedio de microtubérculos clones Loman e Ictafrit en recipientes tubos de cultivo.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE Fc	Pr > Fc
Clon	1	0.826	8.16	0.0061**
Medio	5	7.17	14.17	0.0001**
Clon * Medio	5	2.61	5.16	0.0006**
Error	54	5.463		
Total corregido	70	19.746		

C.V.=21.10661

R-cuadrado =0.723311

Media General =1.50704225

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

NS No significativo ( 5 % )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la Fcalculada.

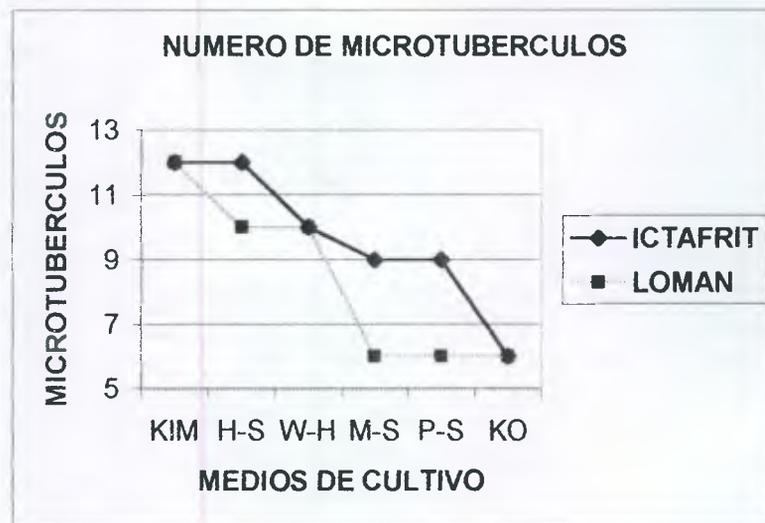
#### 7.3.1.1 Número de microtubérculos según interacción clones por medio en Tubos de cultivo.

El mayor número de microtubérculos ( **Cuadro 33** ), se logró con los medios P-S y KIM para el clon Ictafrit; cada uno con producción de 2 microtubérculos por microesqueje sembrado por tubo de cultivo en las seis repeticiones, para un total de 12 microtubérculos. En tanto que para el clon Loman el mayor número promedio de microtubérculos, se tuvo únicamente con el medio KIM con producción de 2 microtubérculos por microesqueje sembrado en tubo de cultivo mostrando al igual que en el primer caso el mismo comportamiento, con formación de 12 microtubérculos.

**Cuadro 33 Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidos de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable número de microtubérculos en tubos de cultivo.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Número microtuberculos	Prueba de Duncan al 10%	
1	ICTAFRIT	P-S	12	A	
2	ICTAFRIT	KIM	12	A	
3	ICTAFRIT	W-H	10	A	B
4	ICTAFRIT	H-S	9	A	B
5	ICTAFRIT	KO	9	A	B
6	ICTAFRIT	M-S	6		B
7	LOMAN	KIM	12	A	
8	LOMAN	H-S	10	A	B
9	LOMAN	W-H	10	A	B
10	LOMAN	M-S	6		B
11	LOMAN	P-S	6		B
12	LOMAN	KO	6		B

Los resultados sobre la variable de respuesta número promedio de microtubérculos en tubos de cultivo, permite identificar que el control hormonal de la tuberización como un proceso complejo, puede alterarse e inducir a la tuberización mediante el uso de antigibberelinas y una alta concentración de sacarosa ( 41 ), además indica que el efecto del BAP sobre la producción de microtubérculos, al igual que la cinetina, es diferente en cada tratamiento; mediante la prueba de Duncan, se pudo determinar que los medios P-S con concentración de 2.5 mg /l de cinetina + 500 mg/l de ccc y KIM con concentración de 5 mg/l de BAP poseen la media estadísticamente más alta para el clon Ictafrit. En tanto que para el clon Loman, el mejor medio fue KIM; destacando además que en términos generales, fue el clon Ictafrit quien produjo un promedio total, mayor de microtubérculos; 58 microtubérculos respecto a la producción promedio total de 50 microtubérculos para el clon Loman.



**Figura 11. Interacción CLON \* MEDIO DE CULTIVO, para la variable de respuesta Número de microtubérculos en tubos de cultivo.**

**REFERENCIA :** **KO:** Medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), medio testigo en esta investigación, **W-H :** Medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ), **M-S :** Medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ), **KIM :** Medio desarrollado por Y.C . Kim ( 1,982 ), **H-S :** Medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S,** Medio desarrollado por C.E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.3.2 Peso de los microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta peso de los microtubérculos en miligramos, utilizando tubos de cultivo ( **Cuadro 34** ), permite observar diferencias altamente significativas para los factores clon, medio y la interacción clon por medio, lo cual es un

indicativo de que dichos factores ejercen influencia directa sobre el peso de los microtubérculos.

**Cuadro 34 Análisis de varianza para la variable peso de microtubérculos, en tubos de cultivo.**

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr Fc
Clon	1	101,472.31	32.51	0.0001**
Medio	5	96,545.36	6.19	0.0001**
Clon * Medio	5	122,396.05	7.84	0.0001**
Error	54	168,558.19		
Total corregido	70	653,150.79		

**C.V.=41.65756**

**R-cuadrado = 0.741931**

**Media General = 134.11713615**

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

NS No significativo ( 5% )

Pr Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

### 7.3.2.1 Peso de microtubérculos, según interacción clones por medio en Tubos de cultivo.

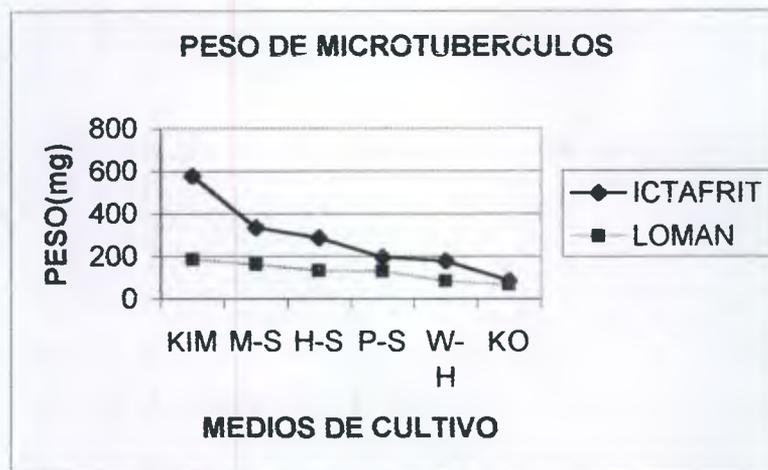
Según los estudios de Simko (1,994) y abbot y Belcher (1,998), se asegura que "las concentraciones altas de sacarosa incrementan el porcentaje de tuberización e incrementan el peso de los mismos". Lo cual se ve reflejado en el **Cuadro 35**, pudiéndose apreciar que para el clon Ictafrit, el mejor medio de cultivo fue : P-S con peso promedio de 576 miligramos y el medio KO, con 333 miligramos; de un promedio total de 1,654 miligramos obtenidos con la evaluación de los seis medios semisólidos de cultivo; para el clon Loman el mejor medio fue KIM, con 185 miligramos; de un promedio total de 756 miligramos obtenidos de la evaluación de los seis medios.

Cabe destacar que de los clones evaluados el que produjo un mayor número de microtubérculos fue; abundantemente el clon Ictafrit.

**Cuadro 35 Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidos de la interacción clon \* Medio de cultivo para la variable peso de los microtubérculos en Tubos de cultivo.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Peso de microtuberculos(mg)	Prueba de Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	P-S	576	A		
2	ICTAFRIT	KO	333	A	B	
3	ICTAFRIT	KIM	286	A	B	C
4	ICTAFRIT	H-S	196		B	C
5	ICTAFRIT	W-H	177		B	C
6	ICTAFRIT	M-S	86			C
7	LOMAN	KIM	185	A		
8	LOMAN	M-S	162	A	B	
9	LOMAN	H-S	131		B	
10	LOMAN	P-S	130		B	
11	LOMAN	W-H	83		B	C
12	LOMAN	KO	65			C

En el Cuadro 35 y figura 12, puede observarse el comportamiento manifestado por los valores para la variable de respuesta peso de microtubérculos, siendo P-S y KO, los medios que produjeron microtubérculos con mayores pesos en miligramos para el clon Ictafrit y los medios KIM y M-S para el clon Loman.



**Figura 12. Interacción CLON \* MEDIO DE CULTIVO, para la variable peso (mg) de los microtubérculos en Tubos de cultivo.**

**REFERENCIA :** KO: Medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), medio testigo en esta investigación, W-H : Medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ), M-S : Medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ), KIM : Medio desarrollado por Y.C Kim ( 1,982 ), H-S : Medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio P-S, Medio desarrollado por C.E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.3.3 Longitud de los microtubérculos

Según el análisis de varianza para la variable de respuesta longitud de microtubérculos en miligramos ( **Cuadro 36** ), producidos en tubos de cultivo, permitió establecer diferencias altamente significativas para los factores clon por medio, lo cual es un indicativo de que los clones Ictafrit y Loman manifestaron una respuesta positiva diferente; en función a los diferentes medios evaluados.

**Cuadro 36** Análisis de varianza para la variable de respuesta longitud de los microtubérculos en Tubos de cultivo.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr Fc
Clon	1	222.119	35.11	0.0001**
Medio	5	112.256	3.55	0.0076**
Clon * Medio	5	280.259	8.86	0.0001**
Error	54	341.624		
Total corregido	70	1,234.05		

**C.V** =14.756764

**R-cuadrado** = 0.723169

**Media General** = 17.04460094

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

**NS** No significativo ( 5% )

**Pr Fc** Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

#### 7.3.3.1 Longitud de los microtubérculos según interacción clon \* medio En Tubos de cultivo.

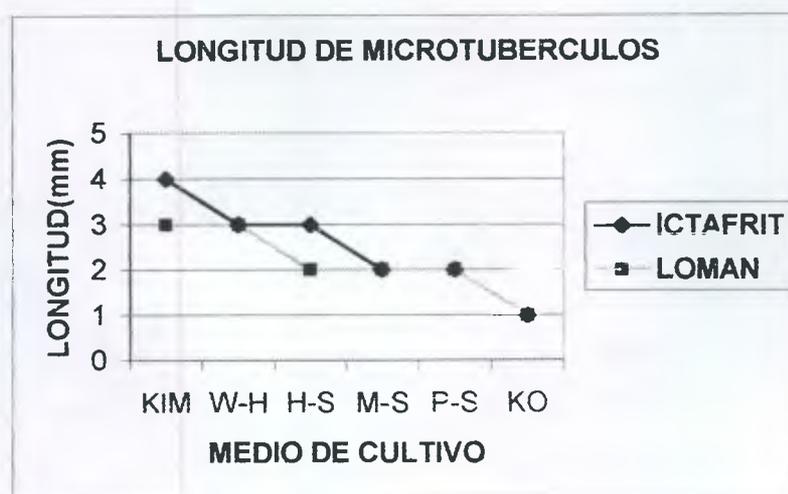
El comportamiento de los valores medios utilizando la prueba de medias Duncan ( **Cuadro 36** ), identifica que para el clon Ictafrit; el medio que produjo microtubérculos de una mayor longitud en milímetros fue : KIM, con microtubérculos de longitudes promedio de 4 milímetros, de un total promedio de 15 miligramos obtenido de la evaluación de los seis medios semisólidos de cultivo.

En tanto que para el clon Loman, los mejores medios fueron KIM, W-H y P-S con formación de microtubérculos de 3 milímetros; de un total promedio de 14 miligramos obtenido de los microtuberculos producidos con los seis medios.

**Cuadro 37 Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidas de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable longitud de microtubérculos en Tubos de cultivo.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Longitud de microtuberculos(mm)	Prueba de Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	KIM	4	A		
2	ICTAFRIT	KO	3		B	
3	ICTAFRIT	W-H	3		B	
4	ICTAFRIT	H-S	2		B	C
5	ICTAFRIT	P-S	2		B	C
6	ICTAFRIT	M-S	1			C
7	LOMAN	KIM	3	A		
8	LOMAN	W-H	3	A		
9	LOMAN	P-S	3	A		
10	LOMAN	M-S	2		B	
11	LOMAN	H-S	2		B	
12	LOMAN	KO	1			C

La variable longitud en los microtubérculos, es influenciada por las propias características genóticas y fenotípicas de los materiales en estudio, por lo que en función a los valores del **cuadro 36** y las diferentes interacciones entre clones y medios; puede afirmarse que existe coincidencia en la forma fenotípica de los dos materiales en razón de que los valores para cada clon no difieren significativamente uno respecto del otro.



**Figura 13 Interacción clon \* medio de cultivo, para la variable de respuesta longitud de microtubérculos en tubos de cultivo.**

**REFERENCIA :** **KO:** Medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), medio testigo en esta investigación, **W-H :** Medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ), **M-S :** Medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ), **KIM :** Medio desarrollado por Y.C . Kim ( 1,982 ), **H-S :** Medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S,** Medio desarrollado por C.E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.3.4 Diámetro promedio de los microtubérculos

El análisis de varianza para la variable de respuesta diámetro de microtubérculos producidos en tubos de cultivo ( **Cuadro 38** ), manifiesta diferencias altamente significativas para clones y medios, al igual que para la interacción clon por medio, lo cual se ve reflejado en términos de diámetros en los microtubérculos, para los seis medios semisólidos evaluados.

**Cuadro 38** Análisis de varianza para la variable de respuesta diámetro de Microtubérculos en tubos de cultivo.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr > Fc
Clon	1	72.126	25.18	0.0001**
Medio	5	120.435	8.41	0.0001**
Clon * Medio	5	118.121	8.25	0.0001**
Error	54	154.666		
Total corregido	70	577.919		

C.V.=16.14690

R-cuadrado = 0.732374

Media General = 10.48122066

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1 % )

\* Diferencias significativas ( 5 % )

NS No significativo ( 5 % )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada

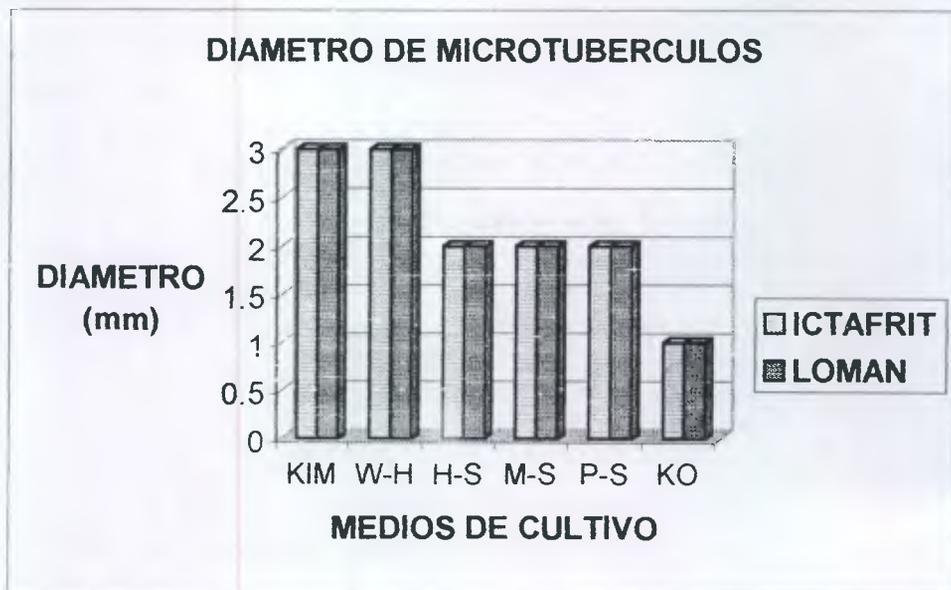
#### 7.3.4.1 Diámetro de microtubérculos según interacción clones por medio de cultivo.

En el **Cuadro 39** puede apreciarse que como resultado de la interacción clon por medio de cultivo, para la variable de respuesta diámetro de microtubérculos producidos; que los medios que manifestaron una mejor respuesta fueron: KIM y P-S, con producción de microtubérculos con diámetro de 3 milímetros en promedio para el clon Ictafrit, en tanto que para el clon Loman los mejores medios fueron KIM y W-H con producción promedio de microtubérculos de 3 milímetros de diámetro.

**Cuadro 39 Prueba de medias Duncan al 10 %, resultado de la interacción clon \* medio de cultivo para la variable de respuesta diámetro de microtubérculos en tubos de cultivo.**

No. Tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Diámetro de microtuberculos(mm)	Prueba de Duncan al 10%		
1	ICTAFRIT	KIM	3	A		
2	ICTAFRIT	P-S	3	A		
3	ICTAFRIT	KO	2		B	
4	ICTAFRIT	W-H	2		B	
5	ICTAFRIT	H-S	2		B	
6	ICTAFRIT	M-S	1			C
7	LOMAN	KIM	3	A		
8	LOMAN	W-H	3	A		
9	LOMAN	H-S	2		B	
10	LOMAN	M-S	2		B	
11	LOMAN	P-S	2		B	
12	LOMAN	KO	1			C

En el Cuadro 39 puede apreciarse que el BAP contenido en el medio KIM y W-H y la Cinetina contenida en el medio P-S favorecieron el Incremento en el diámetro de los microtubérculos, de esa cuenta los mejores medios para el clon Ictafrit fueron KIM y P-S, en tanto que para el clon Loman el mejor medio fue W-H . Destacando además; que el promedio total en miligramos para ambos clones, derivado de la evaluación de los seis medios de cultivo fue igual a 13 miligramos.



**Figura 14. Interacción clon \* medio de cultivo para la variable de respuesta diámetro de microtubérculos, producidos en tubos de cultivo.**

**REFERENCIA :** **KO:** Medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), medio testigo en esta investigación, **W-H :** Medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh Hu ( 1,982 ), **M-S :** Medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ), **KIM :** Medio desarrollado por Y.C . Kim (1,982 ), **H-S :** Medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S,** Medio desarrollado por C.E Palmer y O.E. Smith ( 1,969 ).

### 7.3.5 Microtubérculos con brotes

El análisis de varianza ( **Cuadro 40** ) para la variable de respuesta microtubérculos con brotes producidos en tubos de cultivo, muestra diferencias no significativas para el factor clon,, lo cual es un indicativo de que ambos clones produjeron igual número de microtubérculos con brotes. Existiendo significancia para medios y no para la interacción clon por medio.

**Cuadro 40** Análisis de varianza para la variable de respuesta promedio de microtubérculos con brotes, clones Ictafrit y Loman producidos en Tubos de cultivo.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	VALOR DE F	Pr > Fc
Clon	1	1.623	0	0.957 NS
Medio	5	10,090.91	3.64	0.0065*
Clon * Medio	5	5,007.58	1.81	0.1268NS
Error	54	29,909.09		
Total corregido	70	54,930		

C.V =278.4914

R-cuadrado = 0.455501

Media General = 8.450704223

\*\* Diferencias altamente significativas ( 1% )

\* Diferencias significativas ( 5% )

NS No significativo ( 5% )

Pr > Fc Probabilidad de encontrar un valor mayor que la F calculada.

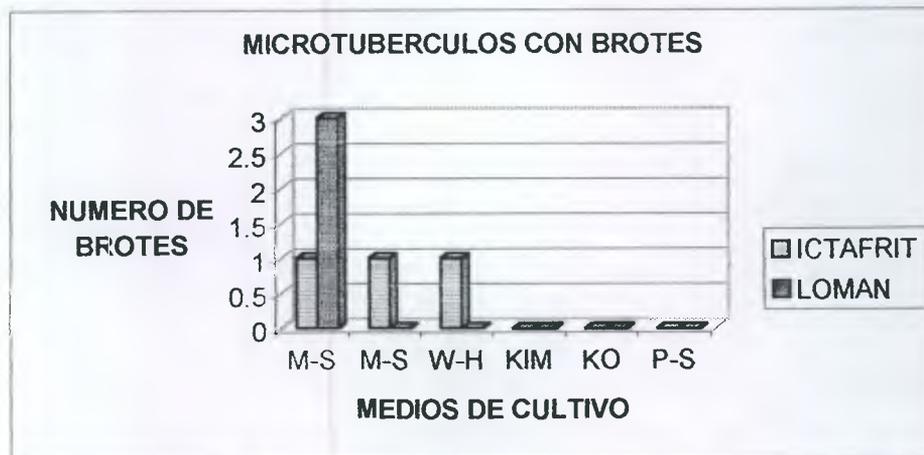
#### 7.3.5.1 Microtubérculos con brotes producidos en los diferentes medios de cultivo.

La prueba de medias Duncan al 10% (**cuadro 41**), nos permite identificar el comportamiento de los microtubérculos con presencia de brotes, e identificar a los mejores medios de cultivo formadores de microtubérculos con brotes, siendo para el clon Ictafrit; los medios M-S, W-H y H-S, con formación de 1 microtubérculo con brotes respectivamente y para el clon Loman el Mejor medio fue, M-S con formación de 3 microtubérculos con brotes, resultados que nos permiten deducir; que aunque el apareamiento de brotes en los microtubérculos no es afectado por el factor clon, si es afectado por el factor medio de cultivo.

**Cuadro 41 Prueba de medias Duncan al 10 % obtenidas de la variable promedio de microtubérculos con brotes en tubos de cultivo.**

No. tratamiento	Clon	Medio de cultivo	Microtubérculos con brotes	Prueba de Duncan al 10%
1	ICTAFRIT	M-S	1	A
2	ICTAFRIT	W-H	1	A
3	ICTAFRIT	H-S	1	A
4	ICTAFRIT	KIM	0	C
5	ICTAFRIT	KO	0	C
6	ICTAFRIT	P-S	0	C
7	LOMAN	M-S	3	A
8	LOMAN	M-S	0	C
9	LOMAN	W-H	0	C
10	LOMAN	KIM	0	C
11	LOMAN	KO	0	C
12	LOMAN	P-S	0	C

El Cuadro 40 y figura 15 reflejan el comportamiento de los microtubérculos con brotes, producidos a partir de los clones Ictafrit y Loman evaluados en seis medios semisólidos; de los cuales, es posible deducir que en promedio la formación de microtubérculos con brotes fué menos significativo para el clon Loman.



**Figura 15 Relación medio de cultivo \* número de microtubérculos con brotes**

**REFERENCIA :** KO: Medio P2 desarrollado por Ken Okabe ( 1,998 ), actualmente utilizado como referencia en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ( ICTA), medio testigo en esta investigación, **W-H :** Medio desarrollado por Po-Jen Wan y Ching-Yeh hu ( 1,982 ), **M-S :** Medio desarrollado por Murashige y Skoog ( 1,962 ), **KIM :** Medio desarrollado por Kim Y.C . (1,982 ), **H-S :** Medio desarrollado por Hussey G. y Stacey ( 1,984 ), y el medio **P-S**, Medio desarrollado por Palmer C.E y O.E. Smith ( 1,969 ).

**Cuadro 42** Resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de cinco variables de Respuesta en 72 Tubos de cultivo, 6 medios semisólidos de cultivo, 2 clones, con 72 explantes creciendo en cada recipiente, para un tiempo de incubación de 60 días.

Tratamiento	Clon	Medio	No. microtubérculos	Peso (mg)	Longitud (mm)	Diámetro(mm)	con Brotes
1	ICTAFRIT	P-S	12	576	2	3	0
2	ICTAFRIT	KIM	12	286	4	3	0
3	ICTAFRIT	W-H	10	177	3	2	1
4	ICTAFRIT	H-S	9	196	2	2	1
5	ICTAFRIT	KO	9	333	3	2	0
6	ICTAFRIT	M-S	6	86	1	1	1
7	LOMAN	KIM	12	185	3	3	0
8	LOMAN	H-S	10	131	2	2	0
9	LOMAN	W-H	10	83	3	3	0
10	LOMAN	M-S	6	162	2	2	3
11	LOMAN	P-S	6	130	3	2	0
12	LOMAN	KO	6	65	1	1	0

Los resultados generales obtenidos de la evaluación de las variables de respuesta en recipientes Tubos de cultivo, permite indicar al igual que con el uso de recipientes Magenta, y Gerber; también se superaron los promedios que reporta la literatura sobre evaluación de medios tuberizadores, en Chile, Colombia (11) y lo descrito en los estudios de Roca 1,991; (43), que indica que en los mejores de los casos y en cuatro meses de incubación se obtuvieron aproximadamente 2.5 microtubérculos por cada 25 mililitros de medio tuberizador, comparativamente, se puede demostrar por ejemplo que para el clon Ictafrit los medios P-S y KIM, produjeron 12 microtubérculos en 60 mililitros de medio tuberizador, es decir; se obtuvo un promedio de 5 microtubérculos por cada 25 mililitros, lo que es lo mismo a decir que a través de esta investigación se obtuvo 6 microtubérculos más (50%), de lo esperado en otras investigaciones similares; aunque es preciso aclarar que; con otros medios tuberizadores y clones diferentes a los evaluados a través de este experimento.

Para el clon Ictafrit; los medios KIM y P-S, produjeron un número promedio de 12 microtubérculos, el doble del total de microtubérculos esperados (es decir el 200%), en 6 unidades experimentales, conteniendo cada uno; 1 explante. En tanto que el medio M-S, fue el único medio que produjo únicamente 1 microtubérculo por explante cultivado, que no puede considerarse como un resultado negativo; aunque de alguna forma, si; se compara con los resultados obtenidos con los otros cinco medios evaluados a través del experimento.

Para el clon Ictafrit; el medio que produjo microtubérculos de mayor peso promedio, en miligramos fue P-S, con producción promedio de 576 miligramos para un número de 12 microtubérculos producidos, en tanto que comparativamente, el medio que produjo microtubérculos de menor peso en miligramos, fue el medio M-S, con producción promedio de 86 miligramos, en un total de 6 microtubérculos producidos.

Para el clon Ictafrit; el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño promedio, en terminos de mayor diámetro en milímetros y longitud en milímetros fue el medio KIM, con producción de microtubérculos de diámetro promedio de 3 milímetros y longitud promedio de 4 milímetros.

Para el clon Ictafrit, los medios que produjeron 1 microtubérculo con brote (de una producción de 6, 9 y 10 respectivamente), fueron M-S, W-H y H-S.

Para el clon Loman; el medio KIM, produjo un numero promedio de 12 microtubérculos, es decir el doble del total de microtubérculos esperados ( el 200%), en 6 unidades experimentales, conteniendo cada uno; 1 explante. En tanto que los medios KO, M-S y P-S, produjeron unicamente 1 microtubérculo por explante cultivado, que no puede considerarse como un resultado negativo; aunque de alguna forma, si, se compara con los resultados obtenidos con los otros cinco medios evaluados a traves del experimento.

Para el clon Loman; el medio que produjo microtubérculos de mayor peso promedio en miligramos, fue KIM, con producción de microtubérculos de peso promedio de 185 miligramos, en un total de 12 microtubérculos producidos, en tanto que comparativamente, el medio que produjo microtubérculos de menor peso promedio en miligramos, fue el medio W-H, con producción promedio de 83 miligramos, en un total de 10 microtubérculos producidos.

Para el clon Loman; el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño promedio, en terminos de mayor diámetro en milímetros y longitud en milímetros fue el medio KIM, con producción de microtubérculos de diámetro promedio de 2 milímetros y longitud promedio de 3 milímetros.

Para el clon Loman; el unico medio que produjo 3 microtubérculos con brotes, fue el medio M-S ( 3 microtubérculos con brotes de 6 producidos).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 8.1 Para el clon Ictafrit; en recipientes Magenta; el medio H-S, favoreció la producción de un mayor número promedio de microtubérculos, el medio KO, produjo microtubérculos de mayor peso promedio en miligramos, M-S fue el medio que produjo microtubérculos de mayor tamaño, respecto al diámetro promedio en milímetros y longitud promedio en milímetros de los microtubérculos producidos.
- 8.2 Para el clon Loman, en recipientes Magenta; el medio H-S, favoreció la producción de un mayor número promedio de microtubérculos; el medio M-S, produjo microtubérculos de mayor peso promedio en miligramos y produjo microtubérculos de mayor tamaño en términos de diámetro promedio en milímetros y longitud promedio en milímetros, en tanto que el medio M-S, fue el más susceptible a la producción de microtubérculos con brotes
- 8.3 Para el clon Ictafrit, en recipientes Gerber; el medio H-S, fue el medio productor de un mayor número promedio de microtubérculos y el medio P-S, el que produjo microtubérculos promedio de mayor peso promedio en miligramos y de mayor tamaño promedio, respecto al diámetro promedio en miligramos y longitud promedio en miligramos de los microtubérculos. La formación de microtubérculos con brotes, no fue un factor determinante ya que escasamente dos de seis medios favorecieron la formación de microtubérculos con brotes.
- 8.4 Para el clon Loman, en recipientes Gerber; el medio KIM, fue el medio productor de un mayor número promedio de microtubérculos, el que produjo microtubérculos promedio de mayor peso miligramos y de mayor tamaño en términos de diámetro promedio en miligramos y longitud promedio en miligramos, la formación de microtubérculos con brotes, no fue determinante; ya que escasamente un medio de seis, favoreció la formación de microtubérculos con brotes.
- 8.5 Para el clon Ictafrit en recipientes Tubos de cultivo; los dos mejores medios fueron: P-S, que produjo dos microtubérculos por explante y por tubo de cultivo y favoreció la formación de microtubérculos de mayor peso promedio en miligramos; el otro medio fue KIM que de igual forma produjo, dos microtubérculos

por explante y por tubo de cultivo y de mayor tamaño promedio en términos de diámetro promedio en milímetros y longitud promedio en milímetros.

- 8.6 Para el clon Loman, en recipientes Tubos de cultivo; el mejor medio en términos generales, fue el medio de KIM, que favoreció la formación de dos microtubérculos por explante y por tubo de cultivo; microtubérculos de mayor peso promedio en miligramos y de mayor tamaño promedio respecto a diámetro promedio en milímetros y longitud promedio en milímetros.
- 8.7 Una de las principales causas de la inducción al brotamiento es la hiperhidricidad causada por la acumulación de etileno, lo cual se vio reflejada en la producción de microtubérculos bajo una alta densidad de siembra y condiciones de poca ventilación, de esa cuenta; la formación de microtubérculos con brotes, fue más manifiesta en recipientes Magenta, en los cuales la densidad de siembra fue de 16 explantes creciendo en 100 mililitros de medio tuberizador, respecto a los tubos de cultivo con 1 explante creciendo en 10 mililitros de medio tuberizador, donde la producción de microtubérculos no estuvo afectada por este factor.
- 8.8 La citocinina BAP tuvo relación directa en el proceso facilitador; influyendo específicamente sobre una microtuberización más acelerada, ya que se pudo comprobar, que los medios conteniendo diferentes concentraciones de BAP microtuberizaron rápidamente, específicamente 25 días posterior a la siembra, ya mostraban formación de microtubérculos.
- 8.9 Se logró determinar, que a mayor concentración de sacarosa en el medio, se incrementó en mejor forma el porcentaje de tuberización y se incrementó el peso de los microtubérculos y que las bajas concentraciones de sacarosa influyeron en gran medida inhibiendo el proceso tuberizador, aún con la presencia de cloruro de colocolina .
- 8.10 A completa oscuridad se redujo el fotoperiodo de los explantes de papa, con lo cual se obligó a elaborar sus propias sustancias; factor que contribuyó a la formación de órganos de reserva y bajo estas condiciones de alteración del

balance hormonal, la función de formación de microtubérculos se transfirió, de la raíz a las yemas axilares del pecíolo de la hojas.

8.11 El experimento superó abundantemente las expectativas comparativas en relación a experimentos similares, donde en el mejor de los casos en un período de 4 meses con otras composiciones de medios y clones; se obtuvo una producción aproximada de 2.5 microtubérculos por cada 25 ml de medio tuberizador, en tanto que en la presente investigación:

Para el clon Loman y con el medio H-S en recipientes Magenta, se logró una producción de 151 microtuberculos en 1,200 mililitros de medio tuberizador (promedio de 3.15 microtubèrculos por cada 25 mililitros; es decir 31 microtubèrculos màs de lo esperado).

Para el clon Ictafrit y con el medio H-S en recipientes Gerber, se tuvo una producción de 24 microtubèrculos en 150 mililitros de medio tuberizador (promedio de 4 microtubèrculos por cada 25 mililitros; es decir 9 microtubèrculos superior a lo esperado).

Para para el clon Ictafrit, los medios P-S y KIM, en tubos de cultivo; produjeron 12 microtubèrculos en 60 mililitros de medio tuberizador, es decir; se obtuvo un promedio de 5 microtubèrculos por cada 25 mililitros, lo que es lo mismo a decir que a través de esta investigación se obtuvo 6 microtubèrculos (50%), màs de lo esperado.

## 9.- CONCLUSIONES

- 9.1 El número de microtubérculos producidos por clon \* medio, disminuyó a medida que se aumentó la densidad de siembra de los explantes, esto debido a que la cantidad de medio en los recipientes, no fue directamente proporcional demostrándose lo que la teoría de la competencia basada en recursos nos indica; relativo a que; a mayor número de plantas compitiendo, existe un mayor agotamiento de los nutrientes y de igual forma se favorece la formación de microtubérculos con brotes a causa de hiperhidricidad causada por la acumulación de etileno y además el factor contaminación es determinante; por lo que es preciso indicar, que en función a los resultados obtenidos a través de este experimento; los recipientes más adecuados para la producción *in vitro* de la papa, fueron los tubos de cultivo para la evaluación de ambos clones, ya que los mismos; conteniendo 10 mililitros de medio, permitieron en la mayoría de los casos, la formación de hasta dos microtubérculos por explante, debido a que los factores arriba mencionados, no fueron determinantes.
- 9.2 Los clones Loman e Ictafrit respondieron favorablemente a la técnica de la microtuberización *in vitro* de la papa, ya que invariablemente para los seis medios semisólidos de cultivo evaluados en recipientes Magenta, Gerber y Tubos de cultivo; los clones Ictafrit y Loman, favorecieron la formación de microtubérculos en respuesta a una densidad de siembra.
- 9.3 No existió en particular un medio que específicamente pudiera identificarse como el mayor productor o favorecedor de la formación de microtubérculos con brotes, ya que este factor se encuentra estrechamente ligado a la etilenización, provocada por la producción de tubérculos *in vitro*, bajo altas densidades de siembra y en pequeños recipientes herméticos. Aunque cabe destacar; que para el presente experimento y con el clon Ictafrit; los medios KO y M-S en recipientes Magenta, favorecieron la formación de un mayor número de microtubérculos con brotes (cincuenta microtubérculos con brotes en total).

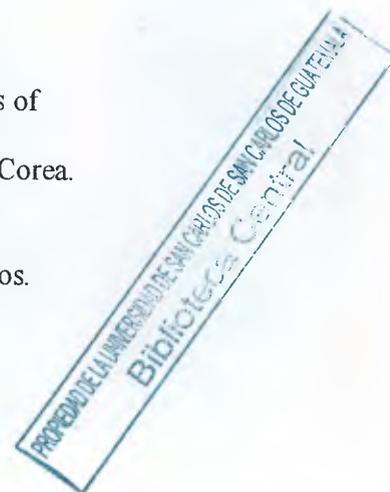
## 10. RECOMENDACIONES :

- 10.1 Que la Gerencia del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, siga apoyando la realización de nuevas investigaciones de tesis y se le de continuidad y promoción a las investigaciones ya existentes.
- 10.2 Se promueva nuevos estudios, bajo similares características, con el propósito de que se establezcan los protocolos para otros clones, utilizando el vasto germoplasma existente en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA.
- 10.3 Se establezcan estudios que permitan la evaluación del rendimiento en invernadero de tubérculos de papa, producidos *in vitro* , a partir de los mejores medios y clones validados en la presente investigación y en función a características deseadas; en número, tamaño o peso y determinar la influencia de las condiciones ambientales en el reposo.
- 10.4 Se establezcan programas locales de papa, que utilicen tubérculos *in vitro*, como material inicial, para trabajos de multiplicación de semillas, como parte de un programa de Certificación de semillas, que permita a los papicultores nacionales, obtener semilla " limpia " y de buena calidad.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Abdelnour, A. 1990. Generalidades de el cultivo de tejidos. Turrialba, CR, CATIE. p.5. Folleto Técnico no. 7170.
2. Booth, R. 1993. Principios de almacenamiento de papa ( Solanum tuberosum L.). Perú, Editorial Agropecuaria. p. 99-113
3. Buzio, CA. 1999. Biotecnología en la Agricultura. In: El Futuro Comienza Aquí. Guatemala, Editorial Alimentos, Salud y Esperanza, MONSANTO. p.51
4. Carrillo, J; Mejia, L; Vasquez, F. 1991. La biotecnología y su aplicación en la agricultura Guatemalteca. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 27 p.
5. Ciampi, L ; García, E ; Izquierdo, J. 1990. La papa en la década de 1,990 : Situación y perspectivas de la economía de la papa a nivel mundial. Roma, IT, FAO. 75 p.
6. ----- . 1991a. Biotecnología apropiable; racionalidad de su desarrollo y aplicación en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, FAO. 75 p
7. ----- . 1991b. Biotecnología moderna. In: Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal. (3.,1,991, Cuba). La Habana, CU, FAO. p. 25-37
8. Cid, A Del 1992. El cultivo de la papa en Guatemala. In: Desarrollo de productos de raíces y tubérculos. Guatemala, ICTA. v. 2, p. 28-31
9. ----- . 1997. Importaciones de papa, riesgosas para el país. Prensa Libre Guatemala; Marzo. 2: 66
10. CIP (Centro Internacional de La Papa, PE). 1990. Almacenamiento eficiente de papa en bodegas de almacenamiento. Perú, CIP. 32 p. Folleto Técnico no. 1
11. Chaparro, C. 1994. Establecimiento de una tecnología de tuberización in vitro en dos variedades de papa ( Solanum tuberosum L., subespecie andígena). Tesis Biología. Colombia, Pontificia Universidad Javeriana, Laboratorio de Papa Corpoica Tibaitata. p.13
12. Christiansen, JA.; Vargas, MR. 1981. Cultivo de hortalizas. México, Ed. Mexicanos Unidos. 40 p.
13. Espinoza, A. 1992. El cultivo de la papa con énfasis en la producción de

- semillas. Programa de inversiones y proyección social en papa. Lima, Perú, Universidad Agraria La Molina. 327 p.
14. Espinoza, N. 1987. Cultivo de tejidos, micropropagación, conservación y exportación de germoplasma. Guía de Investigación CIP. no. 19: 45-50
  15. Estrada, L ; Schilde-Renteschler, S ; Doods, J. 1986. Inducción y utilización de tubérculos in vitro de papa. Perú, CIP. p. 22-46.
  16. Estrada, R ; Tobar, P ; Doods, JH. 1986. Induction of in vitro tuber a broad range of potato genotypes plant cell tissue and organ culture. Potato 7: 3-10
  17. Fundamentos teorico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. 1990. Ed. por C.H. Rossel; V.M. Villalobos. Roma, IT, FAO. 105 p. Producción y Protección Vegetal.
  18. George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. US , Editorial Exegetics Limited. 1, 574 p.
  19. Gomez, EE. 1997. Evaluación del rendimiento de cuatro variedades de Papa bajo las condiciones de la Aldea Xeabaj, Santa Apolonia, Chimaltenango, Guatemala. II-EPISA. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 41 p.
  21. Hernández, A. 1998. Características generales de la variedad Ictafrit. Guatemala, ICTA (Comunicación personal ).
  22. ----- . 1997. Producción de semilla certificada de papa. anteproyecto. Guatemala, Misión Japonesa, ICTA. 5 p.
  23. Horton, DE. 1988. Las papas en los países de desarrollo. Revista Latinoamérica de la Papa 1(1): 9-15
  24. Hussey, G; Stacey, NJ. 1984. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato ( Solanum tuberosum L.). Ann. Boot. 53: 565-578
  25. Kim, C. 1982. In vitro tuber formation from proliferated shoots of Potato ( Solanum tuberosum L. ) as a method of aseptical maintenance. Ph. D. South Corea, National University of South Corea. 120 p.
  26. Koeman, SL. 1,987. La producción de patatas en los países bajos. Revista Agro-Holandá. no. 5 : 5-6
  27. Krikorian, AD. 1991. Medios de cultivo: Generalidades,



- Composición y preparación. In Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca; Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 41-69
28. Lago, CL. 1991. Protocolo para la producción de tubérculos in vitro y producción de semilla básica de papa. La Habana, CU, Instituto de Biotecnología de Plantas. 43 p.
29. Lewis, J. 1999. Crece la producción nacional de papa en Guatemala Prensa Libre. Guatemala, Enero. 6: 14
30. Losoya-Saldaña, H. 1973. Estudio preliminar sobre características fisiológicas en variedades de papa (Solanum spp.). Tesis Mag. Sc. Chapingo, MX, Colegio de Postgraduados, 115 p.
20. MAGA ( Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, GT). 1999. Registro de importaciones y exportaciones de semillas botánicas y vegetativas. Guatemala. 55 p.
31. Miranda, O.; Del Valle, R. 1983. Recomendaciones agronómicas para el cultivo de papa en Chimaltenango. Guatemala, ICTA. 25 p. Folleto Técnico no. 24 ..
32. Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos . Costa Rica, IICA. 43 p.
33. ----- . 1984. Cultivo y mejoramiento de la papa. Ed. por M.M. de La Cruz; F. de la Torre. San José, CR, Editorial Texto. 676 p.
34. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol* . 25: 135-166
35. Mroginski, LA.; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca, Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 19-40
36. Núñez, JL. 1996. La papa como producto clave en el desarrollo de una línea de productos competitivos en el mercado de Guatemala y para la exportación. Guatemala., Productos Alimenticios René. 16 p.
37. Okabe, K. 1997. Informe final 1995-1997, Región I Barcenás Villa Nueva. Guatemala, ICTA. p. 88
38. Orozco, C. 1996. Cultivo de tejidos su aplicación en la agricultura. In: Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos

- Vegetales (1.,1996, Guatemala). Guatemala, ICTA. p. 6
39. Palmer, CE.; Smith, O.E. 1969. Cytokinins and tuber initiation in the Potato ( Solanum tuberosum L.) Nature no. 221:279-280
40. -----, 1970. Efect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of Solanum tuberosum L. cultured in vitro. Pl. Cell Physiol 11:304-314
41. Pelacho, AM. 1998. El cultivo in vitro fundamentos y aplicaciones. La Coruña España, Universidad de Lleida, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola, Unidad de Fisiología Vegetal. 125 p.
42. Plant, A.; Hernandez, A. 1990. Tercer curso, prácticas para producción. Guatemala, Federación de Cooperativas Agrícolas Regionales. 56 p.
43. Roca, WM.; Mrogiinski, LA. 1,993. Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Colombia, CIAT. 128 p.
44. Schilde-Rentschler, L.; Schmedichinem, PE. 1984. Cultivo de tejidos: pasado presente y futuro. Circular del CIP no. 12:22-26
45. Wang, PJ.; Hu, CY. 1982. In vitro tuberization and virus-free seed production in Taiwan. Am. Potato J. no 7: 33-37
46. Zuñiga Castillo, B. 1990. Producción de plantas de papa ( Solanum tuberosum L. var. Loman). Libre de los virus X, Y, a través del cultivo de meristemas y uso de termoterapia aplicada a plantas enfermas. Tesis de Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, p. 22-32



no. 80.

Juan De La Roca

# APENDICE

Clon	MEDIOS	Tratamientos	Repeticiones	Microtuberculos	Peso(mg)	Longitud (mm)	Diametro (mm)	% brotes
ICTAFRIT	KO	1	1	10	140.70	1.63	0.53	7
ICTAFRIT	KO	1	2	8	123.7	1.53	0.51	0
ICTAFRIT	KO	1	3	10	187.77	1.81	0.58	5
ICTAFRIT	KO	1	4	13	200.98	1.8	0.59	1
ICTAFRIT	KO	1	5	15	211.74	1.94	0.68	3
ICTAFRIT	KO	1	6	10	259.96	2.03	0.68	2
ICTAFRIT	KO	1	7	10	300.80	2.12	0.79	1
ICTAFRIT	KO	1	8	9	311.61	2.21	0.92	1
ICTAFRIT	KO	1	9	11	264.35	2.08	0.89	6
ICTAFRIT	KO	1	10	16	123.24	1.54	0.59	4
ICTAFRIT	W-H	2	1	14	89	1.44	0.53	0
ICTAFRIT	W-H	2	2	13	130.87	1.74	0.55	1
ICTAFRIT	W-H	2	3	13	99.65	1.38	0.53	1
ICTAFRIT	W-H	2	4	11	132.77	1.64	0.57	0
ICTAFRIT	W-H	2	5	6	118.15	1.6	0.5	0
ICTAFRIT	W-H	2	6	7	131.27	1.49	0.59	1
ICTAFRIT	W-H	2	7	15	117.24	1.52	0.51	0
ICTAFRIT	W-H	2	8	14	67.92	1.54	0.5	1
ICTAFRIT	W-H	2	9	15	81.07	1.51	0.53	0
ICTAFRIT	W-H	2	10	9	70.73	1.5	0.51	0
ICTAFRIT	W-H	2	11	8	57.38	1.51	0.51	0
ICTAFRIT	M-S	3	1	9	181.34	1.68	0.71	1
ICTAFRIT	M-S	3	2	11	224.50	1.77	0.68	3
ICTAFRIT	M-S	3	3	10	239.22	2.08	0.81	0
ICTAFRIT	M-S	3	4	11	93.00	1.46	0.65	2
ICTAFRIT	M-S	3	5	16	138.83	1.79	0.68	3
ICTAFRIT	M-S	3	6	12	187.36	1.88	0.79	1
ICTAFRIT	M-S	3	7	9	116.10	1.72	0.63	0
ICTAFRIT	M-S	3	8	11	180.15	1.75	0.72	1
ICTAFRIT	M-S	3	9	8	160.23	1.84	0.61	3
ICTAFRIT	M-S	3	10	10	185.48	1.83	0.67	1
ICTAFRIT	M-S	3	11	8	153.93	1.9	0.68	2
ICTAFRIT	M-S	3	12	10	135.32	1.78	0.59	3
ICTAFRIT	KIM	4	1	12	76.40	1.43	0.55	0
ICTAFRIT	KIM	4	2	13	96.18	1.41	0.58	0
ICTAFRIT	KIM	4	3	11	90.51	1.45	0.51	2
ICTAFRIT	KIM	4	4	12	118.18	1.52	0.59	0
ICTAFRIT	KIM	4	5	13	112.56	1.59	0.62	0
ICTAFRIT	KIM	4	6	12	124.08	1.28	0.47	2
ICTAFRIT	KIM	4	7	10	95.25	1.66	0.52	0
ICTAFRIT	KIM	4	8	12	79.95	1.38	0.51	0
ICTAFRIT	H-S	5	1	16	95.46	2.46	0.96	0
ICTAFRIT	H-S	5	2	11	89.41	1.45	0.62	0
ICTAFRIT	H-S	5	3	10	158.17	1.5	0.74	0
ICTAFRIT	H-S	5	4	10	108.76	1.5	0.74	0
ICTAFRIT	H-S	5	5	12	114.12	1.63	0.83	0
ICTAFRIT	H-S	5	6	15	116.31	1.61	0.71	1
ICTAFRIT	H-S	5	7	11	76.40	1.39	0.62	1
ICTAFRIT	H-S	5	8	11	112.46	1.65	0.64	0
ICTAFRIT	H-S	5	9	10	110.69	1.34	0.83	0
ICTAFRIT	H-S	5	10	13	143.46	1.88	0.98	2
ICTAFRIT	H-S	5	11	12	121.93	1.51	0.94	0
ICTAFRIT	H-S	5	12	9	693.10	1.44	0.62	0
ICTAFRIT	P-S	6	1	14	154.61	1.8	0.6	2
ICTAFRIT	P-S	6	2	13	170.15	1.82	0.81	0
ICTAFRIT	P-S	6	3	14	160.78	1.91	0.65	0
ICTAFRIT	P-S	6	4	13	141.98	1.85	0.61	0
ICTAFRIT	P-S	6	5	13	119.54	1.75	0.71	0
ICTAFRIT	P-S	6	6	10	170.08	1.93	0.62	1
ICTAFRIT	P-S	6	7	13	161.98	1.95	0.62	0
ICTAFRIT	P-S	6	8	14	138.28	1.79	0.61	0
ICTAFRIT	P-S	6	9	13	118.28	1.69	0.68	0

CUADRO 44A DATOS ORIGINALES CLON LOMAN EN RECIPIENTES MAGENTA

108

Clon	Medio	Tratamiento	Repetición	Microtuberculos	Peso(mg)	Longitud (mm)	Diametro (mm)	% brotes
LOMAN	H-S	7	1	14	82.26	1.44	0.56	0
LOMAN	H-S	7	2	13	129.75	1.55	0.73	0
LOMAN	H-S	7	3	12	176.37	1.66	0.83	0
LOMAN	H-S	7	4	11	104.99	1.44	0.64	0
LOMAN	H-S	7	5	15	80.69	1.38	0.56	0
LOMAN	H-S	7	6	13	81.85	1.35	0.52	0
LOMAN	H-S	7	7	16	66.14	1.18	0.48	0
LOMAN	H-S	7	8	13	75.80	1.45	0.49	0
LOMAN	H-S	7	9	13	75.81	1.45	0.49	0
LOMAN	H-S	7	10	16	867.58	1.4	0.51	0
LOMAN	H-S	7	11	15	64.79	1.33	0.47	0
LOMAN	KIM	8	1	16	107.29	1.42	0.61	0
LOMAN	KIM	8	2	15	67.91	1.29	0.53	0
LOMAN	KIM	8	3	13	135.22	1.63	1.05	0
LOMAN	KIM	8	4	10	76.43	1.39	0.5	0
LOMAN	KIM	8	5	15	59.70	1.4	0.55	0
LOMAN	KIM	8	6	14	87.46	1.36	0.59	0
LOMAN	KIM	8	7	10	63.18	1.27	0.42	1
LOMAN	KIM	8	8	14	62.42	1.35	0.56	0
LOMAN	KIM	8	9	16	55.59	1.29	0.52	0
LOMAN	KIM	8	10	14	63.23	1.36	0.52	0
LOMAN	M-S	9	1	10	96.31	6.8	0.61	3
LOMAN	M-S	9	2	12	121.13	1.59	0.76	1
LOMAN	M-S	9	3	8	132.46	1.63	0.77	0
LOMAN	M-S	9	4	11	109.48	1.5	0.61	1
LOMAN	M-S	9	5	9	160.50	1.76	0.77	2
LOMAN	M-S	9	6	10	108.22	1.54	0.58	0
LOMAN	M-S	9	7	16	119.00	1.5	0.58	0
LOMAN	M-S	9	8	11	139.71	1.65	0.7	1
LOMAN	M-S	9	9	13	110.17	1.45	0.65	1
LOMAN	M-S	9	10	13	118.97	1.65	0.67	1
LOMAN	M-S	9	11	16	112.00	1.59	1.1	0
LOMAN	M-S	9	12	8	125.05	1.66	1.06	0
LOMAN	KO	10	1	11	188.71	1.81	0.71	1
LOMAN	KO	10	2	10	140.66	1.73	0.73	0
LOMAN	KO	10	3	7	108.11	1.5	0.61	0
LOMAN	KO	10	4	6	121.65	1.67	0.6	0
LOMAN	KO	10	5	7	60.7	1.37	0.44	0
LOMAN	KO	10	6	11	82.58	1.23	0.42	0
LOMAN	KO	10	8	12	82.58	1.24	0.42	0
LOMAN	KO	10	9	9	66.84	1.25	0.5	0
LOMAN	KO	10	10	7	67.07	1.38	0.47	0
LOMAN	KO	10	11	7	30.84	1.07	0.34	0
LOMAN	W-H	11	1	14	38.86	1.2	0.41	0
LOMAN	W-H	11	2	11	63.91	1.25	0.46	0
LOMAN	W-H	11	3	12	51.68	1.36	0.5	0
LOMAN	W-H	11	4	13	49.66	1.2	0.5	0
LOMAN	W-H	11	5	16	61.49	1.28	0.49	0
LOMAN	W-H	11	6	12	73.59	1.3	0.51	0
LOMAN	W-H	11	7	14	62.38	1.25	0.46	1
LOMAN	W-H	11	8	8	33.48	1.11	0.34	0
LOMAN	W-H	11	9	11	71.41	1.38	0.47	0
LOMAN	W-H	11	10	12	58.46	1.25	0.47	0
LOMAN	P-S	12	1	10	90.96	1.46	0.59	0
LOMAN	P-S	12	2	10	85.28	1.45	0.51	2
LOMAN	P-S	12	3	9	87.84	1.56	0.48	1
LOMAN	P-S	12	4	10	87.5	1.4	0.56	0
LOMAN	P-S	12	5	9	88.64	1.52	0.54	0
LOMAN	P-S	12	6	10	43.69	1.24	0.44	0
LOMAN	P-S	12	7	9	66.56	1.44	0.49	0
LOMAN	P-S	12	8	9	66.57	1.44	0.49	0
LOMAN	P-S	12	9	10	61.01	1.28	0.46	0
LOMAN	P-S	12	10	9	49.61	1.19	0.44	0

CUADRO 45 A DATOS ORIGINALES, CLON ICTAFRIT EN RECIPIENTES TIPO GERBER

Clon	Medio	Tratamiento	Repetición	Microtuberc.	Peso(mg)	Diámetro(mm)	Longitud(mm)	% Brotes
ICTAFRIT	P-S	1	1	4	173.28	1.25	1.95	0
ICTAFRIT	P-S	1	2	3	288.67	1.17	2.27	0
ICTAFRIT	P-S	1	3	2	262.95	1.5	2.25	1
ICTAFRIT	P-S	1	4	5	180.38	1.28	1.86	1
ICTAFRIT	P-S	1	5	3	174.03	1.37	2	0
ICTAFRIT	KIM	2	1	5	85.54	0.94	1.34	0
ICTAFRIT	KIM	2	2	5	110.64	1.08	1.68	1
ICTAFRIT	KIM	2	3	4	165.55	1.33	1.75	0
ICTAFRIT	H-S	3	1	5	125.28	1.22	1.78	0
ICTAFRIT	H-S	3	2	5	94.02	1.04	1.68	0
ICTAFRIT	H-S	3	3	5	187.4	1.32	2	0
ICTAFRIT	H-S	3	4	5	61.1	1.06	1.44	0
ICTAFRIT	H-S	3	5	4	160.4	1.25	1.88	0
ICTAFRIT	W-H	4	1	5	138.04	1.16	1.96	0
ICTAFRIT	W-H	4	2	3	83.93	0.9	1.47	0
ICTAFRIT	W-H	4	3	3	134.6	1.7	1.17	0
ICTAFRIT	W-H	4	4	2	126.95	1.15	2.05	0
ICTAFRIT	KO	5	1	2	337.4	2.15	2.4	0
ICTAFRIT	KO	5	2	3	130.93	1.13	1.9	0
ICTAFRIT	KO	5	3	3	297.67	1.8	2.2	3
ICTAFRIT	M-S	6	1	3	114	1.55	2.4	0
ICTAFRIT	M-S	6	2	2	147.55	1.15	1.85	1

CUADRO 46 A DATOS ORIGINALES CLON LOMAN EN RECIPIENTES TIPO GERBER.

Clon	Medio	Tratamiento	Repetición	Microtuberc.	Peso(mg)	Diámetro (mm)	Longitud (mm)	% brotes
LOMAN	KIM	7	1	5	100.7	1.06	1.62	0
LOMAN	KIM	7	2	4	72.27	0.98	1.15	0
LOMAN	KIM	7	3	3	129.7	1.13	1.97	0
LOMAN	P-S	8	1	4	117.38	1.7	1.28	0
LOMAN	P-S	8	2	4	64.03	1.35	1.68	0
LOMAN	H-S	9	1	5	193.62	1.46	1.98	0
LOMAN	H-S	9	2	5	48.46	0.96	1.28	0
LOMAN	W-H	10	1	4	81.8	1.2	1.65	0
LOMAN	W-H	10	2	4	149.08	1.08	1.8	0
LOMAN	KO	11	1	3	380	2.1	2.1	0
LOMAN	M-S	12	1	3	57	0.77	1.37	0
LOMAN	M-S	12	2	4	205.4	1.3	1.98	0
LOMAN	M-S	12	3	3	38.46	0.87	1.3	0
LOMAN	M-S	12	4	4	73.02	0.95	1.48	0
LOMAN	M-S	12	5	4	49.72	0.93	1.28	0

CUADRO 47 A DATOS ORIGINALES CLON ICTAFRIT EN TUBOS DE CULTIVO

Clon	Medio	Tratamiento	Repetición	Microtuberc.	Peso(mg)	Diámetro (mm)	Longitud (mm)	% brotes
ICTAFRIT	H-S	1	1	1	286.1	0.9	2.5	1
ICTAFRIT	H-S	1	2	1	179.8	0.9	2	0
ICTAFRIT	H-S	1	3	1	184.3	1.2	2	0
ICTAFRIT	H-S	1	4	2	223.9	1.9	3.1	0
ICTAFRIT	H-S	1	5	2	166.2	1.6	3.6	0
ICTAFRIT	H-S	1	6	2	138.4	1.6	2.7	0
ICTAFRIT	KIM	2	1	1	203	1.4	2	1
ICTAFRIT	KIM	2	2	2	333.6	2.7	4	0
ICTAFRIT	KIM	2	3	2	312	2.6	3.9	0
ICTAFRIT	KIM	2	4	2	270.9	2.7	3.8	0
ICTAFRIT	KIM	2	5	3	375.8	3.8	5.3	0
ICTAFRIT	KIM	2	6	2	219.6	3.7	3.7	0
ICTAFRIT	M-S	3	1	1	125.9	1	1.6	1
ICTAFRIT	M-S	3	2	1	107.2	0.9	1.6	0
ICTAFRIT	M-S	3	3	1	98.2	0.9	1.5	0
ICTAFRIT	M-S	3	4	1	36.4	0.5	1.1	0
ICTAFRIT	M-S	3	5	1	36.8	0.5	1	0
ICTAFRIT	M-S	3	6	1	110.2	1	1.6	0
ICTAFRIT	KO	4	1	1	255.6	1.5	2.5	0
ICTAFRIT	KO	4	2	1	353.7	1.9	2.6	0
ICTAFRIT	KO	4	3	1	250	1.8	2.4	0
ICTAFRIT	KO	4	4	2	454.1	3.1	4.7	0
ICTAFRIT	KO	4	5	2	345.3	2.5	4.3	0
ICTAFRIT	KO	4	6	2	337	2.4	3.8	0
ICTAFRIT	P-S	5	1	2	850.6	3	4.6	0
ICTAFRIT	P-S	5	2	2	1,027.10	3.6	5.4	0
ICTAFRIT	P-S	5	3	2	825.8	3.1	4.8	0
ICTAFRIT	P-S	5	4	2	200.9	1.9	3.1	0
ICTAFRIT	P-S	5	5	2	296.3	2.1	3.5	0
ICTAFRIT	P-S	5	6	2	255.9	1.9	3.1	0
ICTAFRIT	W-H	6	1	1	114.3	1.1	1.8	1
ICTAFRIT	W-H	6	2	1	174.4	1	2	0
ICTAFRIT	W-H	6	3	2	270.2	2.4	3.5	0
ICTAFRIT	W-H	6	4	2	231.7	2	3.6	0
ICTAFRIT	W-H	6	5	2	158.8	2	3.2	0
ICTAFRIT	W-H	6	6	2	114.6	1.7	2.8	0

CUADRO 48 A DATOS ORIGINALES CLON LOMAN EN TUBOS DE CULTIVO.

Clon	Medio	Tratamiento	Repetición	Microtuberc.	Peso(mg)	Diámetro (mm)	Longitud (mm)	% brotes
LOMAN	H-S	7	1	1	131	1	1.5	2
LOMAN	H-S	7	2	1	116.4	1.2	1.5	2
LOMAN	H-S	7	3	2	176.4	1.8	3.5	2
LOMAN	H-S	7	4	2	167.4	1.6	2.6	4
LOMAN	H-S	7	5	2	108.3	1.6	2.7	2
LOMAN	H-S	7	6	2	87.4	1.5	2.5	0
LOMAN	KIM	8	1	2	310.1	2.3	3.7	0
LOMAN	KIM	8	2	2	258.4	2	3.4	0
LOMAN	KIM	8	3	2	170.1	2	3.2	0
LOMAN	KIM	8	4	2	150.6	1.7	2.7	1
LOMAN	KIM	8	5	2	128.7	1.6	2.7	1
LOMAN	KIM	8	6	2	91.7	1.9	2.5	0
LOMAN	M-S	9	1	1	154.8	1	1.5	1
LOMAN	M-S	9	2	1	184.9	1	1.9	1
LOMAN	M-S	9	3	1	164.4	1	2	0
LOMAN	M-S	9	4	1	188	1.1	2	0
LOMAN	M-S	9	5	1	156.8	1.1	2	0
LOMAN	M-S	9	6	1	121.2	0.9	1.6	0
LOMAN	KO	10	1	1	48.8	0.8	1.5	0
LOMAN	KO	10	2	1	142.2	1.4	1.9	1
LOMAN	KO	10	3	1	80.6	0.8	1.3	0
LOMAN	KO	10	4	1	65.9	1	1.5	0
LOMAN	KO	10	5	1	38.2	1	1.5	0
LOMAN	KO	10	6	1	15.8	0.6	0.8	1
LOMAN	P-S	11	1	1	280.7	1.4	2.5	0
LOMAN	P-S	11	2	1	214.2	1.3	2	1
LOMAN	P-S	11	3	1	64.4	0.9	1.5	0
LOMAN	P-S	11	4	1	25.2	0.7	0.9	0
LOMAN	P-S	11	5	1	63.2	0.9	1.6	0
LOMAN	W-H	12	1	1	97	1	1.8	0
LOMAN	W-H	12	2	1	57.4	1	1.3	0
LOMAN	W-H	12	3	2	75.8	1.7	2.1	1
LOMAN	W-H	12	4	2	79.1	1.7	2.8	1
LOMAN	W-H	12	5	2	58.2	1.4	2.2	0
LOMAN	W-H	12	6	2	45	1.3	2.1	0

• **CUADRO 49 A** DISTRIBUCIÓN DE RECIPIENTES Y EXPLANTES

LOMAN	ICTAFRIT	TOTAL DE RECIPIENTES	No. TOTAL PLANTAS
36 TUBOS	36TUBOS	72	72
72 MAGENTAS	72 MAGENTAS	144	2,304
30 GERBER	30 GERBER	60	300
		<b>276</b>	<b>2,676 PLANTAS</b>

• **DENSIDAD DE SIEMBRA**

1. Tubos de cultivo: 1 explante por tubo de cultivo
2. Magentas: 16 explantes por Magenta
3. Gerber: 5 explantes por Gerber.

• **CUADRO 50A** DISTRIBUCIÓN DE MEDIOS (LITROS) CLON LOMAN

MEDIOS	TUBOS DE CULTIVO	MAGENTAS	GERBER	TOTAL (LITROS)
<b>KO</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>M-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>H-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>KIM</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>P-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>W-H</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
				<b>8.46</b>

• **CUADRO 51 A** DISTRIBUCIÓN DE MEDIOS (LITROS) CLON ICTAFRIT

MEDIOS	TUBOS DE CULTIVO	MAGENTAS	GERBER	TOTAL (LITROS)
<b>KO</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>M-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>H-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>KIM</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>P-S</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
<b>W-H</b>	6 tubos * 10 ml	12 Magentas * 100 ml	5 Gerber * 30 ml	1.41
				<b>8.46</b>

## PREPARACIÓN DE MEDIOS BASALES A PARTIR DE SOLUCIONES STOCK

### SOLUCIONES STOCK

Para una correcta preparación de las soluciones Stock se debe:

- pesar los componentes en una balanza de precisión.
- asegurarse que el material que entrará en contacto con los componentes de las soluciones se encuentra perfectamente limpio. En caso de duda, lavarlo y hacer un último enjuague con agua destilada para retirar los restos de las sales minerales del agua corriente.
- mezclar los componentes con la ayuda de un agitador magnético.

Una vez obtenida la solución Stock, etiquetar el recipiente que la contendrá indicando qué tipo de solución es, su concentración, la fecha en que se preparó y la persona responsable.

#### Preparación de una solución Stock de Macronutrientes MS x10

Para obtener un litro de dicha solución llénesse un erlenmeyer de 1 l con 500 ml de agua destilada. A continuación añádase cada uno de sus componentes (Tabla 1) disolviéndolo totalmente antes de añadir el siguiente:

**CUADRO 52A** Macronutrientes necesarios para preparar una solución Stock 10 veces concentrada para medio MS

Reactivo	Peso (en gramos)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5
$\text{KNO}_3$	19,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7

Para finalizar, bastará con verter el contenido en una probeta de 1l, con agua destilada, trasladar la solución a su recipiente definitivo y agitarlo. Esta solución debe guardarse a 4 °C.

#### Preparación de una solución Stock de micronutrientes MS x 100

Para obtener un litro de dicha solución llenar un erlenmeyer de 1l con 500 ml de agua destilada. A continuación añadir cada uno de sus componentes (tabla 2) disolviéndolo totalmente antes de añadir el siguiente.

**CUADRO 53A** Micronutrientes necesarios para preparar una solución Stock 100 veces concentrada para medio MS

Reactivo	Peso (en mg)
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.230,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860,0
$\text{H}_3\text{BO}_3$	620,0
KI	83,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5

Para terminar, proceder del mismo modo que con la solución Stock de macronutrientes. Esta solución también debe almacenarse a 4 °C.

**Preparación de una solución Stock de hierro MS x 200**

Para obtener 100 ml de dicha solución deben seguirse los pasos siguientes:

- calentar unos 50 ml de agua destilada en un agitador magnético preparado para tal propósito.
- cuando el agua esté templada, añadir 556 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- una vez se haya disuelto el producto anterior, agregar 744 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
- a continuación, añadir 1 lenteja de NaOH.

Ya disueltos todos los elementos, verter el contenido en una probeta de 100 ml, enrasar, trasladar la solución a su envase definitivo y etiquetar debidamente. Esta solución se almacena a 4 °C.

**Preparación de una solución Stock de vitaminas e inositol MS x 200**

Para obtener 100 ml de dicha solución llenar un erlenmeyer con unos 50 ml de agua destilada y añadir uno a uno , hasta total disolución los siguientes componentes:

**CUADRO 54A Vitaminas y myo-inositol necesarios para preparar una solución Stock 200 veces concentrada para medio MS**

Reactivo	Peso (en mg)
Myo-inositol	2.000
Ácido nicotínico	10
Piridoxina·HCl	10
Tiamina·HCl	2
Glicina	40

Seguidamente, verter el contenido en una probeta de 100 ml, llenar el recipiente definitivo con la solución y etiquetarlo. La solución Stock de vitaminas debe almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

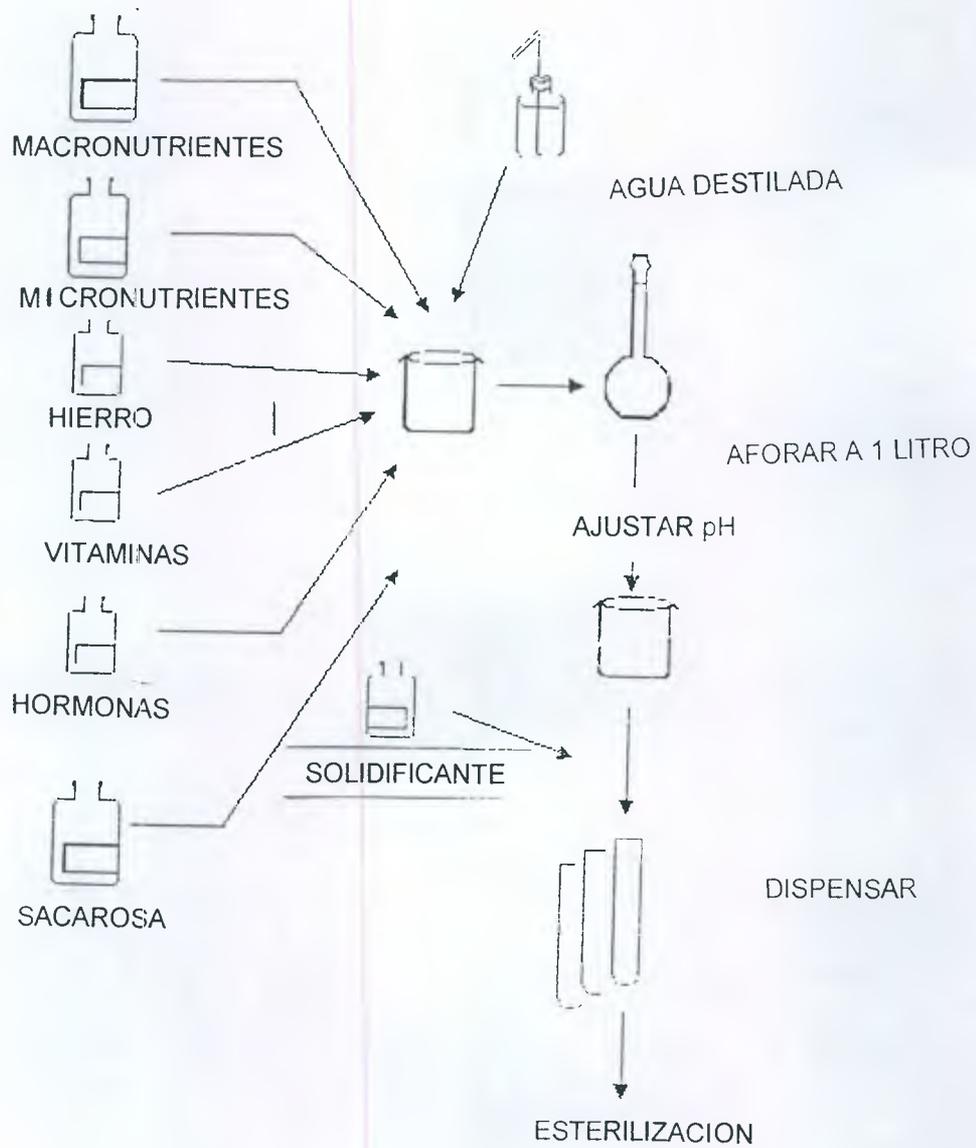
**PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE MEDIO DE CULTIVO MS**

Para la obtención de 1 litro de medio de cultivo MS a partir de soluciones Stock, síganse los siguientes pasos:

- llenar un erlenmeyer de 2l de capacidad con unos 500 ml de agua destilada.
- añadir 100 ml de solución Stock de macronutrientes (MS \* 10) y agitar.
- agregar 10 ml de solución Stock de micronutrientes (MS \* 100) y agitar.
- a continuación, añadir 5 ml de solución Stock de hierro (MS \* 200) y agitar.
- agregar 5 ml de solución Stock de vitaminas (MS \* 200) y agitar.
- añadir 30 g de sacarosa y agitar hasta que se disuelva completamente.
- verter el contenido en una probeta de 1l.
- devolver la solución preparado al erlenmeyer, agitar y ajustar el pH para que se encuentre entre 5.7-5.8.
- añadir 2 g de gelrita, agitar y calentar la solución hasta que la gelrita quede disuelta.
- verter el contenido en los recipientes de cultivo y esterilizarlo (20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ ).

Cuando finalice el proceso de esterilización, dejar enfriar el material para que el medio adquiera una textura gelatinosa.

En caso de trabajar con medio líquido, no se debe añadir la gelrita. El medio de cultivo puede permanecer en buenas condiciones durante una semana si se almacena a temperatura ambiente y hasta un mes si se conserva a  $4^{\circ}\text{C}$ .



**FIGURA 16** PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

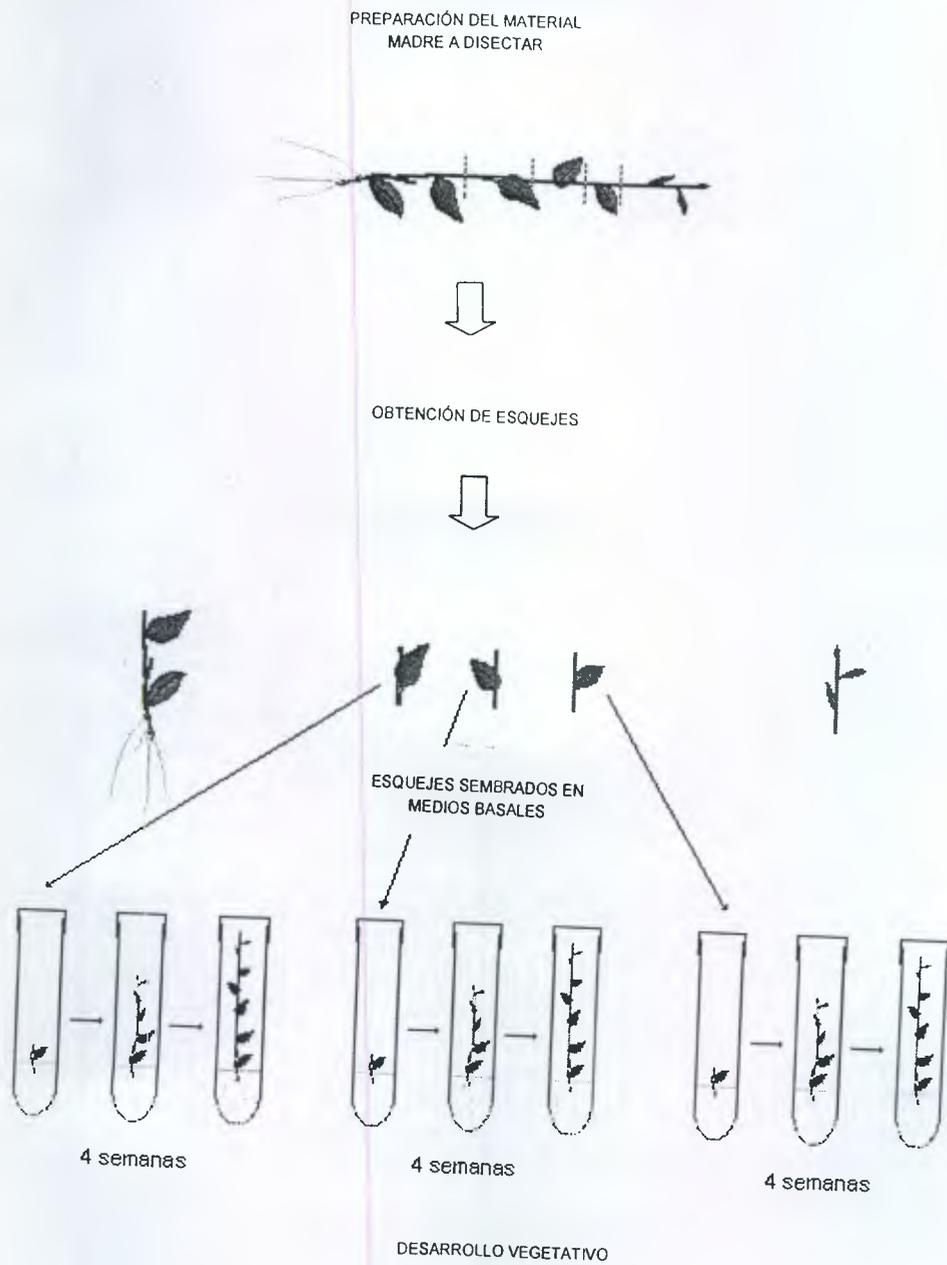


FIGURA 17 FASE DE MICROPROPAGACIÓN

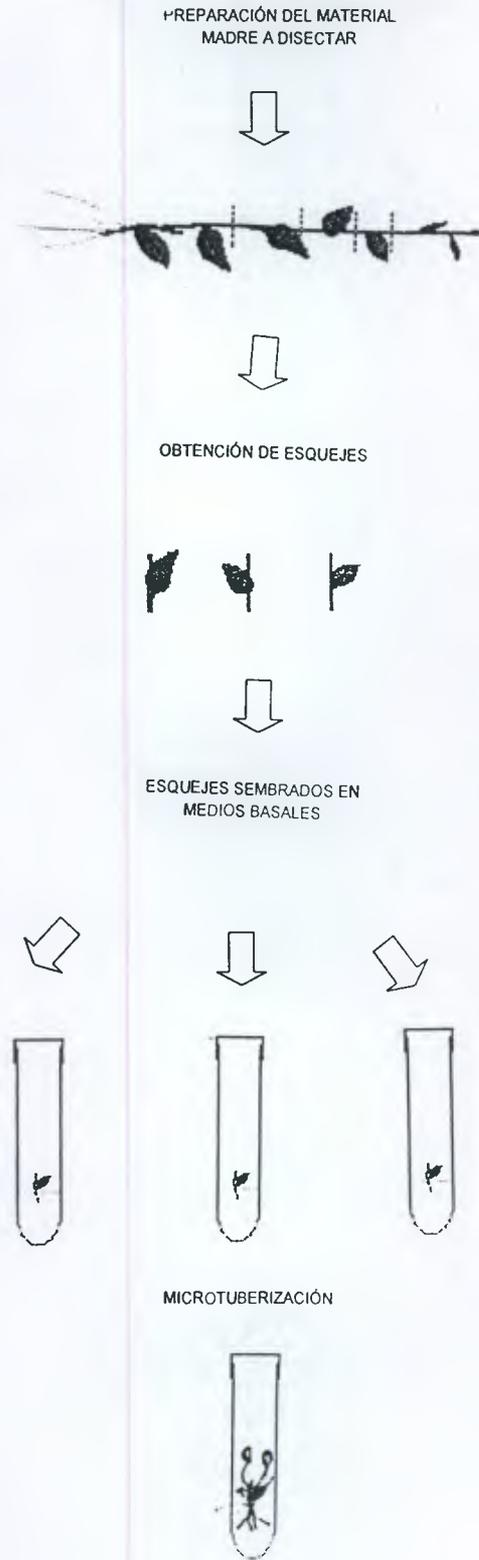


FIGURA 18 FASE DE TUBERIZACIÓN IN VITRO



FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA:

" EFECTOS DE MEDIOS DE CULTIVO Y TI-  
POS DE RECIPIENTES EN LA TUBERIZACION  
In Vitro DE LA PAPA (Solanum Tuberosum  
L.).

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE:

ERWIN ENRIQUE GOMEZ DELGADO

CARNET:

8310149

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES:

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Alvarez V.  
Ing. Agr. José Vicente Martínez A.  
Ing. Agr. Fernando Rodríguez Bracamonte  
Ing. Agr. Carlos Estuardo Roca Canet

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. M. Sc. Héctor Alfredo Sagastume Mena

A S E S O R

Ing. Agr. Walter Estuardo García Tello

A S E S O R

Dr. David Monterroso Salvatierra  
DIRECTOR DEL IIA

I M P R I M A S

Dr. Ariel Abderramán Ortiz López

D E C A N O

