

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE
PLÁNTULAS A PARTIR DEL CULTIVO IN-VITRO DE MERISTEMOS DE
Solanum phureja- MUTANTE FLOR BLANCA.**

CINDY LORENA BARACALDO HUERTAS

DANIELA VELASCO TRIANA

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.**

2018

**ESTANDARIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE
PLÁNTULAS A PARTIR DEL CULTIVO IN-VITRO DE MERISTEMOS DE
Solanum phureja- MUTANTE FLOR BLANCA.**

CINDY LORENA BARACALDO HUERTAS

DANIELA VELASCO TRIANA

Trabajo de grado para optar por el título de Licenciadas en Biología

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE GRADO
LUIS ARMANDO QUEVEDO CÁRDENAS
Lic. M. Sc. Genética y Mejoramiento**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.**

2018

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, por permitirnos desarrollar este proyecto y por promover la formación de docentes investigadores, e innovadores, comprometidos con el desarrollo científico del país.

Al Grupo de Investigación de Biología Molecular, adscrito al proyecto curricular de Licenciatura en Biología, en especial al profesor Luis Francisco Becerra, por abrirnos las puertas desde los primeros semestres, aportándonos no sólo los conocimientos que hoy nos han servido de base para proponer y ejecutar este trabajo, sino también los espacios físicos necesarios para el mismo.

A nuestro director, el profesor Luis Armando Quevedo, por guiarnos en este proceso investigativo; así como también a la profesora Mery Helen Tijero (Evaluadora), por sus valiosos aportes en las etapas finales de ejecución y redacción de este trabajo.

A nuestras familias por su apoyo incondicional y paciencia durante todo nuestro proceso de formación como Licenciadas en Biología, ya que sin este no hubiésemos encontrado la entereza de continuar en momentos de dificultad.

Finalmente, a compañeros, profesores, administrativos, personal de la finca El Capricho y demás personas que hicieron parte de este proceso formativo, tanto directa como indirectamente; ya que las experiencias compartidas contribuyeron en nuestra preparación personal y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE TABLAS /FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	11
OBJETIVOS.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 Antecedentes del Cultivo <i>in vitro</i> en <i>Solanum tuberosum</i>	19
1.2 Generalidades del Cultivo <i>in vitro</i>	20
1.2.1 Posibilidad de contaminación con microorganismos.....	21
1.2.2 Edad fisiológica.....	21
1.2.3 Tamaño.....	21
1.2.4 Época del año.....	21
1.3 Medios de Cultivo.....	22
1.3.1 Hormonas vegetales.....	23
1.3.1.1 Tipos de hormonas trabajadas tanto en Cultivo <i>in vitro</i> , como en la producción agrícola	24
1.2.1.1.2 Auxinas.....	24
1.2.1.1.3 Giberelinas.....	25
1.2.1.1.4 Citoquininas.....	25
1.2.1.1.5 Ácido Abscísico.....	26
1.2.1.1.6 Etileno.....	26
1.3.2 Usos de las Hormonas en el campo agrícola.....	26
1.3.2.1 Control de la tasa de crecimiento	27
1.3.2.2 Control de la floración.....	27
1.3.2.1 Control de la maduración de los frutos.....	27
1.4 Técnicas desarrolladas para cultivar <i>in vitro</i> tejidos vegetales.....	27
1.4.1 Estimulación de yemas axilares.....	28
1.4.2 La embriogénesis.....	28
1.4.3 inducción de variación soma-clonal.....	29
1.4.4 Producción y /o conversión de sustancias útiles	29
1.4.5 Obtención de híbridos somáticos.....	29
1.4.6 Conservación e intercambio de germoplasma	29
1.4.7 Establecimiento de suspensiones celulares.....	29
1.5. Los meristemos.....	30
1.5.1 Clasificación de los meristemos.....	30

1.5.1.1 Por su origen.....	30
1.5.1.1.1 Meristemos primarios o promeristemos.....	30
1.5.1.1.1 Meristemos remanentes.....	30
1.5.1.1.2 Meristemos secundarios.....	30
1.5.1.1.3 Meristemoides.....	31
1.5.1.2 Por su posición en el cuerpo de la planta	31
1.5.1.2.1 Meristemos apicales.....	31
1.5.1.2.2 Meristemos laterales.....	31
1.5.1.2.3 Meristemos intercalares.....	31
1.5.1.3 Por el tipo de crecimiento que producen	31
1.5.1.3.1 Meristemos primarios o promeristemos.....	31
1.5.1.3.2 Meristemos secundarios.....	31
1.6 La variedad <i>Solanum phureja</i>	32
1.6.1 Eco-fisiología.....	32
2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	33
2.1 Tipo de investigación.....	33
2.2 Definición de la población.....	33
2.3 Definición de las variables.....	34
2.4 Análisis estadístico: ANOVA, prueba de Tukey.....	34
2.5 Fases de trabajo.....	34
2.5.1 Fase I: Preparación del Material Vegetal.....	36
2.5.2 Fase II: Obtención de las plántulas <i>in vitro</i>	42
2.5.3 Fase II: comparación y análisis.....	43
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	37
3.1 Fase de campo	37
3.2 Fase de laboratorio.....	42
3.2.1 Protocolo de desinfección	43
3.2.2 Observaciones a las 8 semanas de cultivo	47
3.2.3 Comparación entre tratamientos evaluados	52
3.2.3.1 Variable longitud de tallo	53
3.2.3.2 Variables longitud y tratamiento respecto a las repeticiones.....	56
3.2.3.3 Variable número de nudos.....	58
3.2.3.4 Variables número de nudos y número de hojas respecto a las repeticiones.....	63
4. CONCLUSIONES.....	66
5. RECOMENDACIONES.....	67
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7. ANEXOS.....	74

LISTADO DE TABLAS/ FIGURAS

Tabla 1 Relación de Tratamientos.....	35
Tabla 2 Características y tamaño del tubérculo semilla.....	37
Figura 1 Fotografía en campo de las plantas donantes	40
Figura 2 Evolución de las plantas donantes en la fase de invernadero.....	41
Figura 3 Colecta de las plantas donantes.....	42
Figura 4 Ubicación del meristemo en los explantes.....	46
Figura 5 Fotografía a las 8 semanas de cultivo- Ensayo 1.....	47
Figura 6 Fotografía a las 8 semanas de cultivo- Ensayo 2.....	49
Figura 7 Fotografía a las 8 semanas de cultivo- Ensayo 3.....	50
Gráfica 1 Variable longitud del tallo Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	53
Gráfica 2 Repeticiones y longitud Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	57
Gráfica 3 Número de nudos Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	58
Gráfica 4 Número de hojas Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	62
Gráfica 5 Número de nudos y repeticiones Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	64
Gráfica 6 Número de hojas y repeticiones Prueba Tukey y Diagrama de dispersión.....	65

RESUMEN

Actualmente la papa es uno de los alimentos de mayor interés comercial, ocupando el cuarto puesto de importancia en la escala alimentaria, luego de cultivos como el maíz, el arroz y el trigo. Debido a su importancia agrícola, se han evaluado procesos biotecnológicos que aceleren, mejoren y garanticen la producción de esta hortaliza, siendo el cultivo *in vitro* una de estas técnicas biotecnológicas. El objetivo central de este trabajo fue estandarizar un medio de cultivo para la obtención de plántulas mutantes de papa (*Solanum phureja*-*mutante flor blanca*), esto, tras el análisis de tres tratamientos enriquecidos con hormonas AIA y Kinetina, buscando el desarrollo de plántulas robustas, con buen porte y coloración. Esta variedad es el resultado de la irradiación gamma (50 Gy) en tubérculos de papa criolla común, razón por la cual presenta una mutación que se expresa en el cambio de coloración de la flor, pasando de morada a blanca. Debido a que es una especie mutante, se hace pertinente experimentar medios de cultivo que reduzcan los tiempos de obtención de plántulas. Además, se pretende orientar al investigador en futuros trabajos de micro-propagación, para lo cual se desarrolló un manual de siembra en donde se expone la metodología empleada para el manejo *In vitro* adecuado desde la obtención de plantas donantes, hasta la obtención de plántulas, de manera concreta y práctica.

PALABRAS CLAVE: *S. phureja*, Cultivo *in vitro*, Meristemas, Auxinas, Citoquininas.

ABSTRACT

Actually, potatoes are one of the major commercial interest food, occupying the fourth position of importance in the food scale, after crops such as corn, rice and wheat. Due to its agricultural importance have been evaluated some biotechnological process to speed up, to improve and to guarantee its production; be the *in vitro* culture one of that biotechnological process. For this reason, the main objective of this work was to standardize a plant growth medium for obtaining plantlets of a mutant potato (*Solanum phureja*-white flower mutant), this, after the analysis of three treatments evaluated, with the aim of development of robust plantlets, with good bearing and coloration. This variety is the result of gamma irradiation (50 Gy) in common Creole potato tubers, for that reason it has a mutation that it is expressed in the change of color of the flower, going from purple to white. Because it is a new variety, is essential to experiment with growing mediums that reduce seedling collection times. In addition, it is proposed to guide the researcher in future micro-propagation works, for which a sowing manual it was developed the methodology used for proper *in vitro* management, from obtaining donor plants, to obtaining plantlets, in a concrete and practical way.

Key words: *S. phureja*, *In vitro*, meristems, auxins, cyto-quinines.

INTRODUCCIÓN

Solanum phureja (papa criolla) se ha convertido en un producto de alto interés en la industria alimentaria-agrícola, puesto que es un tubérculo con un alto nivel nutricional, que puede satisfacer la demanda de alimentos en regiones marginadas, no sólo a nivel nacional, sino también a nivel mundial. Sin embargo, esta especie de papa es muy susceptible a los cambios abruptos de temperatura, por su baja tolerancia, y es atacada constantemente por virus, y otros patógenos durante el cultivo, lo cual reduce la calidad del producto, afectando simultáneamente el cubrimiento de la demanda y la inversión en el mismo. (Igarza, *et. al.*, (2012) citando a otros)

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta muy útil para acelerar los procesos de germinación y desarrollo de las plantas en el campo agrícola, debido a la reducción del tiempo y el espacio, sobre todo en las etapas iniciales de desarrollo. Esta ventaja está dada por el manejo de los factores que favorecen esos procesos; dentro de los que se destacan: la concentración de nutrientes, concentración de hormonas, horas de luz, temperatura, pH, humedad relativa, suministro de oxígeno, entre otros. (Pedroza Manrique, 2008) Todos estos factores deben establecerse en cada ejercicio de cultivo, partiendo de las características y necesidades de la planta que se va a trabajar, en este caso *Solanum phureja* mutante flor blanca.

Así, la estandarización de un medio de cultivo que permita la obtención de plántulas robustas, de buen porte, a través de la micro-propagación de meristemos, se convierte en una forma eficaz de garantizar la calidad del producto, generando una plántula en el menor tiempo posible, y con las mejores condiciones de desarrollo, libre de virus, evitando la pérdida de dinero invertido en el mantenimiento del cultivo, así como también garantiza el cubrimiento de la demanda. (Codesido, Casano , & Meyer , 2017)

En este sentido, este trabajo pretende obtener plántulas de *Solanum phureja*, libres de patógenos, partiendo de la micro-propagación de meristemos (apicales-axilares), los cuales se siembran en 3 medios con diferentes hormonas, para estimular su óptimo desarrollo, esto con el fin de analizar cuál de éstos tratamientos permite una fácil obtención de la plántula, con las mejores características, para finalmente, construir un manual que sirva como base para futuros trabajos con este mutante.

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La papa criolla es un tubérculo propio de la zona andina, que se está convirtiendo en un producto de alto interés comercial, básico de la canasta familiar, que por sus características fisiológicas proveen un gran contenido de nutrientes, por lo que quiere posicionarse como un alimento que garantizará la seguridad alimentaria, no sólo a nivel nacional, sino también a nivel mundial (Herrera, 2000).

A pesar de dicho interés, la papa criolla (*Solanum phureja*) presenta un cultivo muy susceptible a los cambios abruptos de temperatura; lo que dificulta la presencia de esta planta tanto en algunas regiones de Colombia, como en otros lugares del mundo. Al respecto (Rodríguez, Zuluaga , & Cotes, 2011) mencionan que la expansión del cultivo de papa puede verse limitada en las regiones tropicales, debido a la dificultad que presentan los diversos genotipos para adaptarse, así como también al bajo desarrollo de las prácticas agronómicas que permitan un aprovechamiento total de la planta de papa (tanto la parte aérea como del tubérculo-semilla).

Además, la papa con frecuencia es infectada con hongos y otros patógenos que entorpecen la producción y el consumo, al desmejorar las características organolépticas (Igarza, *et. al.*, (2012) citando a otros). De hecho, uno de los patógenos que más afecta la producción de la papa es *Phytophthora infestans*, un hongo que provoca la enfermedad conocida como Gota, Añublo o Tizón tardío, la cual afecta hojas, tallos y tubérculos (Torres H. , 2002).

Por lo anterior, el cultivo *in vitro*; una técnica ampliamente utilizada actualmente para obtener plantas partiendo de pequeños tejidos vegetales (micro-propagación), y así obtener buen rendimiento, con baja área de cultivo y a bajo costo; se ha implementado en varios tipos de plantas de interés agrícola, para mejorar su producción, como es el caso de la caña de azúcar, el arroz, y la papa *S. tuberosum* (Pedroza Manrique, 2008), aunque en algunos casos el cultivo *in vitro* también es utilizado como banco de germoplasma en conservación vegetal (Igarza *et. al.* (2012) citando a Street 1977, Calva y Ríos 1999).

En la actualidad son muy escasos los trabajos que tengan por objeto estandarizar medios de cultivo para este mutante (*Solanum phureja* flor blanca), que es obtenida a través de la radiación con rayos gama 50Gy (Guzmán Vásquez , 2016). De ahí que surja la pregunta: ¿Cuáles son las características de un medio de cultivo que permita la obtención de plántulas de *Solanum phureja*, partiendo de la micro-propagación de meristemas?

OBJETIVOS

GENERAL

- Estandarizar un medio de cultivo para la obtención de plántulas partir de la micro-propagación de meristemas de *Solanum phureja*- mutante flor blanca.

ESPECÍFICOS:

- Comparar el efecto de 3 medios MS, enriquecidos con diferentes hormonas (Fito-regulares de crecimiento), para la estimulación del crecimiento óptimo de plántulas a partir de meristemas de *S. phureja*, tomando como referencia trabajos realizados en *S. tuberosum*.
- Elaborar un manual para el cultivo *in vitro* de la variedad *S. phureja mutante flor blanca* para su manejo en el laboratorio, el cual a su vez facilite el desarrollo de futuros trabajos con esta especie.

JUSTIFICACIÓN

La papa es una especie de reconocida importancia en el mundo, ocupa el cuarto lugar como producto alimenticio agrícola después del arroz, el trigo y el maíz. En Colombia es importante como alimento básico de la población y ocupa un área sembrada de 170.000 hectáreas por año (Herrera, 2000).

En el mundo, alrededor de 825 millones de personas están crónicamente malnutridas, -esto de acuerdo con una estimación reciente de la FAO- y la mayoría de estas personas viven en países de bajos ingresos con déficit de alimentos, que además tienen las tasas más altas de crecimiento de la población. Se calcula que, en el año 2050, unos 6.000 millones de personas vivirán en países que hoy tienen déficit alimentario (Hinrichsen & Robey, 2000). Dado dicho incremento en la población mundial, la producción de alimentos se ha convertido en un importante reto para este siglo, por lo que es fundamental el desarrollo de investigaciones que permitan mejorar el rendimiento y la productividad de los cultivos agrícolas, proporcionando alimentos de mejor calidad y productos a menor costo.

Es por lo anterior que el cultivo *in vitro* de plantas constituye un método que permite obtener una mayor tasa de reproducción en comparación con la clásica propagación mediante esquejes, consiguiendo un mayor número de plantas y reduciendo el volumen que ocupan estas en las salas de cultivo, además de facilitar su transporte y exportación debido a sus óptimas condiciones de esterilidad (Codesido, Casano , & Meyer , 2017), por lo que se convierte en una excelente herramienta para desarrollar estrategias de micro-propagación con productos agrícolas de alto consumo, como es el caso de la papa criolla (*Solanum phureja* mutante flor blanca).

En ese sentido, el cultivo de células y tejidos vegetales, “entendido como el conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos” (Street 1977, Calva y Ríos 1999), partiendo del principio de toti-potencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la

planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul 2000) es una técnica empleada en la producción de papa criolla que ha venido desarrollándose rápidamente gracias a los buenos resultados que se han obtenido y a su gran aceptación. Por lo anterior, es implementada en la industria pues incrementa el número de plantas generadas, reduce el tiempo de multiplicación, posibilita la obtención de grandes cantidades de plantas en espacios reducidos, así como un mayor control a nivel sanitario, su transporte no presenta mayores dificultades y permite multiplicar cualquier variedad de la cual se tengan pocos individuos (Espinoza, Estrada, Tovar, Bryan, & Dodds, 1985).

Tal como menciona Pedroza Manrique (2008), entre las principales aplicaciones del cultivo *in vitro* se encuentran el campo de la micro-propagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica. Se ha previsto que las aplicaciones de la biotecnología al mejoramiento de las plantas darán lugar a productos revolucionarios. Los beneficios inmediatos serán aplicaciones que perfeccionen las técnicas ya existentes y que proporcionen apoyo a los programas de mejoramiento que están actualmente en marcha (Roca, *et al.* 2009).

En este orden de ideas, y reconociendo que Colombia es un país con alta producción de papa, es importante realizar estudios a profundidad que faciliten la obtención y exportación de ésta por medio de su propagación a través del cultivo *in vitro*, pues éstos dan lugar a una producción altamente controlada. Además, éstas técnicas de cultivo no requieren de grandes extensiones de tierra para su propagación, posibilitando el manejo de volúmenes considerables de plántulas en espacios reducidos y en condiciones de asepsia, lo cual ha permitido desarrollar técnicas de producción de plantas libres de virus, mejorando así la calidad y rendimiento del producto. Es imperativo que estas nuevas tecnologías, especialmente relacionadas con cultivo de alimentos, rendimiento de cosechas y aprovechamiento del agua, estén disponibles a nivel mundial, pues en la

actualidad nos enfrentamos a una realidad en la que un importante segmento de la población mundial no tiene que comer (García, 2007).

Es por ello que este trabajo busca estandarizar un medio de cultivo que facilite la micro-propagación de meristemos de la variedad *Solanum phureja mutante* flor blanca, comúnmente llamada papa criolla, que garantice las condiciones del producto, ya que generalmente el cultivo de papa criolla *Solanum phureja* es más susceptible al ataque de plagas y enfermedades que el de papa común, por lo que es preciso tomar todas las medidas preventivas que estén al alcance del productor a fin de evitar su aparición (Piñeros, 2009).

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antecedentes del Cultivo *in vitro* en *Solanum tuberosum*

El Centro Internacional de la Papa es una institución que se ha especializado en el almacenamiento y producción de explantes de papa, con aproximadamente 6.000 clones de diferentes variedades. En el documento de (Espinoza et al., 1985) se exponen en primer lugar las ventajas de llevar a cabo técnicas de propagación *in vitro*, dentro de las que se destacan bajos costos, espacios de siembra y mantenimiento de plantas más pequeños, capaces de albergar mayores cantidades de plantas. Además de incluir una guía de tratamiento para el aislamiento de meristemos, y los medios de cultivo con las hormonas específicas para esta especie (*Solanum tuberosum*). Los autores también especifican las condiciones de almacenamiento apropiadas para las diversas variedades, así como también las especificidades para realizar procesos de exportación de los explantes (Espinoza et. al., 1985).

En lo que se refiere al cultivo *in vitro* la (Universidad de Nuevo León, 2017) estableció una fase de laboratorio para la obtención de plantas a partir de explantes como yemas apicales y axilares, sembradas bajo temperaturas de 18-22°C, con fotoperiodos de 16 horas luz y 8 oscuridad, con humedad relativa entre 60 y 70%. En este proyecto se evaluó el efecto que tiene la tapa en la intensidad de luz recibida por los explantes sembrados *in vitro*; plantearon 4 tratamientos con tapas de polietileno translucido de alta densidad (T1), plástico sólido de color verde (T2), plástico sólido semi translucido (T3), y plástico flexible (T4). Obteniendo que, de los cuatro tratamientos, el T4 fue el que presentó mejor entrada de luz a los explantes, los cuales presentaron mejores condiciones de desarrollo en comparación con los explantes de los tratamientos restantes (Universidad de Nuevo León, 2017).

Además, trabajos como el realizado por (González-Castillo & Chavarría-Reyes, 2016) enfocan la investigación a la micro-tuberización *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. *Banba* con el uso de biorreactores económicos de inmersión temporal. En este proyecto, los autores propusieron el uso del medio convencional MS, enriquecido con GA3 y 6-BAP para la fase de multiplicación, y para la fase de micro-tuberización se trabajaron diferentes cantidades de azúcar con el mismo medio MS, esta vez enriquecido con 6-BAP. Se evidenció que en la fase de multiplicación hubo cambios significativos en la media de altura obtenida, frente a la esperada, pero no hubo diferencias entre las medias de los entrenudos. Además, concluyen que, respecto a la fase de micro tuberización, el azúcar tiene una función determinante para la formación de los mini-tubérculos (González-Castillo & Chavarría-Reyes, 2016).

Por otro lado, (Igarza Castro et al., 2012) realizaron una revisión de literatura científica sobre la producción de la papa por métodos biotecnológicos, describiendo las principales características del cultivo, así como de los procesos de tuberización en condiciones naturales e *in vitro*. Estos autores mencionan que la gran mayoría de las investigaciones desarrolladas en papa se encuentran enfocadas a la mejora fenotípica de las mismas, con fines agronómicos, ya que es una especie que puede garantizar la seguridad alimentaria de muchos países que en la actualidad sufren de hambruna. Por lo que mejorar los procesos de producción de la misma es muy importante para la alimentación mundial (Igarza Castro et al., 2012).

También se han llevado a cabo trabajos que evalúan el comportamiento de diversas variedades de papa en el cultivo *in vitro*, como es el caso del estudio realizado por (Pavón Villegas, 1993) quien evaluó el comportamiento de las variedades Desirée, DTO-28, y Baraka, en tres medios enriquecidos con hormonas como AIA, Kinetina, y GA₃; encontrando que existen diferencias entre los comportamientos *in vitro* de las 3 variedades, siendo Desirée la que registró una disminución en el número de hojas a medida que aumentaron los sub-cultivos. Respecto a los tratamientos la variedad Desirée y Baraka presentaron un

comportamiento aceptable con el tratamiento 2 (MS+Tiamina-HCl), mientras que DTO-28 se adaptó mejor al tratamiento 3 (MS+GA3+Tiamina-HCl). (Pavón Villegas, 1993)

1.2 Generalidades del Cultivo *in vitro*

La llamada micro propagación o cultivo *in vitro*, es una técnica que consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las tecnologías de cultivo de tejidos vegetales (Dominguez, y otros, 2008). Esta herramienta biotecnológica se basa en el concepto de toti-potencialidad celular, en donde cada célula tiene el potencial de producir una planta completa (Margarita , 1988). El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido y producir un mayor número de copias de la planta usada (Hurtado & Merino, 1991).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han tomado importancia a lo largo de la historia, ya que como señalan Domínguez y colaboradores (2008), ofrece una serie de ventajas con respecto a las técnicas convencionales pues, al tratarse de un sistema de propagación clonal mantiene todas las características genotípicas del material inicialmente seleccionado. Adicionalmente, debido a que el proceso se realiza bajo ambientes controlados se convierte en un sistema totalmente aislado de las condiciones externas, por lo tanto, no se ven afectados por sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales. Este sistema aislado permite la obtención de plantas libres de agentes contaminantes tales como bacterias y hongos, logrando con técnicas más específicas liberarlas incluso de virus y viroides (Dominguez, y otros, 2008). Así, el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en un proceso de manufactura que puede producir material vegetal libre o saneado de patógenos, de alta calidad, que puede atravesar las fronteras internacionales, en la industria de la micro-propagación (Morgan, 2016).

El punto de partida para el cultivo de tejidos es la iniciación. Este es el proceso por el cual se trae material vegetal in vivo en un medio de cultivo estéril. Las células y tejidos que crecerán y se desarrollarán desde este inicio dependerán de los objetivos del cultivo de tejidos. En algunos casos las células conformarán una masa aparentemente desorganizada, conocida como callo, en otros estarán presentes otras estructuras reconocibles como tallos, órganos, raíces, bulbos u otros órganos (Morgan, 2016). El medio de cultivo en el que se desarrollan las plantas, 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 con actividad hormonal (Osuna & Saucedo, 2011). Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de una planta, ya que sin agua y nutrientes minerales no puede vivir *in vitro* ni *in vivo*. También se deben añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones (Aceves & Hernández, 1997; citado por Osuna & Saucedo, 2011).

Es conveniente preparar el medio ambiente nutricional incorporando compuestos químicos dentro del gel o líquidos, ajustando el pH alrededor de 6 y esterilizando los medios de cultivo, ya sea dentro del recipiente para cultivo o en uno separado. Para el correcto crecimiento y desarrollo del tejido en cultivo en general es necesario el suministro de luz, pero a intensidades muy bajas, mucho más que la de la luz solar. La acumulación en las plantas de la energía de los carbohidratos provendrá de los azúcares agregados al medio, más que de la fotosíntesis, de manera que son innecesarios unos altos niveles de luz. Una temperatura controlada también es necesaria para estabilizar el crecimiento y mejorar la predictibilidad del desarrollo de los tejidos (Morgan, 2016).

1.2.1. Posibilidad de contaminación con microorganismos:

De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de

contaminación (Morgan, 2016). Los explantes deben ser seleccionados teniendo en cuenta la edad de la planta; es necesario también, considerar el tamaño de éstos y luego someterlos a una progresiva e intensiva desinfección. Resulta además fundamental mantener el banco de plantas donantes libre de enfermedades y plagas con estrictos métodos de control químico y biológico, por ello es conveniente aplicar fungicidas, antibióticos e insecticidas a las plantas donantes (Alvarado, 2000).

1.2.2. Edad fisiológica:

Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemos apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micro-propagación en plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico (Pedroza Manrique, 2008). Si los tejidos son jóvenes, la micro-propagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes (Morgan, 2016).

1.2.3. Tamaño:

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2010).

1.2.4. Época del año:

Es un factor que suele tener mucha importancia en la micro-propagación y que generalmente está asociado a la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos (Morgan, 2016).

1.3 Medios de Cultivo

La propagación *in vitro* de papa se da mediante el sub-cultivo de yemas axilares, se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como micro-tubérculos (Salas, 1995; Agramonte, 1999; Borda et al., 2001; Donnelly et al., 2003; Gopal *et al.*, 2004; Calderón et al., 2008 citados por (Igarza Castro et al., 2012)).

En el cultivo *in vitro* convencional las plantas se cultivan en recipientes cerrados en un entorno aséptico y con la presencia de un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido. El medio de cultivo contiene, además, altas concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, sales inorgánicas, vitaminas y otros aditivos en dependencia de la especie y de la técnica de cultivo (Aragón et al., 2009 citado por (Igarza Castro et al., 2012)).

En la propagación de papa han sido empleados medios de cultivos en estado líquido y en estado semisólido, este último ha sido el más empleado. Los primeros incluyen la facilidad de preparación, esterilización y manipulación, pero en condiciones estáticas provocan un efecto depresivo sobre el crecimiento del tejido en el cultivo *in vitro*, ya sea por hipoxia o por hiper-hidricidad (Pedroza Manrique, 2008). La hipoxia es causada por una baja disponibilidad de oxígeno, necesaria para el desarrollo de los tejidos, que produce serias afectaciones en el crecimiento de los explantes (Orellana, 1998 citado por (Igarza Castro et al., 2012)).

Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir micro-tubérculos cuando se colocan en condiciones adecuadas. Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio

de cultivo, ofreciendo ventajas para el almacenamiento, traslado y plantación en casas de cultivo, así como permiten el intercambio de germoplasma (González-Castillo & Chavarría-Reyes, 2016).

La producción de tubérculos *in vitro* fue descrita por primera vez como una herramienta experimental para el examen de la tuberización de la papa y los problemas fitopatológicos (Barker, 1953; Mes y Menge, 1954 citados por (Igarza Castro et al., 2012)). Desde esa fecha se han utilizado diferentes términos para nombrarlos, por ejemplo: mini-tubérculos producidos *in vitro* (Lewis et al., 1998 citado por (Igarza Castro et al., 2012)), vitro-tubérculos (Mandolino et al., 1996 citado por (Igarza Castro et al., 2012)), pero se ha aceptado internacionalmente el uso del término micro-tubérculos (Igarza Castro et al., 2012). El empleo de plantas *in vitro* y micro-tubérculos en la producción de semilla de papa tiene ventajas con respecto a la semilla convencional ya que están libres de patógenos, se obtiene un gran número en cortos periodos de tiempo, se reducen los costos de labores agronómicas en el mantenimiento de germoplasma en campo, etc. Además, pueden ser propagados en cualquier época del año, se facilita el intercambio de material genético y se reduce el riesgo de pérdidas genéticas al evitar la mezcla del material vegetal por cruzamiento (Rigato, González, & Huarte, 2001).

Sin embargo, se requiere personal especializado, infraestructura y equipamiento, con productos químicos de elevado costo (Pérez et al., 1998). Por otra parte, en la producción de semilla de papa por métodos biotecnológicos en la siembra directa de plantas *in vitro* en campo se producen pérdidas en el traslado. En consecuencia, se elevan los requerimientos de atenciones culturales por personal altamente calificado, se han incrementado las pérdidas de tubérculos en las cosechas por daños o enfermedades, así como la conservación, debido principalmente a la alta presencia de microorganismos patógenos del suelo (Jiménez-Terry et al., 2000).

1.3.1. Hormonas Vegetales:

El término Hormona Vegetal se ha utilizado para caracterizar a un grupo de sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas, que intervienen en diversos procesos fisiológicos, en concentraciones muy bajas. El sitio de síntesis de estas hormonas no está restringido a un órgano específico, como sucede en animales. Las hormonas pueden ejercer su efecto tanto a cierta distancia de su sitio particular de síntesis, como en el mismo tejido o incluso en la misma célula. Por lo anterior, algunos autores han sugerido el término Regulador de Crecimiento Vegetal, para caracterizar a las sustancias sintetizadas naturalmente por las plantas (Guevara & Jiménez, 2006).

Julius von Sachs (1887) definió a las fitohormonas como señales químicas que permiten la comunicación entre las células; estas regulan el crecimiento y desarrollo a través de regulación de patrones de división celular, expansión celular, diferenciación celular y metabolismo celular; el efecto depende de la concentración en el tejido (transporte, síntesis, degradación) y la sensibilidad del tejido; así mismo, actúan en muy bajas concentraciones, pueden actuar sobre tejidos cercanos o distantes, pueden tener actividad inductora o inhibidora (FAGRO, 2012).

1.3.1.1. Tipos de Hormonas trabajadas tanto en Cultivo *in vitro*, como en la producción agrícola:

Los cinco principales grupos de hormonas vegetales son: Auxinas (Ácido Indo acético (AIA), Ácido Indo butírico y el Ácido 4-cloro-indolacético), Cito-quininas (Zeatina, 2-isopentenil adenina (2-iP), 6-benzilaminopurina (BAP)), Giberelinas (ácido giberélico GA₃), Etileno, y el Ácido Abscísico (ABA). La mayoría de los procesos químicos parecen estar gobernados por la interacción de los compuestos pertenecientes a dos o más de estos grupos, ya sea en forma simultánea, o en orden secuencial. Hay otros compuestos que se sintetizan de forma natural en la planta, que no han alcanzado la denominación de hormona, y que son capaces, en ciertos casos, de modificar el desarrollo de la planta, lo que quiere decir que tienen actividad reguladora. Dentro de esas se encuentran: Poliaminas, Jasmonatos, Ácido Salicílico, y los Brasinoesteroides. (Guevara & Jiménez, 2006)

1.3.1.1.2. Auxinas: El término auxinas del griego “*Auxein*” que significa: aumentar, crecer; agrupa a una serie de compuestos químicos naturales o sintéticos que causan diversos efectos biológicos a las diferentes especies vegetales o variados efectos en una misma especie, dependiendo de la etapa fenológica en que se efectúe su aplicación. Como ejemplo de la variedad de respuestas, la Auxina más típica es el Ácido Indo acético (AIA), derivado del triptófano, que se sintetiza principalmente en ápices del brote y en las raíces; se transportan de célula a célula por el floema. Entre algunas respuestas fisiológicas, provoca estimulación del crecimiento del tallo, estimulación de la división celular, inhibición del crecimiento radical, control sobre la diferenciación del sistema vascular y sobre la dominancia apical, retraso en la senescencia, promoción de la floración, así como amarre y maduración de frutos (Larqué-Saavedra y Rodríguez-González, 2004 citados en (FAGRO, 2012)). Una de las aplicaciones más importantes que se les adjudican a los compuestos auxínicos es la estimulación de la formación de raíces en la reproducción de ejemplares (FAGRO, 2012).

1.3.1.1.3. Giberelinas: Las giberelinas son el grupo más numeroso de hormonas vegetales que se conoce en la actualidad; existen más de 100 giberelinas en plantas superiores, pero unas pocas tienen actividad biológica. La mejor conocida del grupo, es el ácido giberélico GA3, producido por el hongo *Giberella fujikuroi*. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. Se sintetizan por la vía de los terpenoides. Algunos de los efectos que induce esta hormona es la inducción del crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y el adulto, inducción de la floración y la determinación sexual de la flor, inducción de la germinación, además de promover la elongación intermodal. La respuesta más observada en las plantas superiores, es un incremento notable de crecimiento del vástago: a menudo, los tallos se vuelven largos y delgados, con pocas ramas, y las hojas palidecen, estimula la producción de la enzima α -amilasa y otras enzimas en la germinación de granos de cereales para la movilización de las reservas de la semilla (FAGRO, 2012).

1.3.1.1.4. Citoquininas: Las citoquininas son los compuestos que promueven la división de la célula en tejidos no meristemáticos. Estos compuestos se han encontrado en todas las plantas, particularmente en los tejidos que se dividen en forma activa como meristemos, semillas en germinación, frutos en maduración y raíces en desarrollo. Las citoquininas se han detectado en concentraciones generalmente inferiores a las restantes fitohormonas. Se han detectado tanto en el floema como en el xilema y su transporte en la planta es por vía acropétala, desde el ápice de la raíz, hasta los tallos moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema. Los diferentes tipos de citoquininas son zeatina (*Zea mays*), kinetina y benziladenina. Los efectos fisiológicos causados por la citoquininas varían dependiendo del tipo de citoquinina y la especie de la planta: estimulan la división celular y el crecimiento de yemas laterales, formación de callos en presencia de auxinas, retrasan la senescencia e inhiben la dominancia apical entre otros efectos (FAGRO, 2012).

1.3.1.1.5. Ácido Abscísico: El ácido abscísico (ABA) se caracteriza por inhibir muchos fenómenos de crecimiento en las plantas superiores (antagonista de auxinas, citoquininas y giberelinas), y por estar asociada a la dormición de yemas y semillas; y como su nombre lo indica, a la abscisión de hojas, tolerancia al estrés ambiental principalmente al estrés hídrico promoviendo la síntesis de proteínas protectoras, promueve el crecimiento de la raíz y el cierre de estomas. Esta hormona juega un papel regulador en respuestas fisiológicas como el letargo, abscisión de hojas. La biosíntesis tiene lugar en semillas, frutos, tallos y raíces (FAGRO, 2012).

1.3.1.1.6. Etileno: El etileno es una hormona natural de la planta que se conoce desde hace muchísimos años, fue usada en Egipto en donde se trataban con gas los higos para estimular su maduración. Se produce en casi todos los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción depende del tipo de tejido y su estadio de desarrollo. Promueve la maduración de los frutos (climatéricos) y la senescencia (flores y hojas), induce la abscisión de las hojas y promueve el

crecimiento lateral (pérdida de gravitropismo) la cual es importante durante la germinación. (Pedroza Manrique, 2008)

1.3.2. Usos de las Hormonas en el campo Agrícola:

La producción agrícola busca ajustarse lo más estrechamente posible a las demandas del mercado, por lo que la aceleración o la ralentización del proceso de obtención de determinados cultivos y ciertos productos vegetales es una estrategia cada vez más importante. La manera habitual de lograrlo es la modificación de la velocidad de desarrollo y maduración de frutos, tejidos vegetativos y flores (Benítez, 2005).

1.3.2.1. Control de la tasa de crecimiento:

La manipulación del contenido en giberelinas es el procedimiento más interesante desde el punto de vista agronómico para controlar la tasa de crecimiento del cultivo, ya que actualmente se emplean en agricultura diversos retardantes del crecimiento sintéticos, análogos a las giberelinas, como el clomequat. Los principales logros se han obtenido mediante la sobreexpresión en *Arabidopsis* de la GA₂₀ oxidasa, que aumenta los niveles de GA₄, la principal giberelina con actividad biológica, que se traduce fenotípicamente en un aumento de la longitud de los hipocótilos y de los tallos, en un adelanto de la floración, y un acortamiento de la dormancia de las semillas (Benítez, 2005).

1.3.2.2. Control de la Floración: Es importante porque permite controlar el flujo de material genético hacia las especies silvestres emparentadas con el cultivo transgénico, así como regular la fenología de los cultivos y, por lo tanto, establecer el momento óptimo de la madurez del producto vegetal y su recolección (Benítez, 2005).

1.3.2.3. Control de la maduración de los frutos: En las plantas climatéricas el etileno es la hormona que desencadena la maduración de los frutos. Se ha conseguido retrasar con éxito el inicio de dicha maduración suprimiendo mediante una construcción anti-sentido la expresión del gen de la 1-aminociclopropan-1-

carboxilato sintasa (ACCS) y/o de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACCO), que son dos enzimas de rutas biosintéticas de la hormona (Benítez, 2005).

1.4. Técnicas desarrolladas para cultivar tejidos vegetales *in vitro*

Son diversas las técnicas que se utilizan en la micro-propagación, pero su clasificación dependerá de los tratamientos, los explantes utilizados (según su nivel de complejidad), según el tipo de medio aplicado y el interés del investigador respecto al uso que se le va a dar al material (mejoramiento genético, conservación de germoplasma, propagación) (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2010)

1.4.1. Estimulación de yemas axilares: La estimulación de las yemas axilares o adventicias es el proceso más común que se conoce para la micro-propagación de las plantas. Aquí, las citoquininas causan una generación continua de estas yemas en la base del cultivo que prolifera. Cada yema desarrolla en un tallo enraizado, el cual, a su vez, puede producir más yemas en su base. Esta proliferación de tallos y yemas continuará siempre que sea mantenido un suministro adecuado de citoquinina, junto con nutrientes y espacio físico por subdivisión de los cultivos y transferencia de los mismos a medio fresco cuando sea necesario. Alternativamente, el tallo puede separarse del suministro de esta hormona, la cual tiende a suprimir la formación de raíces, y ser transferido a medio nuevo conteniendo una hormona del grupo de auxinas, las cuales estimularán el desarrollo radicular en la base del tallo. Tales tallos enraizados pueden transferirse luego afuera del ambiente estéril del cultivo de tejido y, con cuidadoso control de humedad y luz, ser aclimatadas para volverse plantas que crece convencionalmente en forma dependiente de la fotosíntesis (Morgan, 2016).

1.4.2. La embriogénesis: La embriogénesis es otro método que puede usarse para propagar las plantas en masa. Como indica su nombre, esta técnica causa que se formen embriones generados desde el tejido en cultivo, proceso que por otra parte sólo ocurre en la formación de una semilla. Bajo el control de ciertas

mezclas hormonales se forman los embriones dentro de una masa aparentemente desorganizada de un callo, en el cual nódulos de células comienzan a desarrollarse en forma que recuerda la estructura de un embrión de semilla. Si estos embriones se trasladan a otros medios, desde los callos, medios que están diseñados para permitir que el embrión germine, entonces desarrollará una estructura de planta completa, esto es una plántula, un talluelo enraizado que no difiere mayormente de la obtenida desde semilla. Como las plantas obtenidas por caulogénesis axilar o adventicia, estas plántulas también pueden aclimatarse para transformarse en una planta viable con capacidad de fotosíntesis (Morgan, 2016).

1.4.3. Inducción de variación soma-clonal: En este caso se pueden utilizar varios explantes, pero si la finalidad de su utilización es la aplicación en planes de mejoramiento genético de plantas, los explantes utilizados deben posibilitar la regeneración de plantas enteras (Pedroza Manrique, 2008).

1.4.4. Producción y/o conversión de sustancias útiles: Se puede utilizar una gran variedad de explantes. Los de raíces suelen ser muy utilizados (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2010).

1.4.5. Obtención de híbridos somáticos: Para esta finalidad se recurre a la fusión de protoplastos. En la mayoría de los casos se aíslan los protoplastos de mesófilos de hojas y de suspensiones celulares. (Pedroza Manrique, 2008)

1.4.6. Conservación e intercambio de germoplasma: Los meristemos son los explantes preferidos para el desarrollo de sistemas de conservación a mediano y largo plazo (crío-conservación con nitrógeno líquido) y para el intercambio de material genético. (Pedroza Manrique, 2008)

1.4.7. Establecimiento de suspensiones celulares: En este caso se recomienda iniciar los cultivos a partir de explantes extraídos de semillas en germinación (hipocótilo, epicótilo, cotiledones, raíces) (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2010).

En este trabajo se implementarán los meristemos para la obtención de plántulas de *S. phureja*–variedad flor blanca, debido a que estos son considerados como partes de la planta que muestran pocos rasgos de diferenciación (especialización) celular, y mantienen su capacidad de división, permitiendo que nuevas células se adhieran al cuerpo vegetal maduro. Las células meristemáticas tienen origen embrionario, razón por la que son capaces de dar origen a otros tejidos adultos y diferenciados. Este tipo celular es capaz de mantener de forma indefinida su actividad de multiplicación celular (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013).

1.5. Los Meristemos

Las células del meristemo que conservan perdurablemente su facultad de dividirse reciben el nombre de células iniciales y las que se transforman en elementos de los diversos tejidos son las células derivadas de las iniciales, las que pasarán a ser células adultas cuando cumplan el proceso de crecimiento, diferenciación celular y de estabilidad fisiológica que las caracterizará como componentes de los diversos tejidos de una planta. Una célula inicial meristemática típica, como por ejemplo de un ápice, tiene las siguientes características: forma isodiamétrica, paredes celulares primarias delgadas, comunicadas por campos de puntuaciones primarios, citoplasma denso y vacuolas pequeñas y numerosas, núcleos con posición central y relativamente grandes con respecto al volumen celular, plastídios al estado de proplastídios, ausencia de inclusiones celulares, presencia de abundantes mitocondrias, numerosos dictiosomas y microtúbulos en posición paralela a la pared celular (rasgos que develan importante actividad propia de células en activa división). Además, los espacios entre las células meristemáticas son muy pequeños o directamente están ausentes (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013).

1. 5.1. Clasificación de los Meristemos:

Según (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013) los meristemos pueden ser clasificados teniendo en cuenta diferentes criterios.

1.5.1.1. Por su origen:

1.5.1.1.1. Meristemos primarios o promeristemos: son los meristemos que proceden directamente de las células del embrión.

1.5.1.1.2. Meristemos remanentes: son restos de meristemos primarios formados por grupos o cordones de células meristemáticas incluidas entre tejidos adultos.

1.5.1.1.3. Meristemos secundarios: son los meristemos integrados por células adultas que retoman la capacidad de división.

1.5.1.1.4. Meristemoides: son los meristemos compuestos por células embrionarias individuales o en pequeños grupos que han conservado su actividad meristemática, y que después de un período de reposo la retoman. Se observan en la epidermis y son responsables de la formación de estomas y tricomas (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013).

1.5.1.2. Por su posición en el cuerpo de la planta:

1.5.1.2.1. Meristemos apicales: son los meristemos terminales del tallo, las ramificaciones y la raíz.

1.5.1.2.2- Meristemos laterales: se hallan localizados entre el xilema y el floema secundario en tallos y raíces que se encuentran en crecimiento secundario.

1.5.1.2.3.- Meristemos intercalares: se encuentran en la base de los entrenudos, permitiendo el alargamiento de los mismos. (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013)

1.5.1.3. Por el tipo de crecimiento que producen:

1.5.1.3.1. Meristemos primarios o promeristemos: Originan el crecimiento (en longitud) del cuerpo primario de la planta.

1.5.1.3.2. Meristemos secundarios: Producen el crecimiento (en grosor) del cuerpo secundario de la planta. (Pérez de Bianchi, Martín Montiel, & Quiroga, 2013)

1.6. La variedad *Solanum phureja*

La especie *Solanum phureja* es originaria de América tropical, extendiéndose desde México hasta el norte de Chile. Taxonómicamente pertenece a la familia Solanácea, serie tuberosa, de las cuales en Colombia se producen 4 especies, dentro de las de que destacan comercialmente *Solanum tuberosum spp. andigena* y la *Solanum phureja* (papa criolla). Los productos de estas plantas tienen un tamaño aproximado de 2 a 8 cm aproximadamente, teniendo un peso promedio de 30 gramos por tubérculo, siendo este altamente perecedero y no climatérico (incapaz de continuar su proceso de maduración una vez ha sido separado de la planta) (Buitrago, López, Coronado, & Osorno, 2004).

1.6.1. Eco-fisiología:

La papa criolla puede crecer en zonas que abarcan desde los 1.800 a los 3.200 m.s.n.m., siendo óptimas para su desarrollo en cultivo las zonas que van desde los 2.300 a los 2.800 m.s.n.m., lo que equivale a un rango de temperatura de 10°C a 20°C. El cultivo requiere una precipitación promedio de 900 mm de lluvia al año; sin embargo, el cultivo se desarrolla bien con precipitaciones superiores (Cálculos MEGA Sumapaz, 2012).

La planta tiene un hábito de crecimiento erecto, follaje de color verde claro, la flor es blanca; los tubérculos son de forma redonda., tiene ojos semi-profundos, su piel y carne son de color amarillo, tiene una maduración temprana (120 días aproximadamente); es moderadamente resistente a la gota *P. infestans*; el periodo de reposo es de 15 días, y es de excelente calidad para el consumo en fresco, con un rendimiento de 22 a 25 t/ha (Corpoica, 2006).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación:

Esta investigación es de tipo cuantitativo - experimental, ya que como lo explica (Tamayo y Tamayo, 1997) en este tipo de investigación se presenta la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones controladas, con el fin de describir de qué modo, o por qué causa se produce una situación.

2.2. Definición de la población:

Se trabajaron 360 unidades experimentales, entendidas como cada uno de los frascos de vidrio con medio MS, que contiene un total de 5 meristemas. De las 360 unidades experimentales, se destinaron 90 frascos para cada tratamiento, llevando a cabo 3 repeticiones de cada uno.

2.3. Definición de las variables:

En este trabajo se evaluaron tres variables dependientes principalmente -definidas por (Buendía, Colás, & Hernández, 2001) como el resultado de la aplicación de la variable independiente en la investigación-, la longitud de tallo alcanzada por cada meristemo, el número de hojas desarrolladas y el número de nudos presentes en cada plántula a las 8 semanas de cultivo; siendo los tratamientos la variable independiente -definida por (Buendía, Colás, & Hernández, 2001) como aquella variable que el investigador puede manipular, y de la que se evaluará su efecto durante el experimento-.

2.4. Análisis estadístico: ANOVA, Prueba de Tukey:

Se empleó el análisis estadístico ANOVA con la prueba de Tukey en un nivel de significancia de 5% dado que permite determinar diferencias significativas entre tratamientos aplicados a variables dependientes determinadas por el investigador. (Otero, Herrarte, & Medina, 2005) Así, con el uso de dicho análisis se pudo determinar si los 3 medios utilizados tienen o no resultados significativos para regenerar plántulas de *Solanum phureja* – mutante flor blanca a partir de meristemas.

2.5. Fases De Trabajo:

2.5.1. Fase I: Preparación Del Material Vegetal:

Se trabajó con semillas asexuales de papa *Solanum phureja*, (mutante irradiada flor blanca), las cuales fueron sembradas en el invernadero de la finca “El Capricho”, ubicada en el kilómetro 16, del municipio El Rosal (vía Subachoque). Se sembraron dos tubérculos por bolsa, adicionando una mezcla de tierra y cascarilla de arroz, con 5 gramos del fertilizante 15-15-15, realizando riego dos veces por semana.

Una vez las plantas alcanzaron los 55 días después de la siembra, se seleccionaron los explantes, realizando un corte desde la zona más basal posible de la planta. Dichos explantes fueron llevados al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UDFJC, donde se realizó el proceso de extracción de los meristemos. Cabe resaltar que las plantas fueron roseadas con una solución de Ácido Ascórbico al 1%, antes y después de los cortes, para reducir la oxidación de los explantes. Antes de la extracción de los meristemos, fue necesario llevar a cabo un procedimiento de desinfección que incluyó lavados con una solución de Hipoclorito de Sodio y Tween 80%. (Ver protocolo de desinfección establecido)

2.5.2. Fase II: Obtención De Las Plántulas in vitro

Se evaluaron 3 medios de cultivo MS cada uno con hormonas diferentes (ver tabla 1) sembrando 90 unidades experimentales (5 meristemos por frasco) de *Solanum phureja*, mutante irradiada flor blanca por cada uno de los tratamientos, teniendo una población de 360 meristemos en total, incluyendo en esta última los 90 frascos del control. (Ver anexo 3)

Una vez alcanzaron las 8 semanas posteriores a la siembra, se evaluó el crecimiento de estos tomando en cuenta el color, la longitud del tallo, el número de hojas, el número de nudos, la presencia o ausencia de raíz, micro tubérculos, y contaminación para los 5 meristemos de cada unidad experimental.

La siguiente tabla relaciona las hormonas empleadas en los diferentes tratamientos, teniendo como base el medio MS:

TRATAMIENTOS	KINETINA	AIA	CONCENTRACIONES
---------------------	-----------------	------------	------------------------

CONTROL (T4)	-	-	0
TRATAMIENTO 1	-	200µl	2uM
TRATAMIENTO 2	200µl	-	2uM
TRATAMIENTO 3	400µl	200µl	2uM

TABLA 1: Relación de tratamientos. Se muestran los diferentes tratamientos que fueron aplicados en este trabajo por cada litro de medio de cultivo preparado. También se muestran las concentraciones de las hormonas trabajadas, en micro-moles (uM).

2.5.3. Fase III: Comparación y Análisis:

Se definió el rendimiento de cada medio de cultivo a través de un ANOVA con el estadístico de Tukey, el cual permitió determinar si existen diferencias significativas entre los medios trabajados, lo que evidencia cuál de los tratamientos evaluados presenta el mejor crecimiento de la plántula, con las mejores características.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. FASE DE CAMPO:

La selección de los tubérculos semilla se realizó teniendo en cuenta el tamaño de los mismos, ya que de este depende el número y la calidad de plantas obtenidas, en ese sentido tanto (Peña, 1990) como (Torres, Montesdeoca, & Andrade-Piedra, 2013) destacan que entre mayor sea el diámetro, mayor será también su productividad y rendimiento en campo. Este parámetro fue estrictamente revisado, debido a que en ejercicios de siembra realizados previamente no se logró obtener plantas donantes en buenas condiciones, porque el tamaño del tubérculo escasamente alcanzaba los 3 cm de diámetro en la mayoría de los casos, lo cual originó plantas de poca robustez, baja área foliar y con deficiencias en nutrientes (evidenciadas por coloraciones amarillas en las hojas y tallo). Al respecto, (Torres, Montesdeoca, & Andrade-Piedra, 2013) citando a (Huaraca, Montesdeoca, & Pumisacho, 2009) relacionan las características que se deben tener en cuenta cuando se realiza una selección de tubérculos semilla mostradas a continuación:

Características	Tamaño del tubérculo-semilla		
	Grande	Mediano	Pequeño
Peso (g)	Mayor a 100	40 a 100	Menor a 40
Tamaño (cm)	Mayor a 8	4 a 8	Menor a 4
Comportamiento ante condiciones adversas (sequía o heladas)	Se recupera fácilmente	No todas se recuperan	No se recuperan
Cantidad para sembrar 1 ha ¹ (qq ²)	50	42	35
Costo del tubérculo-semilla	Alto	Medio	Bajo

*Depende de la variedad.

**1 qq = 45 kg

TABLA 2: Características y Tamaño del tubérculo semilla en papa, por el Centro Internacional de la Papa, citando a (Huaraca, Montesdeoca, & Pumisacho, 2009)

En la tabla 2 se observa que el tamaño es determinante para el desarrollo de la semilla en campo, ya que una semilla grande favorece la recuperación de las plantas ante condiciones climáticas adversas, las cuales son muy comunes en

Colombia, sobre todo durante los inicios del año, cuando el país es afectado por diversos fenómenos climáticos. Además, el gran tamaño de la semilla de papa facilita el crecimiento acelerado de las plantas, y les proporciona una mayor capacidad de rebrote, lo que les permite sobrevivir en condiciones extremas (Naranjo, 1978); (Oyarzún, y otros, 2002).

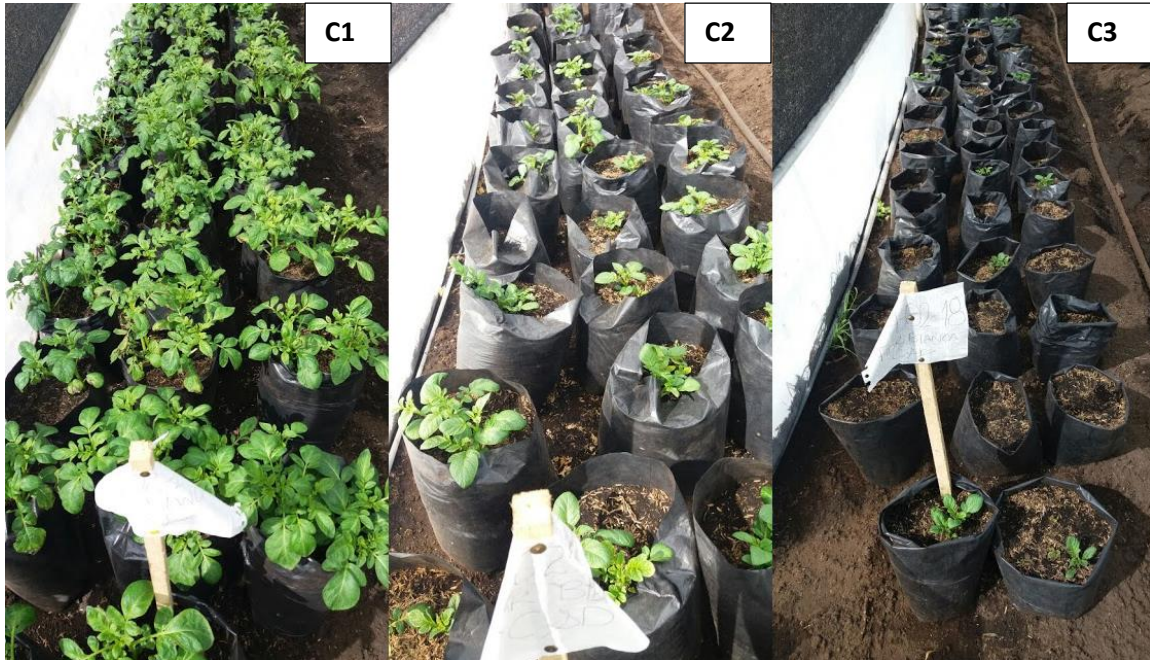
No obstante, para este trabajo se seleccionaron tubérculos semilla de tamaño mediano dado que el interés era obtener la mayor cantidad de plantas posibles, y como lo mencionan (Naranjo, 1978); (Oyarzún, y otros, 2002)) los tamaños medios y pequeños poseen más ojos por unidad de peso y por ello producen más tallos, adicionalmente, el factor climático no tenía influencia directa en la zona de cultivo, ya que se trabajó en el invernadero, por lo que el efecto de las heladas en los primeros meses del año no impactó directamente el cultivo de las plantas.

Además del tamaño, los tubérculos semilla deben cumplir con características como no presentar deformidades, no ser muy pequeños ya que “la papa es el tejido del cual los brotes toman los nutrientes en sus fases iniciales de crecimiento, por lo que un tamaño muy reducido puede dar origen a plantas de poca robustez y baja área foliar” (Peña, 1990), estas, no deben presentar daños mecánicos, haber alcanzado la madurez precisa, “puesto que de no ser así, generan plantas en períodos de tiempo demasiado largos, y esto no resultaría favorable en el desarrollo del presente trabajo; además no deben presentar lesiones por enfermedades y/o plagas, ya que el objetivo es llevar al laboratorio explantes que faciliten la obtención *in vitro* de plántulas de papa libres de patógenos. Y finalmente, presentar un tejido firme, ya que aquellos que se encuentran blandos son más susceptibles a la pudrición” ((Naranjo, Mastrocola, & Pumisacho, 2002) (Pumisacho & Velázquez, 2009)).

Una vez evaluados los parámetros arriba mencionados, se llevó a cabo la siembra de los tubérculos semilla bajo condiciones de invernadero de forma escalonada con diferencia de una semana, sembrando 50 bolsas, cada una con 2 tubérculos semilla, esto, con el objetivo de lograr como mínimo 100 plantas en cada ejercicio

de siembra (una por cada tubérculo sembrado) se hicieron 3 siembras, (3 semanas consecutivas), esperando conseguir una población mínima total de 300 plantas. Este ejercicio se realizó entre el 09 y el 23 de febrero de 2018. Luego de la siembra, se ejecutó el manejo del cultivo, haciendo riegos dos veces por semana (cuando el clima era demasiado seco) –las altas temperaturas externas aumentaban la temperatura interna del invernadero, por lo que era necesario refrescar el ambiente realizando riegos, evitando así la deshidratación de las plantas-, y uno solo si se presentaban lluvias frecuentes durante la semana –las lluvias mantenían un ambiente fresco dentro del invernadero-.

Las plantas debían colectarse una vez alcanzada una edad fisiológica de 55 días, pues tal como lo menciona (Pavón Villegas, 1993), en este periodo son metabólicamente más activas, oscilan entre los 30 y 40 cm de longitud, lo cual garantiza un mayor número de meristemas, sobre todo axilares. Por lo que debía garantizarse un control fitosanitario que asegurará la sanidad de las plantas durante el tiempo de crecimiento. Para cumplir ese requisito se llevaron a cabo 2 fumigaciones con una solución de Benlate al 1%; a las 3 y a las 6 semanas posteriores a la siembra, para evitar la aparición de hongos en las hojas de la planta de papa. Estas fumigaciones se complementaron con aplicaciones de insecticidas sobre las plantas y herbicidas en los alrededores de las bolsas, esto ayudó a mantener libres de cualquier patógeno las plantas sembradas; este cuidado fue fundamental para obtener explantes de buena calidad (Pedroza Manrique, 2008). Estas medidas fueron adoptadas debido a ensayos previos, en donde no se realizó un manejo adecuado del cultivo durante la fase de campo, y a pesar de haber conseguido plantas donantes de buen porte, éstas presentaban hongos en las hojas, así como también presencia de insectos; por lo cual se obtuvieron explantes en malas condiciones y con altos niveles de contaminación. En consecuencia, para ese ensayo previo no fue posible obtener plántulas *in vitro* vigorosas o robustas, ni tampoco libres de patógenos.



Propiedad de las autoras. Marzo 17/2018

FIGURA 1: Fotografía en campo de las plantas donantes, tomada a las 5 semanas de la siembra - cama 1 (C1); 4 semanas - cama 2 (C2); y 3 semanas - cama 3 (C3).

Tal como se observa en la figura 1, los tubérculos semilla seleccionados para la obtención de las plantas donantes mostraron un buen rendimiento, pues siguiendo lo referido por (Peña, 1990), el rendimiento de un tubérculo semilla puede ser evaluado por el número de plantas que se generan a partir de esta. En este caso se obtuvieron hasta 3 plantas por semilla, lo cual generó un número de plantas considerablemente mayor al esperado.



Propiedad de las autoras. Abril 04/2018

FIGURA 2: Evolución de las plantas en fase de invernadero a las 8 (C1), 7 (C2), y 6 (C3) semanas respectivamente. Para estas semanas las plantas de la cama C1 ya habían alcanzado el tiempo de colecta, (55 días con aproximadamente 35 cm de altura). Las camas C2 y C3 mostraban un buen rendimiento, aunque las plantas aún no llegaban a la edad fisiológica adecuada debido a la siembra escalonada.

Respecto a la colecta del material vegetal, se determinó que para prolongar la vida útil de los explantes es preciso realizar una aspersión con ácido ascórbico en solución al 1% (m/v) antes y después del corte de la planta donante, esto evita la oxidación del explante, y le permite conservar su textura, facilitando la extracción del meristemo (Azofeifa, 2009) (Pedroza Manrique, 2008). Esto se estableció teniendo en cuenta que en un ensayo previo los explantes seleccionados fueron sumergidos en esta solución hasta el momento de la desinfección, encontrando tallos turgentes y oxidados, cuyos meristemas en la mayoría de los casos se encontraban completamente inviables. El transporte de los explantes se realizó cubriéndolos con papel absorbente y transportándolos en una bolsa de tela que les proporcionara una aireación constante (Figura 3).



Propiedad de las autoras. Abril 16/2018

FIGURA 3: Colecta de las plantas donantes: **A:** Se puede apreciar la altura a la cual se cortaron las plantas donantes (previamente roseadas con ácido ascórbico al 1% m/v) para obtener los explantes que fueron llevados al laboratorio. Como se puede observar, el tallo fue podado en la parte más basal, dejando alrededor de tres centímetros del tallo en la bolsa. **B:** Se observan los explantes seleccionados. **C:** Muestra el almacenamiento de los explantes para llevar a cabo el transporte al laboratorio.

3.2. FASE DE LABORATORIO:

Esta fase se subdividió, teniendo en cuenta que, al llevar el material vegetal al laboratorio, los medios de cultivo que serían evaluados ya debían estar listos. En ese sentido, se llevó a cabo una etapa de preparación de los tratamientos evaluados (ver tabla 1, y anexo 1), los cuales fueron preparados a tres días de la colecta en campo, auto clavados a 121°C por 20 minutos, y almacenados en el refrigerador hasta el momento de la siembra. Cabe resaltar que, por la experiencia del último ensayo, en donde se presentaron altos niveles de contaminación se decidió añadir a los medios de cultivo MS 50mg/l de un antibiótico de amplio espectro, en este caso se usó la amoxicilina– la frecuencia en la incorporación de antibióticos en el medio de cultivo mejora la técnica de cultivo de tejidos- (Coriell, 1979; De la Rosa, 1988; citados por Valenzuela & Armendáriz 2011). Adicionalmente, es importante destacar que como agente solidificador se utilizó Phytigel, que a diferencia del agar, está compuesto por ácido glucorónico,

ramanos, y glucosa, que al ser elementos sustitutos de la agarosa, varían su potencial mátrico (capacidad para solidificar el medio), siendo este más bajo, permitiendo una mayor disponibilidad de agua para el explante cultivado *in vitro* (Afanador Pérez, 2005).

La segunda etapa fue la preparación del material y su posterior desinfección. Aquí el material fue separado de las hojas, dejando solamente el tallo con pequeños restos del peciolo que cubre la yema axilar, de la cual se tomó el meristemo. Se realizó este proceso para proteger el meristemo de la abrasión de la desinfección.

3.2.1 PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN:

La desinfección es un proceso fundamental para el trabajo de cualquier especie vegetal en el cultivo *in vitro*, ya que el objetivo de esta técnica es la obtención de plántulas libres de patógenos (Pedroza Manrique, 2008). Sin embargo, llevar a cabo un proceso de desinfección no es una tarea fácil si se tiene en cuenta que los agentes químicos utilizados en la mayoría de los casos son muy agresivos, y pueden dañar el explante, matándolo antes de llevarlo al cultivo (Azofeifa, 2009). Esto pudo comprobarse en ensayos anteriores, donde se utilizaron lavados con reactivos como Etanol 70% (v/v) teniendo en cuenta el protocolo de desinfección empleado por Llanco (2013) en su trabajo de cultivo *in vitro* desarrollado con la especie *Solanum tuberosum ssp andigena*, adicional a esto, se empleó Benlate en solución al 2% (v/v), NaClO en solución al 2% (v/v), y un lavado con solución jabonosa, dicho protocolo causó lesiones en la mayoría de las plantas, provocando la oxidación y posterior muerte de los meristemos en los medios de cultivo. Por tal razón, se eliminaron los lavados con Etanol al 70% (v/v) y Benlate al 2% y adicional a ello, se redujo la concentración de NaClO de 2% al 1% (tomando como base el Hipoclorito comercial que está en una concentración del 5%), esta modificación se realizó teniendo en cuenta las observaciones de Roca y Mroginski (1991), quienes indican que el hipoclorito de sodio además de ser un desinfectante es un agente altamente oxidante, por lo cual, si la concentración de hipoclorito de sodio se reduce, los problemas de oxidación también.

Tal como lo menciona (Pedroza Manrique, 2008) el establecimiento de un cultivo aséptico requiere el control de las fuentes de contaminación ambiental, tanto superficial como endógena de los explantes, por lo que debe hacerse un control sanitario riguroso en la planta madre que permita disminuir la contaminación superficial. Por tal razón, el uso de agentes anti fúngicos, como el Benlate, también denominado Benomil, se debe realizar *in situ (en campo)*, y no cuando ya se ha tomado el explante, puesto que el uso de estas sustancias favorece a oxidación de los tejidos, así como también la acumulación de fenoles y derivados en los medios de cultivo, lo que a largo plazo genera grandes pérdidas tanto de material vegetal como de reactivos. (Torres, Montesdeoca, & Andrade-Piedra, 2013)

En ese sentido, el protocolo de desinfección establecido fue:

1. Preparación de solución jabonosa con Tween al 80% en agua destilada, de dos a tres gotas para lavado, teniendo en cuenta que el agua debe cubrir la superficie de los explantes. Esto debe trabajarse de preferencia en un recipiente amplio que permita el movimiento del agua sobre los explantes, ya que se debe mantener en agitación constante durante 5 minutos (hasta alcanzar abundante espuma).
2. Descartar el agua jabonosa, realizar un lavado con agua destilada, volver a descartar y repetir hasta retirar la espuma. (En este caso dos lavados fueron suficientes)
3. Aplicar una solución de NaClO al 1% sobre los explantes, dejar actuar por 2 minutos, agitando constantemente el recipiente que los contiene.
4. Descartar la solución de NaClO 1%, y lavar con abundante agua destilada por 3 minutos, retirar dicha agua y repetir el lavado con agua destilada dos veces más, por 2 y 1 minutos respectivamente.
5. Situar los explantes en un recipiente limpio, con papel absorbente, rociar la solución de ácido ascórbico 1% y almacenar (preferiblemente en oscuridad para evitar reacciones fenólicas en presencia de luz (Azofeifa, 2009)). Cabe mencionar que los explantes tienen una vida útil de tres días después del

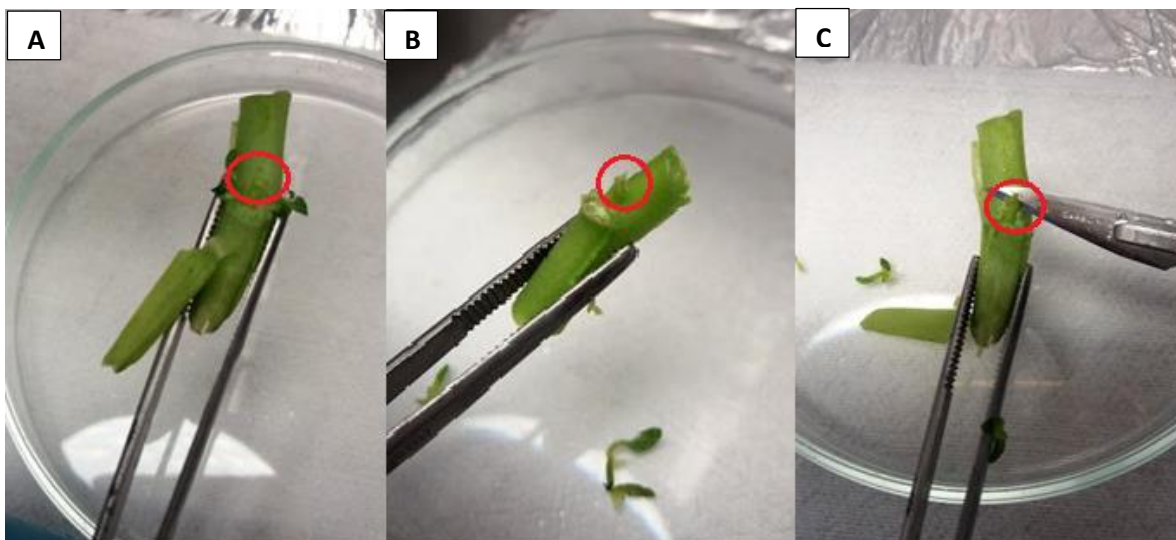
proceso de corte y desinfección, y que el tratamiento de los mismos una vez desinfectados debe ser lo más aséptico posible, para evitar la exposición a contaminantes del ambiente. En este caso se utilizó papel absorbente para cubrirlos y un recipiente con tapa para transportarlos, ya que el almacenamiento se llevó a cabo en la cámara de crecimiento ubicada en el laboratorio de Biología Molecular de la UDFJC, fuera del área de trabajo de Biotecnología Vegetal.

Es importante resaltar que no sólo deben desinfectarse los explantes, la esterilidad del área de trabajo es fundamental para evitar procesos de re-contaminación, por ello durante el desarrollo de este trabajo se realizaron limpiezas a las áreas de trabajo (Laboratorio de Biotecnología Vegetal de UDFJC) con NaClO al 3%, y posteriormente con Etanol al 96%, siempre antes de trabajar los explantes traídos de campo, así como también antes de realizar las jornadas de siembra (cuando los explantes ya estaban desinfectados). Dicha desinfección se realizó en todas las superficies del laboratorio (mesones, ventanas, cámaras de flujo laminar, puertas, paredes, techo y suelo). Además, antes de iniciar el proceso de extracción del meristemo, y siembra de este en el medio, se realizó un lavado previo del instrumental del laboratorio (pinzas y mangos de bisturí) con una solución jabonosa, la cual luego fue retirada con agua, posteriormente se dejaron en una solución desinfectante durante 16 horas, y finalmente se empacaron en papel y se llevaron al horno, junto con los implementos de bioseguridad (bata, guantes, gorro, y tapabocas), a 70°C, durante 1 hora. Finalmente, fueron sometidos a 5 minutos de irradiación con rayos ultravioleta, dentro de la cámara de flujo laminar, para garantizar la completa esterilidad de los mismos.

Una vez el área de trabajo está estéril, es segura para desarrollar la técnica *in vitro*, la tercera etapa: La siembra del material en los medios de cultivo. En este caso, el período de siembra se ejecutó desde el 11 de abril hasta el 19 del mismo mes. Tal como se mencionó en la metodología, se llevaron a cabo 3 repeticiones para cada tratamiento, sembrando 30 unidades experimentales (en adelante UE)

por cada ensayo, las cuales contenían 5 meristemos, obteniendo una población inicial de 1800 meristemos sembrados.

La extracción del meristemo se realizó con ayuda de una lupa, se diseñó una estructura que la sostuvo dentro de la cámara, también se ubicaron dos mecheros de alcohol que ayudaban a conservar la esterilidad del ambiente. Al explante seleccionado le fue retirada la sección de peciolo que protegía la yema, dejándola expuesta. En la mayoría de los casos los meristemos estaban rodeados de primordios foliares, los cuales eran retirados con ayuda del bisturí. Una vez el meristemo estaba despejado, este era sacado utilizando un segundo bisturí, es decir, durante la extracción se trabajó con 2 bisturíes, para evitar la contaminación del meristemo, pues como lo menciona (Espinoza, *et. al.* 1989) generalmente los elementos patógenos viajan a través del sistema vascular desarrollado de la planta, por lo que sacar el meristemo con el mismo instrumento que ha estado en contacto directo con el sistema vascular de esta, pone en riesgo la sanidad del mismo. De hecho, el cultivo de meristemos es ampliamente aceptado ya que son tejidos que, por su ubicación en las plantas y estado de desarrollo, se encuentran libres de éstos patógenos, al no entrar en contacto con los haces vasculares de la planta en sus fases iniciales (ver figura 4).



Propiedad de las autoras. Abril 17/2018

FIGURA 4: Ubicación del meristemo en los explantes, **A:** Despejado del peciolo; **B:** Despejado de peciolo y primordios foliares. **C:** Extracción con el Bisturí.

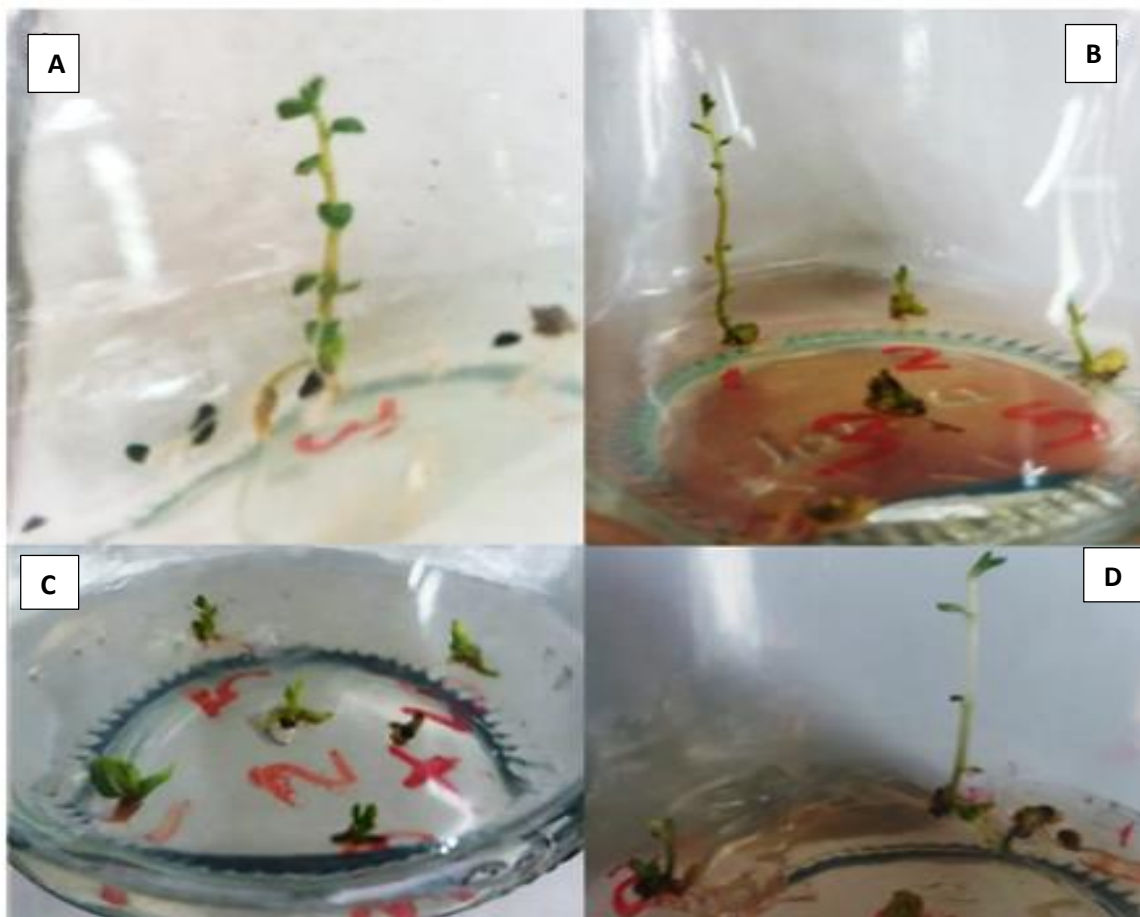
Las UE fueron almacenadas en la cámara de crecimiento como se mencionó en la metodología, a 20°C, 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

3.2.2 OBSERVACIONES A LAS 8 SEMANAS DE CULTIVO:

Al cabo de las 8 semanas se realizó el registro, tomando como variables dependientes el número de hojas, la longitud del tallo, el número de nudos, la presencia o ausencia de raíz, si existía o no contaminación, y como característica cualitativa el color de la plántula en el momento de la observación. Esta última característica fue tomada en cuenta, dado que como lo mencionan (Afanador Pérez, 2005); (Pedroza Manrique, 2008) el color de la plántula permite dilucidar procesos metabólicos como vitificación u oxidación (ver figuras 5, 6, y 7).

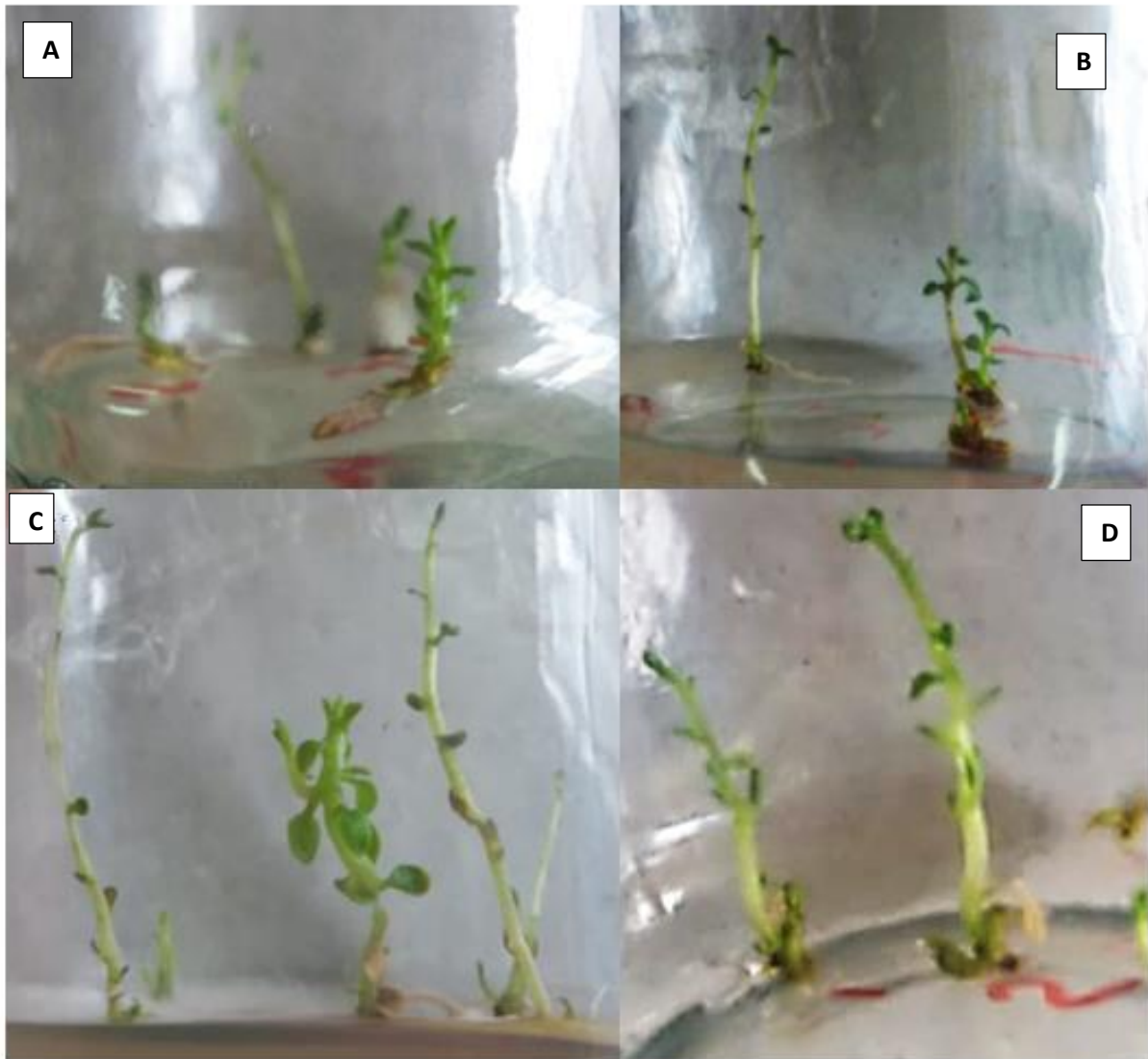
Durante las 8 semanas de crecimiento se descartaron varias de las UE, la gran mayoría por presentar contaminación por bacterias y hongos, especialmente en el ensayo 1, el cual presentaba problemas de contaminación bacteriana como consecuencia de realizar la siembra teniendo una infección gripal, por ello (Pedroza Manrique, 2008) señala la importancia y responsabilidad del operador que ejecuta la técnica del cultivo *in vitro*, para evitar que se presenten exposiciones de los explantes a fuentes de contaminación, ya sea por enfermedad o por malas prácticas a la hora de llevar el explante al medio –durante la siembra-. Otras de las UE fueron descartadas por presentar necrosis en los tejidos, un proceso fisiológico que, como lo mencionan (Afanador Pérez, 2005) (Hernández & Gonzáles, 2010) es generado por el metabolismo de los fenoles propio de las plantas, gracias a la acción de enzimas de tipo polifenol-oxidasas y tirosinasas, que son liberadas o sintetizadas cuando la planta sufre algún tipo de herida. Dichas enzimas actúan oxidando los poli-fenoles y la tirosina a quinonas, las cuales son fitotóxicas, estas sustancias que a su vez pueden polimerizarse, afectan las proteínas, y, en consecuencia, inhiben el crecimiento y viabilidad de los explantes. (Hernández & Gonzáles, 2010) Estos procesos también son activados cuando las plantas son sometidas a estrés, por lo que durante el cultivo *in vitro* es importante controlar todos los factores que pueden afectar al explante, procurando

mantener inactivos estos procesos. La luz por ejemplo, ayuda a activar el metabolismo de los fenoles en las plantas, por lo que se recomienda que en las primeras etapas de cultivo se mantengan las UE en oscuridad (Hernández & Gonzáles, 2010), sin embargo en este trabajo las UE fueron expuestas a las 16 horas de luz desde el momento de la siembra, lo cual aceleró los procesos de oxidación y desencadenó la necrosis de varios de los explantes sembrados. No obstante, este proceso no se dio en todos los explantes lo que demuestra que el cultivo *in vitro* también está sujeto a la capacidad de cada meristemo de adaptarse a las nuevas condiciones, y desarrollarse (Pedroza Manrique, 2008) (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2010).



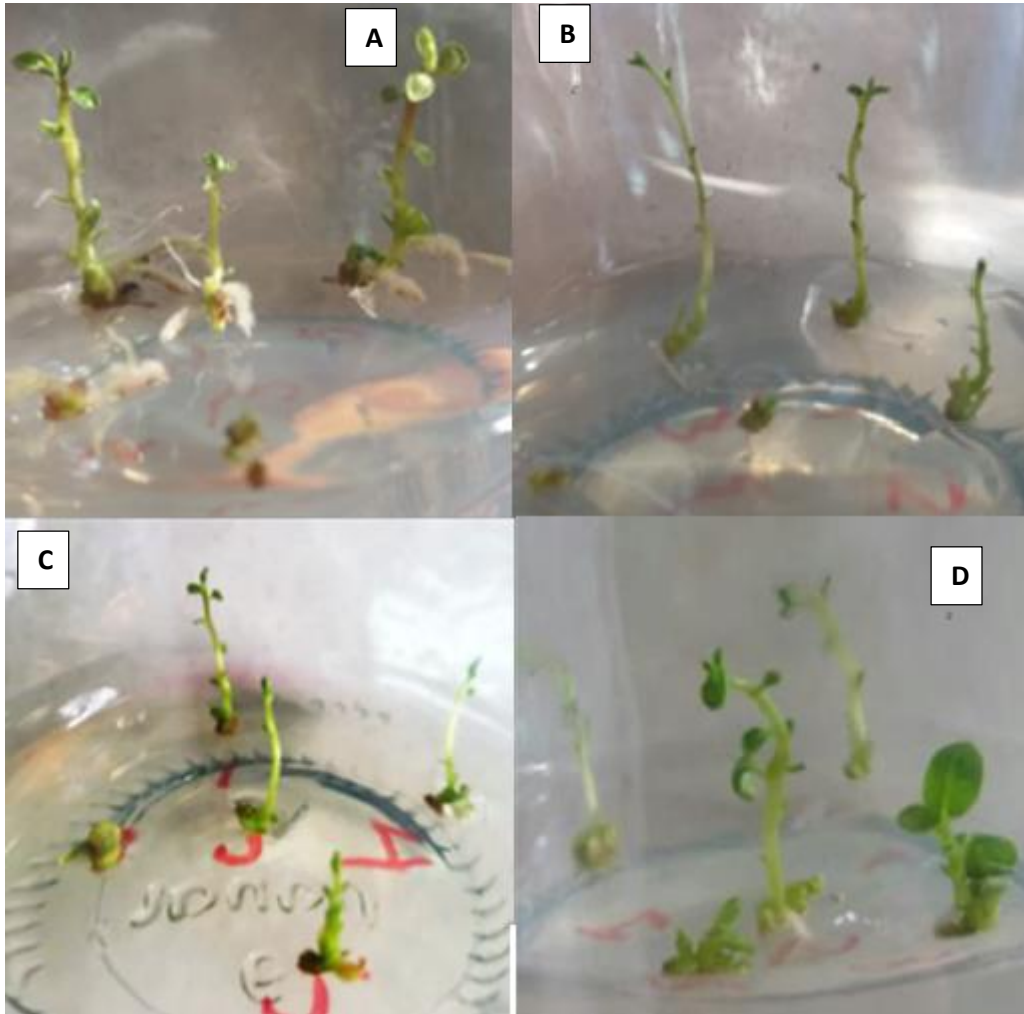
Propiedad de las autoras. Junio 08/2018

FIGURA 5: Fotografías a las 8 semanas de cultivo (08 junio) correspondientes al Ensayo 1 para los 4 tratamientos. **A:** Tratamiento 1; **B:** Tratamiento 2; **C:** Tratamiento 3; **D:** Tratamiento Control.



Propiedad de las autoras. Junio 15/2018

FIGURA 6: Fotografías a las 8 semanas de cultivo (15 junio) correspondientes al ensayo 2 para los 4 tratamientos. **A:** Tratamiento 1; **B:** Tratamiento 2; **C:** Tratamiento 3; **D:** Tratamiento Control.



Propiedad de las autoras. Junio 15/2018

FIGURA 7: Fotografías a las 8 semanas de cultivo (15 junio) correspondientes al Ensayo 3 para los 4 tratamientos. **A:** Tratamiento 1; **B:** Tratamiento 2; **C:** Tratamiento 3; **D:** control.

Otro de los fenómenos fisiológicos observados en las plántulas obtenidas fue la vitrificación (ver figura 7B), también llamada hiper-hidratación descrita por (Afanador Pérez, 2005) citando a (Ziv, 1991); (Saher, *et. al.*, 2004); (Kevers, *et. al.*, 2004) como un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos *in vitro*, afectando principalmente las hojas, este, influye de forma negativa en procesos fisiológicos vitales (la fotosíntesis y el intercambio gaseoso) e impacta en menor medida a los tallos y las raíces, que se ven afectados porque presentan anomalías anatómicas que frecuentemente impiden el establecimiento de las plantas en cultivo *in vitro*. (Kevers, *et. al.*, 2004)

Según (Saher, *et. al.*, 2004) y (Ziv, 1991) las primeras manifestaciones de este fenómeno se observan en las primeras semanas, y van aumentando con el tiempo. Inicialmente el explante presenta una o dos hojas, las cuales están en contacto con el medio. El crecimiento de los brotes es rápido y puede mostrar tamaños anormales en formación de brotes axilares, las hojas presentan una apariencia frágil y translúcida, y su longitud es menor comparada con las hojas normales. Tanto la cutícula como la epidermis de las hojas se vuelven más delgadas, como consecuencia de los cambios estructurales y anomalías químicas de las plantas, las hojas presentan pocos cloroplastos mal desarrollados, y con bajas concentraciones de clorofila y proteínas. Todas estas irregularidades impiden la aclimatación y trasplante de las plantas, causando tasas de supervivencia bajas o nulas. (Kevers, Franck, Strasser, Dommès, & Gaspar, 2004) De tal manera, por los síntomas anteriormente mencionados, algunas de las UE fueron descartadas, dado que el proceso continuó hasta causar la muerte de los explantes.

La hiper-hidratación es causada por el exceso de humedad dentro de las UE, ya que además del agua aportada por el medio, también se presenta la acumulación de gases como el etileno, el etanol, gas carbónico, y acetaldehído, los cuales inhiben la morfogénesis si no se da intercambio gaseoso. (Pedroza Manrique, 2008) Sin embargo, en el manejo que se le dio a las UE no se contempló el intercambio gaseoso, ya que como material aislante se utilizó papel vinipel, siguiendo las recomendaciones del trabajo realizado por la (Universidad de Nuevo León, 2017), quienes después de llevar a cabo varios ensayos de cultivo *in vitro* con diferentes variedades de papa, determinaron que este material es el mejor para cubrir las UE, ya que permite la entrada de luz a todos los explantes sembrados, lo cual es muy importante, pues la papa es una planta muy sensible al fotoperiodo, por lo que exponerlas a 16-8 luz mejora su crecimiento y desarrollo, lo que puede fomentar y/o incrementar la aparición de tubérculos durante el cultivo.

Por otro lado, (Pavón Villegas, 1993) y (Hernández & Gonzáles, 2010) recomiendan el subcultivo de los explantes como una estrategia importante para

oxigenarlos, evitando el contacto de los mismos con las sustancias fenolicas que se acumulan en el medio, además, estos pases se pueden llevar a cabo teniendo en cuenta que al usar papel de filtro como tapa de las UE, se favorece el intercambio gaseoso entre el interior de la UE y el exterior, disminuyendo la acumulación de sustancias toxicas en el medio. (Pavón Villegas, 1993)

Finalmente, otro factor desencadenante de la oxidación en los medios de cultivo después de las 3 semanas, fue el uso de antibióticos. Aquí cabe mencionar que para reducir los niveles de contaminación se utilizó amoxicilina, lo cual pudo influir en la activación y aceleración de las reacciones fenolicas dentro de los medios, provocando la oxidación temprana de los mismos, esto es explicado por (Hernández & Gonzáles, 2010) cuando se refiere a que los antibioticos son fuentes exógenas activadoras de las especies reactivas de oxígeno en los organismos, produciendo sustancias como el superóxido (O_2^-), moleculas poco reactivas que solo reaccionan con fenoles y concentraciones importantes de quinonas. Estas reacciones incrementan la concentración de dichas sustancias en los medios, generando necrosis rápida en el tejido. Es por ello que la aplicación de antibioticos en cultivo *in vitro* es limitada, puesto que afecta las condiciones óptimas para el crecimiento de los explantes. (Read & Economou, 1987)

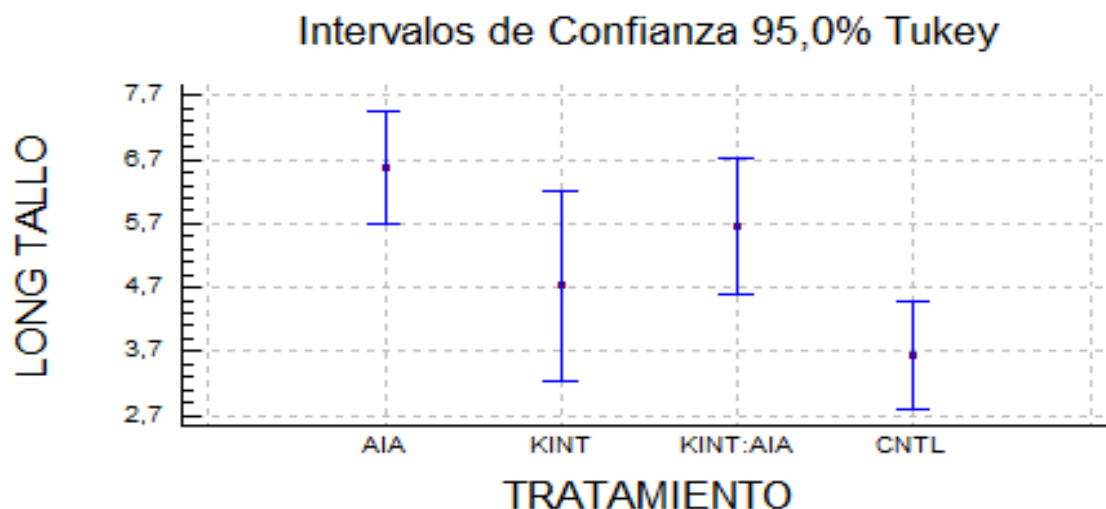
3.2.3 COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS EVALUADOS:

Debido a los factores arriba mencionados, para la elaboración del análisis estadístico se tomó el registro de 113 UE, las cuales contenian información equivalente a 564 meristemos. Es decir que las UE restantes fueron despreciadas porque al estar contaminadas, presentaban un crecimiento mucho menor.

3.2.3.1 VARIABLE LONGITUD DE TALLO:

Transcurridas ocho semanas luego de la siembra, se observaron diferencias significativas para la variable longitud entre plántulas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de meristemos en los diferentes tratamientos con respecto al control, dicha observación fue corroborada con los resultados obtenidos a través del análisis de

la varianza (ANOVA multifactorial) ($p < 0.01$, prueba de comparación de medias de Tukey) (Ver anexo 1).



GRÁFICA 1. Rango de distribución de los datos de longitud con respecto a los tratamientos, es posible afirmar que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

El tratamiento uno presentó la mayor media poblacional con un valor de 6,6 (rango de dispersión de los datos de 5,7 a 7,5) (Ver gráfica 1) adicional a ello, el diagrama de dispersión (Ver gráfica 1) en el tratamiento 1 permite ver una mayor agrupación entre los datos obtenidos (menor cantidad de datos atípicos). Weaver (1996) citado por Llanco (2013), señala que una concentración baja de auxinas estimula la prolongación de las células, sin embargo, una concentración extremadamente alta puede provocar inhibiciones, al respecto, (López, 1990) resalta que las concentraciones de las auxinas a usar varían de especie a especie, pero generalmente se emplean de 0.1 a 10mg/l. Así pues, es posible afirmar que la concentración de AIA usada en este tratamiento fue baja (0.35mg/l).

Es importante resaltar que el 52,2% de las plántulas sometidas a este tratamiento presentaron raíces lo que explicaría la obtención de plántulas robustas y con mejor porte entre todos los tratamientos (Ver figuras 5A, 6A y 7A) , pues como señalan (Bermúdez, Valadez, Tulio, Manzo , & Guzmán, 2013) el enraizamiento de

plántulas *in vitro* es una de las etapas más importantes en el proceso de micro propagación, pues de ésta depende la captación de nutrientes y agua por parte de la planta para la posterior organogénesis. Como se ha mencionado, las auxinas participan en diferentes procesos del desarrollo vegetal: alargamiento o elongación celular formación de raíces adventicias, tropismos, entre otros (Azcon- Bieto & Talón, 2000 citados por (Afanador Pérez, 2005)) siendo la presencia de raíz un factor fundamental en el proceso de tuberización *in vitro* de papa, resalta (Llanco, 2013) que la ausencia de raíces no favorece el proceso de tuberización que resulta fundamental en trabajos de micro propagación de papa.

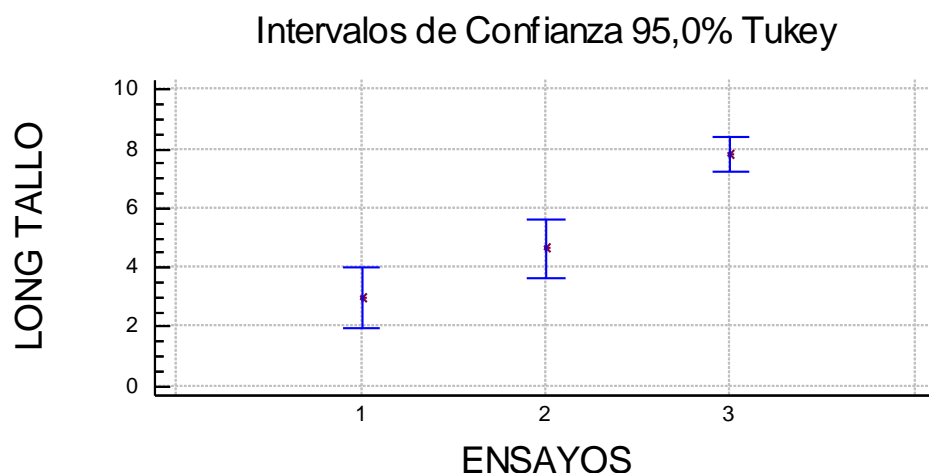
Por su parte, el tratamiento dos presentó la menor media porcentual entre los tratamientos en los que se emplearon fitohormonas (Media porcentual 4,7%), pero presentó el mayor rango de dispersión de datos entre los 4 tratamientos (Ver Gráfica 1) (3,0% a 6,0%) permite evidenciar que se obtuvo un crecimiento longitudinal significativo, respondiendo a la presencia exógena de kinetina, sin embargo, es de resaltar que son datos dispersos en comparación de los obtenidos en el tratamiento uno. Esto es posible explicarlo, gracias a que las citoquininas regulan varios procesos del desarrollo de las plantas, tales como la división celular, el aumento de yemas axilares, la senescencia foliar y la floración, entre otros (Morgan, 2016). Entre los procesos anteriormente mencionados, se destaca la proliferación de brotes, (Huetteman y Preece, 1993; Krikorian, 1995; Ruffoni y Mascarello, 2000 citados por Chamorro, Fernández, Martínez & Mosquera, 2007) afirmación que coincide con las características de las plántulas obtenidas (Ver figuras 5B, 6B y 7B) lo cual se observa en el vigor de las plántulas. Señala (Segura, 2013) que uno de los efectos fisiológicos más importantes de las citoquininas en las plantas es la ruptura de la dominancia apical. En contraste, en el tratamiento control, es posible observar gracias al estadístico Tukey que este presentó la menor media poblacional (3,7) con un intervalo de confianza de 2,7 a 4,5. Resultado que concuerda con la “ruptura de la dominancia apical” mencionada anteriormente en el trabajo desarrollado por (Segura, 2013).

Es importante señalar que de la población total obtenida bajo el tratamiento 3 (KIN- AIA) el 3,3% presentó raíces puesto que, la aplicación exógena de citoquininas promueve el crecimiento de las yemas axilares, mientras que la dominancia apical es anulada o reducida por los inhibidores del transporte de auxina, receptores que se encuentran en mayor proporción en los ápices radiculares. (Segura, 2013) Adicional a ello, es importante resaltar la importancia de las raíces en el desarrollo de plántulas de papa *in vitro* como señalan (Smith y Palmer, 1970 citados por Llanco, 2013) en cuyo trabajo se propone que la kinetina podría regular la formación de tubérculos de papa indispensable en posteriores trabajos de micro propagación. Un caso típico es la interacción de las citoquininas con las auxinas para regular la formación de órganos *in vitro* y controlar la dominancia apical fundamental en la industria de la micro propagación (Azcón & Talón , 2013); al respecto, (Gómez 1999 citado por Llanco 2013) menciona que cuando la cantidad de citoquininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes; razón por la cual las plántulas obtenidas bajo el tratamiento tres (con kinetina y AIA) presentaron una media poblacional con respecto a la longitud menor a la obtenida en el tratamiento 1 y mayor a la obtenida en el tratamiento 2 (Ver gráfica 1) con un rango de dispersión de datos de 4,6% a 6,7%.

3.2.3.2 VARIABLES LONGITUD Y TRATAMIENTO RESPECTO A LOS ENSAYOS 1, 2 y 3.

En cuanto a cada uno de los ensayos, se obtuvo la mayor media poblacional en el ensayo 3 de todos los tratamientos (ver Gráfica 2) ($p < 0.01$) (Ver anexo 2B. Tabla ANOVA). Como era de esperarse, puesto que este resultado se ve influenciado por el manejo que se da al explante, durante la ejecución de las técnicas de cultivo *in vitro*. Cabe mencionar que el éxito en el desarrollo de plántulas a partir de meristemas depende en gran medida del modo de extracción de éste, dicho éxito se evidencia en el corto rango de dispersión de la media obtenida en el ensayo 3. Esto tiene relación con el manejo del explante, y los procesos oxidativos que

pueden generarse durante el cultivo, pues además de los factores antes mencionados, la oxidación puede originarse como consecuencia de los cortes que sufren tanto el explante, como el meristemo en el momento de la extracción, así como también debe tenerse en cuenta la calidad del frasco de cultivo (George 1993, Tabiyeh *et al.* 2006, Van Staden *et al.* 2006, Abdelwahd *et al.* 2008 citados por Azofeifa 2009).

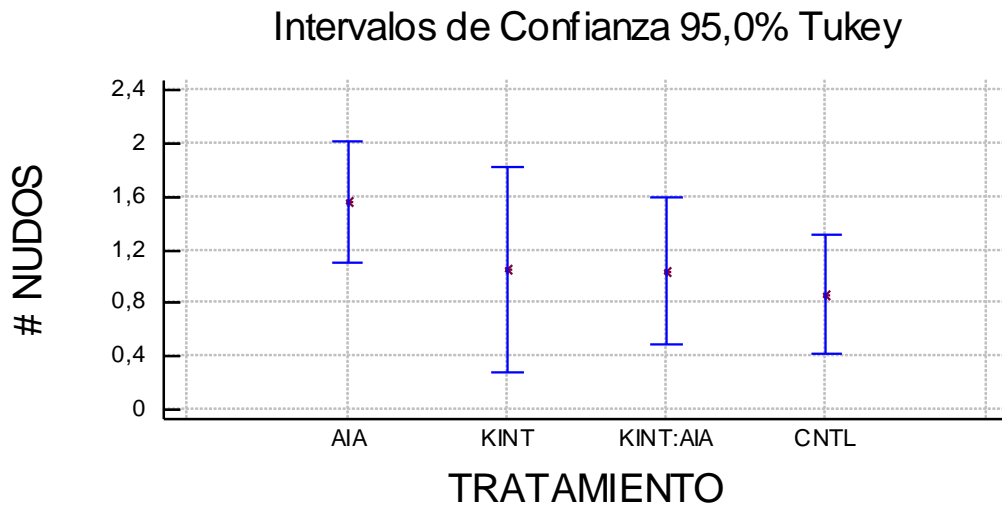


GRÁFICA 2. Rango de distribución de los datos de longitud (mm) con respecto a los tres ensayos realizados.

En relación a lo arriba mencionado, los problemas de oxidación que se presentaron en algunos de los meristemos pueden estar estrechamente relacionados como señalan (Novoa *at al.* 2001, Turrens 2003 citados por Azofeifa 2009), al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células. Los resultados obtenidos muestran claramente un mayor crecimiento a nivel longitudinal por parte de las plantulas en el ensayo tres debido a que la técnica del operador es determinante, y está estrechamente relacionada con el daño que se le puede causar a los tejidos durante la extracción “técnica de la cual dependerán los procesos posteriores de crecimiento y desarrollo de la planta como lo son: división celular, germinación, brotación, enraizamiento, floración y fructificación” (Encina *et al.* 2002 citados por Hernández & Gonzalez 2010). En este orden de ideas, es posible afirmar que la técnica fue mejorando conforme se realizaban las

repeticiones; disminuyendo así el daño causado a los tejidos al momento de la extracción.

3.2.3.3 VARIABLE NÚMERO DE NUDOS:



GRÁFICA 3: El gráfico de medias poblacionales en porcentaje, muestra la media porcentual obtenida junto con los valores máximos y mínimos que puede tomar esta entre los tratamientos.

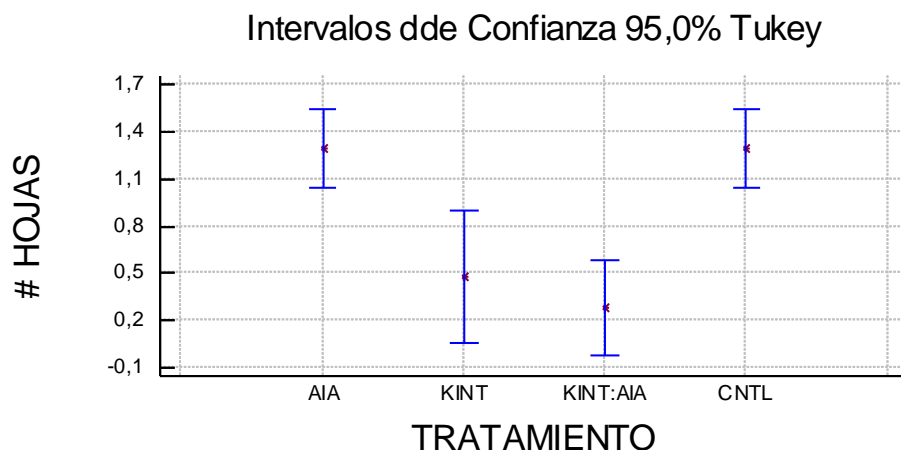
En cuanto a la variable número de nudos, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, esto fue corroborado con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA multifactorial) con un $p < 0.2027$. Este valor p (P-value) debe ser menor de 0.05 para arrojar diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se infiere que para la variable número de nudos ninguno de los tratamientos evaluados generó una influencia directa que favoreciera su desarrollo, tal como se observa en el gráfico 3, mostrando que la gran mayoría de los datos presentaron un número de nudos igual o inferior a 10 . (Ver Gráfica 3)

Respecto a la media poblacional, el tratamiento 1 es el que posee el mayor valor, siendo de 1.6% (con un rango de distribución de datos que oscila entre 1.1% y 2%)(ver Gráfica 3). Esto concuerda con estudios realizados por (Pavón Villegas,

1993), donde menciona que el uso de auxinas entre un rango de 0.1 y 1.0 mg/L actúan sobre la mitosis celular, provocando el alargamiento de la plantula, así como también la aparición de raíces y la dominancia apical, incluyendo regeneración de tejidos, por lo que se puede afirmar que gracias a la capacidad de la auxina de activar esos procesos metabólicos en las plantas, fue posible obtener plantulas completas y robustas en el tratamiento 1, (Ver Figuras 5A, 6A, y 7A) las cuales oscilaron en un rango de 0 a 11 nudos en un tamaño considerable de la población evaluada, lo cual se puede contrastar con la aparición de hojas que fue mayor en este tratamiento, en comparación con los tratamientos 2 y 3 (ver Anexo 2C) con un valor medio porcentual de 1.3% de la población con un número de 0- 11 hojas (ver Gráfica 4). En el caso de esta variable, el valor de p fue igual a 0.000, lo que indica que los tratamientos evaluados si tienen efectos importantes sobre el desarrollo de las hojas. (Ver Anexo 2C)

En el caso del tratamiento dos (ver figuras 5B, 6B, y 7B), este presenta una media porcentual poblacional igual al 1% (con un rango de distribución de 0.3% a 1.8%) para la variable número de nudos. En este tratamiento se presenta un rango mucho más amplio de valores para esta variable (ver Gráfica 3), sin embargo, a pesar de ser más amplio, los valores en los cuales se mueven los datos son menores respecto al Tratamiento 1. Desde el punto de vista de (Chamorro, Martínez, Fernandez, & Mosquera , 2007) se esperaba obtener un número superior de nudos (la población de este tratamiento se ubica en in intervalo de 0 a 8 nudos). En comparación con los demás tratamientos, puesto que las citoquininas son las fitohormonas encargadas de activar la formación de órganos en las plantas, además de favorecer el número de yemas laterales, así como también la germinación de brotes en plántulas cultivadas *in vitro*. No obstante, en algunas ocasiones el uso de fitohormonas en las etapas iniciales del cultivo *in vitro* puede generar respuestas adversas en los explantes, tal como lo menciona (Pavón Villegas, 1993) citando a (Lozoya, 1985) quienes refieren que en las fases tempranas de la micro propagación de la papa, es recomendable evitar el uso de cualquier fitohormona, puesto que pueden alterar las características varietales de las plantas, al favorecer la aparición de mutaciones. Al respecto (Pedroza

Manrique, 2008) señala que el cultivo *in vitro* por sí mismo es una técnica en la cual se llevan a cabo procesos metabólicos desconocidos, puesto que una vez sembrados los explantes en el medio se desencadenan una serie de reacciones en respuesta a las nuevas condiciones, que incluso llegan a tener un origen epigenético, y por esta misma razón son específicas para cada explante, e imposibles de controlar. En este tratamiento también se presentó un número escaso de hojas, con una media porcentual igual a 0,5% (oscilando en un rango de -0,9% a 0,9%) (ver Gráfica 4) contrario a lo que se esperaba, ya que como se mencionó anteriormente, las citoquininas son las hormonas principales en la diferenciación *de novo* de diversos órganos en las plantas. En este sentido (Hoyos, Perea, & Velasco, 2008) mencionan que las citoquininas son sintetizadas en las raíces de las plantas, de ahí son transportadas por el haz vascular a lo largo de toda la planta, favoreciendo el desarrollo de brotes laterales, la multiplicación celular en los meristemas apicales y la expansión de las hojas. Sin embargo, al no presentar raíces en las primeras etapas de establecimiento, la planta no tiene la capacidad de sintetizar dicha hormona, por lo que es necesaria su adición en etapas de multiplicación (lo que no sucede en el tratamiento 1, en el cual la alta presencia de raíces favorece la síntesis de kinetina, y por ende un balance en el crecimiento de las plántulas). No obstante, en el caso particular de este tratamiento, la Kinetina depositada en el medio favoreció procesos oxidativos tanto en el medio de cultivo, como en el explante, al interactuar con el antibiótico incluido, y los altos niveles de nitrógeno que posee el medio Murashige & Skoog; al activar las rutas metabólicas oxidativas del nitrógeno, (Azofeifa, 2009) lo que explica la alta tasa de inviabilidad de la mayoría de los explantes (por oscurecimiento y necrosis), antes de alcanzar las 8 semanas de crecimiento *in vitro*.



GRÁFICA 4: Muestra la media porcentual para la variable número de hojas para cada uno de los tratamientos.

En relación al tratamiento 3, (ver figuras 5C, 6C, y 7C) que incluyó ambas hormonas (kinetina y AIA) en proporción 2:1 respectivamente, se obtuvo un valor medio porcentual de 1% para la variable número de nudos (presentando un intervalo de confianza de 0,4% a 1,6%) (ver Gráfica 3A), la población no sobrepasó los 9 nudos. En este tratamiento se esperaba obtener plántulas con un buen número de hojas, y nudos, más que raíces, pues como lo menciona (Pedroza Manrique, 2008) cuando la relación citoquinina:auxina es mayor a 1 se genera un buen crecimiento de brotes y hojas, y cuando es menor, se genera mayor expresión de raíces. Sin embargo, dichas variables tuvieron mayores niveles de expresión en el tratamiento 1, que en la combinación de ambas hormonas. Es importante resaltar que (Llanco, 2013); (Pedroza Manrique, 2008) y (Pavón Villegas, 1993) señalan la importancia de manejar adecuadamente la concentración de las hormonas y el volumen de éstas que es adicionado al medio de cultivo, puesto que de ello también dependen las respuestas de los explantes, dado que en niveles muy pobres o muy elevados pueden inhibir el crecimiento y desarrollo. En ese sentido los mismos autores destacan que la síntesis de estas sustancias es un proceso metabólico propio de las plantas, lo que genera una acumulación mayor de las fitohormonas en los medios de cultivo. Esto explicaría el bajo nivel de desarrollo en este tratamiento, respecto al tratamiento 1 tanto en

número de nudos, como en número de hojas, pues esta última variable tuvo un valor medio porcentual de 0,3%, (con un intervalo de confianza entre -0,7% y 0.6%), mostrando una dispersión que no superó las 5 hojas, lo cual corrobora que la interacción de las dos hormonas evaluadas en las concentraciones trabajadas (ver Tabla 3) en el tratamiento tres pueden desarrollar un efecto inhibitorio del desarrollo, por acumulación de sustancias endógenas en el medio de cultivo sumado a las cantidades adicionadas al medio de cultivo.

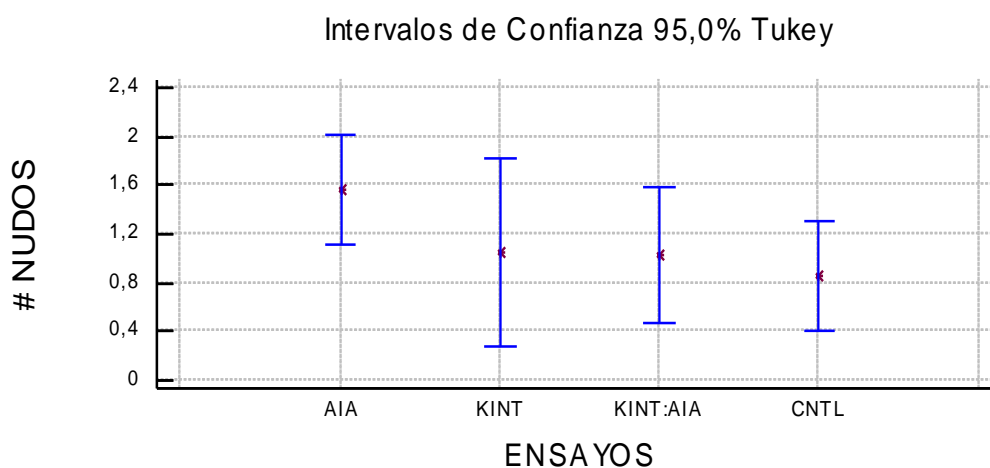
Finalmente, los resultados obtenidos en el tratamiento 4 (ver figuras 5D, 6D y 7D), que corresponde al tratamiento control obtuvieron un valor medio porcentual de 0.7% (en un intervalo de confianza de 0.4% y 1.2%) para la variable número de nudos. Esto contradice lo encontrado por (Arellano, Villavicencio, & García, 2010) donde se menciona que la papa de manera general responde muy bien al cultivo *in vitro* usando el medio MS sin enriquecimiento con hormonas, lo cual resulta ser interesante dado que el mutante trabajado se ha establecido recientemente, obtenido por la irradiación con rayos gamma en una intensidad de 50 Gy (Guzmán Vásquez , 2016). Este comportamiento es explicado por (Pedroza Manrique, 2008) quien manifiesta que existe una influencia marcada del genotipo en el éxito del cultivo de meristemas, puesto que los porcentajes de establecimiento pueden variar entre especies, variedades y clones, Y añade citando a (García & Noa, 1998) que en la excisión de meristemas de papa provenientes de diferentes variedades, con el objetivo de obtener plantulas libres de virus, se estableció que el mayor porcentaje de regeneración lo obtuvo la variedad Desireé (63,5%), en contraste con las demás variedades (que oscilaron entre el 23% y el 36%).

Para concluir, usando el test de rangos múltiples, que permite medir si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 4 en lo que respecta a la variable número de hojas, pero si las hay entre el tratamiento 1 respecto al 2 y 3; de la misma forma que existen diferencias significativas entre el tratamiento 4 y los tratamientos 2 y 3. Este test (ejecutado bajo el modelo de la prueba Tukey HSD) permitió establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas entre

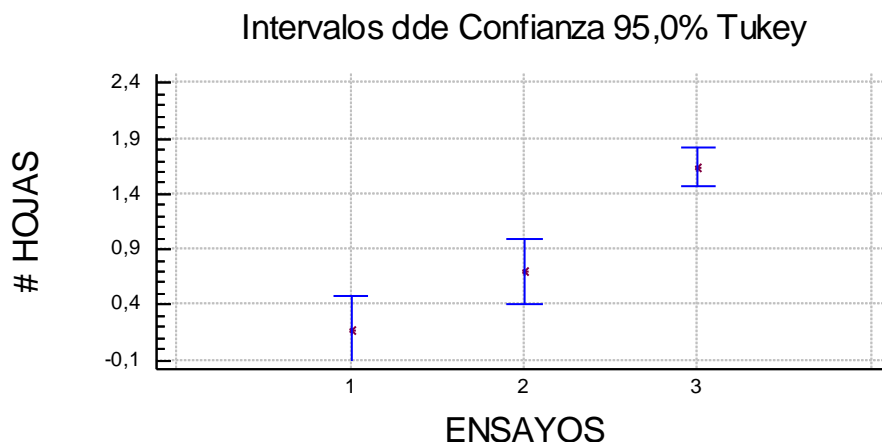
los tratamientos 2 y 3. (ver Anexo 2D), así mismo para las variables número de nudos y longitud de tallo no se reportan diferencias estadísticamente significativas.

3.2.3.4 VARIABLES NÚMERO DE NUDOS Y NÚMERO DE HOJAS RESPECTO A LOS ENSAYOS:

Tal como se mencionó en el análisis para la longitud y las repeticiones, lo que realmente se puede inferir de estos resultados es la mejora en la técnica del cultivo *in vitro*, en comparación con los ensayos 1 y 2, el ensayo 3, tanto para la variable número de nudos, como para número de hojas, mostró la mayor media poblacional, representada con un valor de 2.2% y 1.8% respectivamente. Por otro lado, aunque para el análisis estadístico no se incluyó la totalidad de las UE, si se observó una disminución considerable en la presencia de contaminación en las repeticiones 2 y 3.



GRÁFICA 5: Gráfico de Medias Porcentuales para la variable Número de Nudos, respecto a los tres ensayos realizados.



GRÁFICA 6: Gráfico de Medias Porcentuales para la variable Número de Hojas, respecto a los tres ensayos realizados. .

3. CONCLUSIONES

- El uso de fitohormonas como el AIA y la Kinetina es muy común en la regeneración de plántulas a partir de meristemos. En este caso los tres tratamientos que contenían dichas hormonas mostraron ser beneficiosos para el desarrollo de plántulas en cultivo *in vitro*. Sin embargo, fueron las plántulas del Tratamiento 1 quienes expresaron las mejores características, razón por la cual se concluye que el T1 (enriquecido con AIA 0.35 mg/L) es el medio de cultivo que presenta las mejores características de regeneración de plántulas de papa *S. phureja* – mutante flor blanca.
- El uso de Kinetina para el establecimiento en cultivo *in vitro* de *Solanum phureja* mutante flor blanca resultó no ser favorable para su óptimo desarrollo, evidenciando poco vigor y enanismo en algunas de las plántulas, en comparación con el tratamiento con AIA.
- *Solanum phureja* mutante flor blanca no responde adecuadamente a la aplicación conjunta de Kinetina y AIA en una proporción de 2:1 e cultivo *in vitro*, pues las plántulas obtenidas no presentaron buen porte en términos de coloración, y grosor de la plántula.

4. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una selección rigurosa de los tubérculos-semilla, de los cuales se pretenda obtener plantas donantes, ya que el tubérculo se convierte en la principal fuente de nutrientes de la planta en sus etapas iniciales de desarrollo, a mediano plazo, este factor determina la calidad de las plantas donantes, y, por ende, de los explantes que serán llevados al laboratorio.
- El cuidado de las plantas donantes durante la fase de campo o fase de invernadero debe ser constante, procurando proporcionar las mejores condiciones en términos de asepsia (fumigaciones periódicas *in situ* con fungicida, herbicida, antibiótico e insecticida) evitando así, la aparición de enfermedades ocasionadas por insectos, hongos o bacterias, lo cual pone en riesgo la población de plantas donantes, y a largo plazo, también puede resultar en el fracaso del establecimiento *in vitro*.
- La preparación del medio de cultivo es una fase sustancial para el posterior establecimiento de la variedad en cultivo *in vitro*, de ahí que se recomienda evitar el uso de antibióticos, para reducir al máximo la interacción entre los componentes del medio, las sustancias generadas por los procesos metabólicos de las plantas y los antibióticos, que en ocasiones originan productos químicos que afectan el desarrollo adecuado de los explantes.
- Es por lo anterior que se recomienda llevar a cabo prácticas de cultivo lo más asépticas posibles, además de realizar una técnica de siembra adecuada, lo cual incluye la limpieza de la zona de trabajo, una manipulación rigurosa de los implementos de laboratorio, y del explante dentro de la cámara de flujo laminar, para evitar las re-exposiciones de los explantes a los patógenos ambientales.
- En el futuro, se puede evaluar la respuesta de meristemas de esta variedad de papa a diferentes concentraciones de las hormonas AIA y Kinetina, utilizando distintas proporciones, para establecer de qué manera la interacción entre estas hormonas favorece o inhibe el desarrollo de las plántulas *in vitro*.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aceves, J., & Hernández, J. (1997). *Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales, para beneficio de la comunidad*. Ciencia administrativa. Vol 1: Nueva época.
- Afanador Pérez, A. M. (2005). *Propagación in vitro a partir de Meristemos de 5 variedades de Dyanthus cariophyllus L. (Clavel)* . Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana .
- Alvarado, Y. (2000). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC ciencias biológicas* , Vol 31 .
- Arellano, M., Villavicencio, E., & García, S. (2010). *Producción de plántulas y semilla pre-básica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades*. MMéxico D.F.: INIFAP - CIRNE.
- Azcón, J., & Talón , M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: Mc.Graw-Hill.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de Oxidación y Oscurecimiento en explantes cultivados in vitro . *Agronomía Mesoamericana*, 153-175.
- Bachmann, S. (2012). *Caracterización Bioquímica y molecular de nucleotido difosfato quinasa de Solanum tuberosum (StDNTPKs): análisis de su expresión en la planta de papa en respuesta a estrés*. Argentina: Universidad de Buenos Aires.
- Benítez, A. (2005). *Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas*. España: Reverté S.A.
- Bermúdez, M., Valadez, P., Tulio, M., Manzo , G., & Guzmán, S. (2013). Inducción in vitro de raíces de Carica papaya mediante Agrobacterium rhizogenes y ácido 3-indolbutílico. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1055-1065.
- Buendía, L., Colás, P., & Hernández, F. (2001). Métodos de la investigación en Psicopedagogía. En L. Buendía, P. Colás, & F. Hernández, *Tipos de Variables en un Experimento*. Madrid: McGraw Hill.
- Buitrago, G., López, A., Coronado, A., & Osorno, F. (2004). Determinación de las características físicas y propiedades mecánicas de la papa cultivada en Colombia. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 102-110.

- Cálculos MEGA Sumapaz . (Febrero de 2012). *Ficha de Solanum phureja*.
Obtenido de Ficha de Solanum phureja:
http://www.empresario.com.co/recursos/page_flip/MEGA/mega_papa/files/ficha%20papa%20criolla.pdf
- Calderon, Á., Valbuena, R., Hidalgo, R., & Moreno, J. (2008). Microtuberización in vitro de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica*.
- Castro, I., & Contreras, A. (2011). Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. 72. Valdivia, Chile .
- Chamorro, A., Martínez, S., Fernandez, J., & Mosquera , T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de Limonium var. Misty blue. *agronomía colombiana*, 47-53.
- Codesido, V., Casano , S., & Meyer , S. (2017). Cultivo in vitro low cost: maximizando la productividad . *SECIVTV*, 13-15.
- Corpoica. (2006). Manejo agronómico de la papa criolla para el procesamiento industrial. En L. Zapata, G. E. Navas, A. Tamayo, & C. Díaz, *Manejo agronómico de la papa criolla para el procesamiento industrial*. Rionegro, Antioquia: CORPOICA.
- Dominguez, S., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., & Pérez, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y ciencia de la universidad Autónoma de Aguascalientes*, 53- 62.
- Echeverría, M., Sánchez, J., & Bañón, M. (2013). Auxinas. En J. Azcón, & M. Talón, *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (págs. 377-400). Barcelona: McGraw Hill.
- Espinoza, N., Lizárraga, R., Silva-Rodríguez, D., Buitrón , F., & Bryan, J. (1989). *Cultivo de Tejidos: Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- FAGRO. (2012). *Bioestimuladores de crecimiento*. Obtenido de Bioestimuladores de crecimiento: <http://www.fagro.mx/bioestimuladores-de-crecimiento.html>

- Fuentes, C., Rivera, J., Sánchez, C., Cruz, A., Gutierrez, R., & Valdez, A. (s.f.). Producción in vitro de microtubérculos de papa cv. Alpha. *Universidad Autónoma de Sinaloa*.
- García, L., & Noa, J. (1998). Obtención de plántulas libres de patógenos. En N. C. Pérez Ponce, *Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología*. (págs. 135-149). Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de Plantas.
- García, L., Sarría, Z., Pichardo, T., & Pérez, B. (2001). Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas in vitro. *Biotecnología vegetal*, 117-119.
- Grupo de Investigación en papa. (14 de 07 de 2016). *Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Agronomía*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Agronomía : <http://www.papaunc.com/catalogoExtendido.shtml?x=26>
- Guevara, E., & Jiménez, V. (2006). Capítulo II: Regulación Hormonal del desarrollo de las plantas. En Herrera Jorge, R. Alizaga, E. Guevara, & V. Jiménez, *Germinación y Crecimiento de la Planta* (págs. 55-56). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Guzmán Vásquez, J. D. (2016). *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE UN CULTIVO DE PAPA CRIOLLA (Solanum tuberosum Grupo Phureja, variedad criolla Colombia) IRRADIADA CON COBALTO 60 UBICADO EN EL MUNICIPIO EL ROSAL, FINCA EL PINO KM 16 VÍA SUBACHOQUE CUNDINAMARCA*. BOGOTÁ: Grupo de Investigación en Biología Molecular UDFJC.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*.
- Hoyos, J. L., Perea, C., & Velasco, R. (2008). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la Micropropagación del Plátano Dominicano Hartón (Musa AAB Simmonds). *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 99 - 104 <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v6n2/v6n2a13.pdf>.

- Huaraca, H., Montesdeoca, F., & Pumisacho, M. (2009). *Guía para facilitar el aprendizaje sobre el manejo del tubérculo semilla de papa*. Quito, Ecuador: INIAP y SENACIT.
- Hurtado, M., & Merino, M. (1991). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Trillas.
- Igarza, J., Agramonte, D., Alvarado, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa . *Bioteconología Vegetal*, 4-22.
- Kevers, C., Franck, T., Strasser, R., Dommès, J., & Gaspar, T. (2004). Hiperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress induce change of physiological state. *Plan Cell, Tissue, and Organ Culture*, 181-191.
- Llanco , M. (2013). Efecto de la concentración de sacarosa y el regulador de crecimiento BAP en la multiplicación y tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* ssp andigena). La Paz, Bolivia: Universidad mayor de San Andrés- Facultad de agronomía.
- Llanco, M. (2013). Efecto de la concentración de sacarosa y el regulador de crecimiento BAP en la multiplicación y tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* ssp andigena). La paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés - Facultad de Agronomía.
- López, P. (1990). *Medios de cultivo: Fundamento Teórico- Práctico de Tejidos Vegetales. Estudio de la F.A.O. (Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación)*. Roma, Italia: Rosell y Villalobos.
- Lozoya, H. (1985). Cultivo in vitro de ápices para la obtención de plántulas libres de patógenos . En H. Lozoya, *Fundamentos Teorico-Prácticos del Cultivo de Teidos Vegetales* (pág. 160). Champingo, México: Ed. Villalobos Victor Colegio de Posgraduados.
- Margara , J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. *Mundi- Prensa*.
- Microbiología general - Bioquímica. (2005). *Medios de cultivo*. 1ª explicacion de trabajos practicos.
- Morgan, W. M. (2016). *Cultivo de Tejido Vegetal*. Obtenido de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2016). Biotecnología y mejoramiento vegetal. ArgenBio.

- Mroginski, L., Sansberro, P., & Faschland, E. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Obtenido de Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales: https://es.wikipedia.org/wiki/Cultivo_de_tejidos_vegetales
- Naranjo, H. (1978). Labores de Siembra, cultivo y cosecha en campos de producción de semilla de papa. *En: Memorias del I Curso internacional sobre producción se semilla de papa.*, (págs. 27-33). Quito, Ecuador.
- Naranjo, H., Mastrocola, N., & Pumisacho, M. (2002). Poscosecha. En M. Pumisacho, & S. Sherwood, *El Cultivo de la papa en Ecuador* (págs. 171-187). Quito, Ecuador: INIAP - CIP.
- Osuna, P., & Saucedo, C. (2011). *Propagación in vitro de Vid de la variedad Globo rojo*. Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez .
- Oyarzún, P., Chamorro, F., Córdoba, J., Merino, F., Valverde, F., & Velázquez, J. (2002). Manejo Agronómico. . En P. Oyarzún, F. Chamorro, J. Córdoba, F. Merino, F. Valverde, & J. Velázquez, *In Cultivo de la papa*. Quito, Ecuador: INAP - CIP.
- Oyarzún, P., Chamorro, F., Córdoba, J., Merino, F., Valverde, F., & Velázquez, J. (2002). *Manejo Agronómico. In Cultivo de la papa* . Quito, Ecuador: INAP - CIP.
- Pavón Villegas, M. (1993). *Comportamiento in vitro de tres variedades de papa (Solanum tuberosum L.) en tres variantes del medio básico Murashige y Skoog (1962) y tres subcultivos*. Managua-Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Pedroza Manrique, J. (2008). *Aplicaciones del Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales* . Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Peña, L. A. (1990). *Fisiología y Manejo de Tubérculos Semilla de la Papa*. CORPOICA.
- Pérez de Bianchi, S., Martín Montiel, D., & Quiroga, M. (2013). *Botánica Agrícola, Biología de las plantas, Botánica General*. Obtenido de Meristemas: file:///C:/Users/Toshiba/Downloads/MERISTEMOS%202013.pdf
- Pumisacho, M., & Velázquez, J. (2009). *Manual de Cultivo de la papa para pequeños productores*. Quito, Ecuador: INIAP - COSUDE.
- Read, P., & Economou, A. (1987). Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Hort*, 111.

- Rigato, S., González, A., & Huarte, M. (2001). Producción de Plántulas de Papa a partir de Técnicas Combinadas de Micropropagación e Hidroponía para la Obtención de Semilla Pre-básica . *Revista Latinoamericana de la Papa*, 110-120.
- Roca, W., & Mroginski. (1991). *cultivo de tejidos en la agricultura CIAT s.e.* Colombia: CIAT.
- Rodríguez, L., Zuluaga , C., & Cotes, J. (2011). Sobrevivencia de Esquejes de Tallos Laterales de Genotipos de Solanum Phureja. *Revista Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Nueva Granada*, 182-191.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., & Olmos, E. (2004). Hiperhydricity in micropropagation carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 152-161.
- Segura, J. (2013). Citoquininas. En J. Azcón, & M. Talón, *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (págs. 421-430). Madrid: Mc.Graw-Hill.
- Solis, R., Olivera, J., & La Rosa, R. (2011). Propagación in vitro de Carica papaya var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Revista Peruana de Biología. Facultad de Ciencias Biologicas UNMSM*, 343-348.
- Superintendencia de Industria y Comercio. (14 de 07 de 2016). *CADENA PRODUCTIVA DE LA PAPA: DIAGNÓSTICO DE LIBRE COMPETENCIA*. Obtenido de <http://www.sic.gov.co/drupal/sites/default/files/files/PAPA.pdf>
- Tamayo y Tamayo, M. (1997). *El Proceso de la Investigación Científica*. México: Limusa Noriega Editores.
- Torres, H. (Julio de 2002). Manual de las enfermedades más importantes de la papa en Perú . Lima , Perú.
- Torres, L., Montesdeoca, F., & Andrade-Piedra, J. (20 de Noviembre de 2013). *Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Obtenido de Manejo del Tubérculo Semilla: <https://cipotato.org/es/sin-categorizar/manejo-del-tuberculo-semilla/>
- Universidad de Caldas. (Noviembre de 1998). *FITOTECNIA*. Obtenido de Principales enfermedades de la papa criolla (Solanum phureja) en colombia: <http://ciagrope.tripod.com/fitote21.html>
- Universidad de Nuevo León. (2017). *Introduccion al Cultivo In vitro de Papa*. Obtenido de http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080124347/1080124347_06.pdf

Valenzuela, L., & Armendáriz, S. (2011). *Uso de antibióticos en medios de cultivo para reducir la presencia de agentes contaminantes en la propagación in vitro de palma datilera (Phoenix dactylifera L.)*. Bermejillo: Universidad Autónoma Chapingo.

Ziv, M. (1991). Vitrification: Morphological y physiological disorders of in vitro plants. *Micropropagation Technology & Application.*, 479.

6. ANEXOS

ANEXO 1: MANUAL DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS DE *S. phureja* Mutante Flor Blanca, A PARTIR DE MERISTEMOS.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha resultado ser de gran importancia no sólo a nivel biotecnológico, puesto que también con el paso del tiempo se ha venido consolidando como una herramienta fundamental en el desarrollo económico y agrícola a nivel mundial. Dichas técnicas han sido desarrolladas con el fin de conservar especies, reducir el espacio y los tiempos de producción, acelerando procesos de germinación y desarrollo de las plantas.

Debido al constante aumento de la población y con ello de la demanda de alimentos, la papa resulta ser el cuarto producto alimenticio más importante a nivel mundial, antecedido por el trigo, el maíz y el arroz. Teniendo en cuenta esto, la especie *Solanum phureja* (papa criolla) resulta ser un producto de alto interés dentro de la industria alimentaria-agrícola, puesto que es un tubérculo con un alto nivel nutricional. Sin embargo, el cultivo de *Solanum phureja* ha resultado ser altamente susceptible a cambios de temperatura, por lo que es difícil cultivarla en algunas zonas tanto en Colombia, como en otros lugares del mundo. Es por ello que el presente manual ha sido elaborado con el fin de facilitar la obtención de plántulas libres de patógenos a través del cultivo *in vitro* de meristemos de papa criolla *Solanum phureja* variedad flor blanca.

Para establecer este mutante *in vitro*, fueron necesarias dos fases importantes de trabajo, la Fase I (Fase de campo o invernadero), dedicada a la obtención en campo de las plantas que serían donantes de los explantes, en este caso, los meristemos, y la Fase II, que se subdivide por los diferentes procesos que se deben ejecutar en el laboratorio (Preparación de Medios de Cultivo, Desinfección de Explantes, y Siembra y Mantenimiento de los explantes en Cultivo *in vitro*).

A continuación, se muestran los protocolos de manejo de *S. phureja* mutante flor blanca establecidos.

METODOLOGÍA

FASE DE CAMPO o FASE DE INVERNADERO:

La fase de campo debe desarrollarse en un invernadero, ya que esto no sólo facilita el control de las condiciones de humedad de las plantas donantes, sino que además permite aislarlas de posibles agentes contaminantes. El primer paso se refiere a la selección de los tubérculos-semilla, los cuales deben tener el mejor aspecto, presentar formas simétricas, no presentar daños mecánicos o signos de lesiones por enfermedades o agentes patógenos. El segundo paso es la preparación de la tierra para la siembra, se recomienda que la proporción de tierra y cascarilla de arroz sea de 3:1 respectivamente, ya que permite el flujo de agua uniforme y evita la compactación de la tierra. La combinación tierra: cascarilla debe llenar las $\frac{3}{4}$ partes de la bolsa de vivero (22X22). Para la aplicación del fertilizante, es importante que se realice un círculo alrededor del área donde se ubicaron los tubérculos, evitando el contacto directo de grandes concentraciones de este con el tubérculo semilla, pues las altas concentraciones de fertilizante pueden producir daños en la papa. El tercer paso se refiere a la siembra, que se realizó en bolsas negras, depositando 2 tubérculos por cada bolsa (procurar que los tubérculos queden en el centro de las bolsas, no muy profundos, pero tampoco muy superficiales). El cuarto paso es el riego, se deben regar las bolsas a capacidad de campo, para verificar se aplica la prueba de puño, que consiste en tomar una pequeña cantidad de tierra con la palma de la mano asegurándose que al apretarla se forme un pequeño “terrón” dejando la palma de la mano ligeramente húmeda. El quinto paso es el establecimiento de la frecuencia del riego, que dependerá de la humedad ambiental. El sexto paso es el manejo del cultivo, se recomienda fumigar con Benlate a la 3° y 6° semana. También se recomienda fumigar cada dos semanas con insecticida (Basudin es uno de los más comunes para el control de insectos chupadores, minadores y masticadores). (Ver Figura 1)

1. FASE DE CAMPO

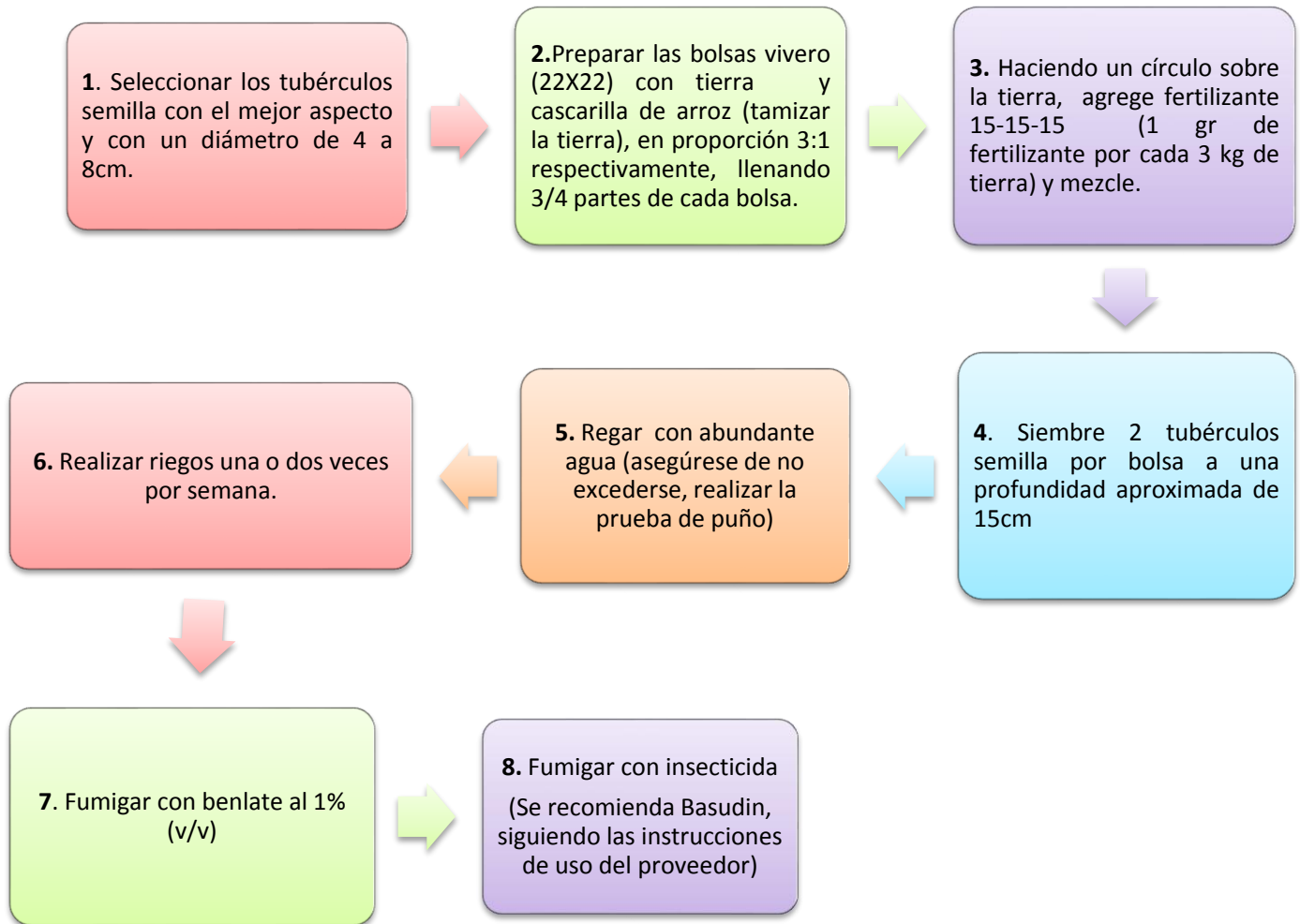


FIGURA 1. FASE DE CAMPO. Muestra el paso a paso del proceso de preparación para obtención de plantas de *S. phureja* mutante flor blanca en campo.

2. OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES

Una vez transcurridos los 55 días necesarios para obtener la edad fisiológica ideal (plantas con metabolismo altamente activo, lo que garantiza la calidad de los meristemos), se colecta el material. Para ello, se deben rociar las plantas con una solución de ácido ascórbico al 1%, pues evita la oxidación temprana de los explantes. Los cortes se hacen dejando 3 cm del tallo principal en la tierra. Para transportar los explantes, estos son envueltos en papel absorbente y almacenados en una bolsa de tela, este proceso evita excesos de agua que aceleran el proceso de oxidación del material vegetal. Al cortar los tallos secundarios el material es mucho más fácil de manipular, se debe dejar una distancia promedio de 1cm entre la yema axilar y el corte del tallo secundario. Teniendo en cuenta que al cortar el tallo principal a nivel de los entrenudos la longitud máxima debe ser de 10cm por explante y contener un máximo de 4 nudos. Aunque se intenta que la longitud de cada segmento oscile entre los 3 y 5 cm, con alrededor de 2 a 3 nudos, para llevar a cabo una manipulación óptima del explante. Es preciso mencionar que los cortes se realizan con tijeras de jardinería, cuyas cuchillas son previamente desinfectadas con Alcohol Antiséptico (Etanol al 70%).



Imagen 1: Plantas antes y después del corte, para posterior traslado.

NOTA: Rociar la solución de ácido ascórbico al 1% ANTES y DESPUÉS de los cortes, posteriormente almacenar.

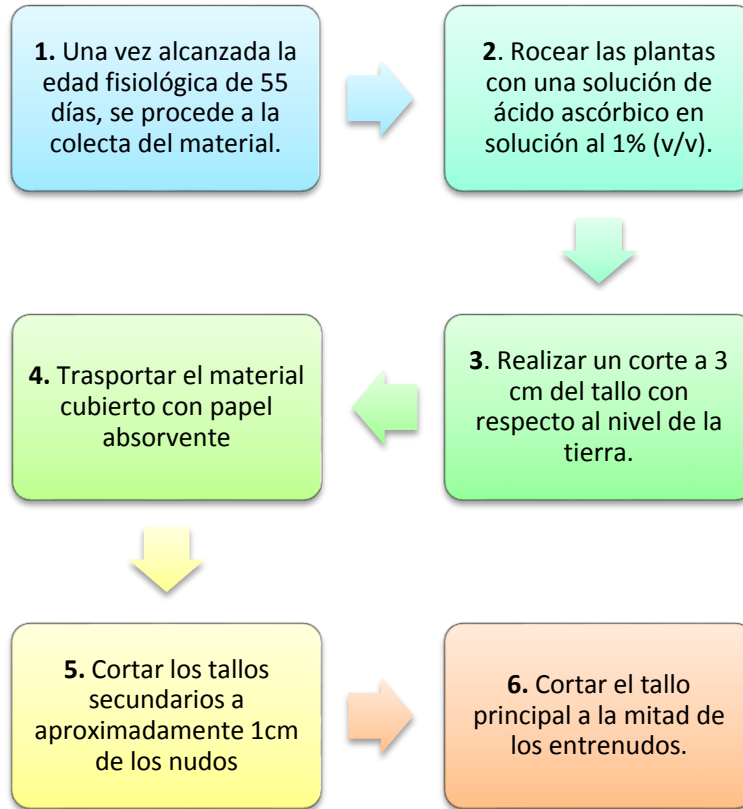


FIGURA 2. OBTENCIÓN DE EXPLANTES. Se muestra el paso a paso para la obtención de los explantes en campo, y su posterior traslado a los laboratorios.

FASE DE LABORATORIO

3. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN:

El protocolo de Desinfección para manejo de Explantes de *Solanum phureja-mutante Flor Blanca* es de vital importancia, ya que en este proceso se eliminan los patógenos superficiales con los cuales la planta tiene contacto en campo. El primer paso consiste en preparar una solución jabonosa utilizando 2-3 gotas de TWEEN al 80%. Dejar actuar durante 5 minutos, agitando constantemente para generar abundante espuma. El segundo paso es descartar la solución jabonosa, teniendo precaución de no dejar caer los explantes fuera del recipiente que los contiene, se recomienda que el recipiente sea amplio para favorecer el contacto de los agentes desinfectantes con todos los explantes. En este caso, dos lavados fueron suficientes para retirar la espuma, es necesario dejar caer el agua destilada

a chorro, y no realizar agitaciones (ya que estas pueden aumentar la espuma existente), para poder retirar los residuos de espuma. Posteriormente se adiciona a los explantes una solución de NaClO al 1% (v/v), la cual debe cubrirlos, manteniéndolos en agitación constante, para que tenga contacto con todos los explantes, este proceso debe realizarse por 2 minutos. Al finalizar el tiempo, se descarta la solución, (es importante llevar un control de los tiempos ya que el NaClO es un agente altamente oxidante). El sexto paso consiste en realizar tres lavados con agua destilada, para retirar los residuos de los agentes químicos utilizados para desinfectar, estos deben realizarse con una agitación constante, luego de ello, llevar los explantes a un recipiente seco y limpio. Por último, el almacenamiento debe hacerse preferiblemente en oscuridad, para evitar la oxidación de estos, además para absorber el exceso de humedad y facilitar el intercambio gaseoso es necesario cubrirlos con papel absorbente (Ver Figura 3).

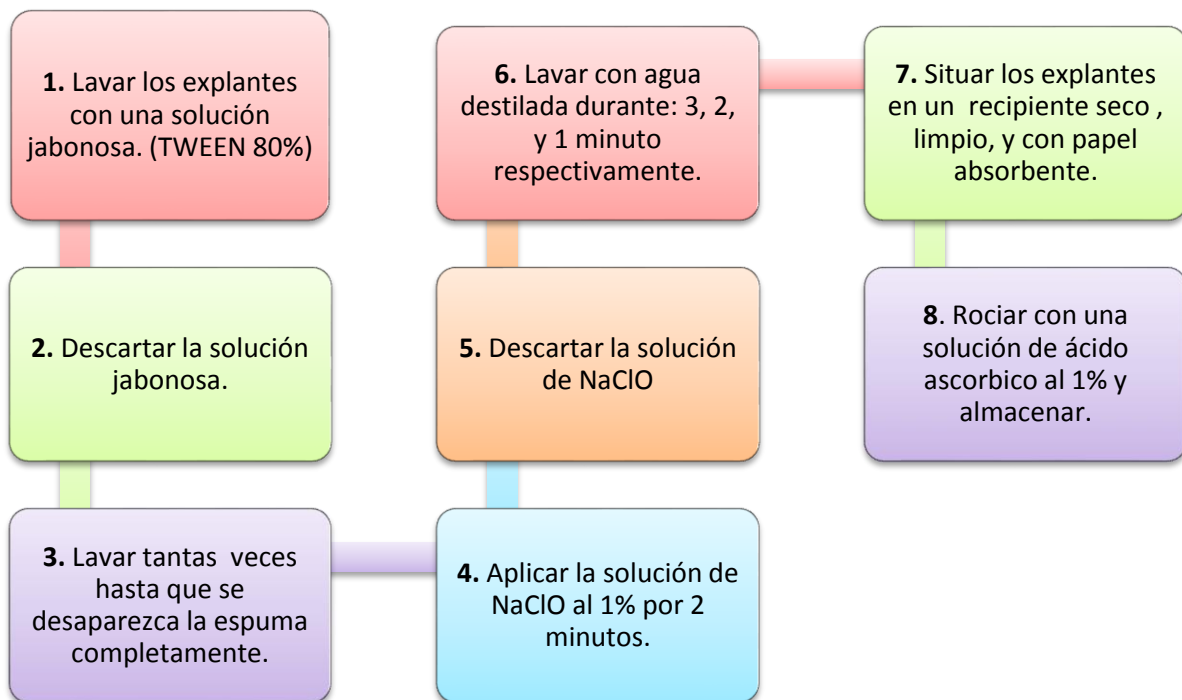


FIGURA 3: FASE DE LABORATORIO: Muestra la primera parte del proceso para el manejo de la planta en el laboratorio. En este caso el protocolo de desinfección aplicado para establecer el cultivo *in vitro* del mutante *S. phureja* flor blanca.

4. PREPARACIÓN DEL MEDIO:

El primer paso en la preparación de los medios de cultivo corresponde a la preparación de las soluciones de micro y macronutrientes indicadas en la tabla de composición para medio MS (soluciones de la A – H) (Ver anexo 3). Una vez preparadas las soluciones se determina el volumen de medio de cultivo que se desea preparar, (en este caso 1000mL). Acto seguido en un Erlenmeyer verter 800 mL de agua destilada. Agregar al Erlenmeyer los volúmenes indicados por solución en anexo 3. Pesar 15 gr de sacarosa y adicionarla al Erlenmeyer. Con una micro pipeta agregar 200 μ l de la hormona AIA (0,35PPM / 2 μ M). Empleando un pH-metro, ajustar el pH de la solución a 5,8 (\pm 0,2) y posterior a ello aforar a 1000mL y llevar a calentamiento. Mientras aumenta la temperatura pesar 3,5gr de Phytigel. Cuando se empiecen a observar burbujas en el fondo del Erlenmeyer adicionar el Phytigel, con ayuda de un agitador, mezclar vigorosamente hasta disolver. Calentar hasta llevar a ebullición. Servir el medio en los frascos de vidrio, aproximadamente hasta una altura de 8mm (alrededor de 60 frascos), alrededor de 8 ml por frasco. Con cuadrados de papel aluminio y con la palma de la mano sellar muy bien los frascos para posteriormente, auto clavarlos a 121°C durante 20 minutos. Almacenar en un refrigerador hasta el momento de la siembra (Ver Figura 4).

NOTA: El uso de los antibióticos en el medio de cultivo está supeditado al juicio del investigador, sin embargo, para esta planta mutante NO se recomienda la aplicación de estos en el medio.

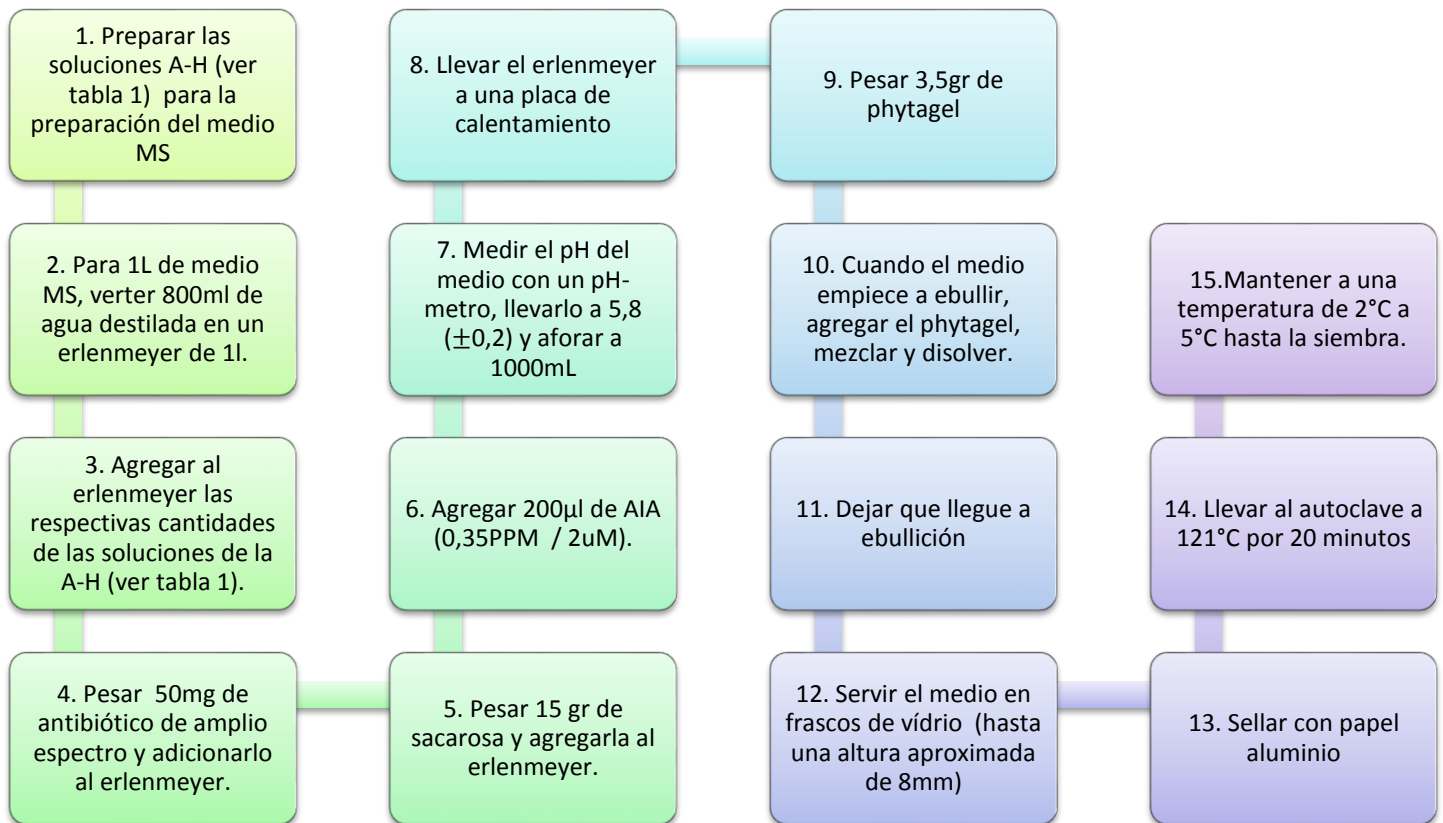


FIGURA 4. PREPARACIÓN DEL MEDIO (para 1000mL). Se evidencia el paso a paso para la elaboración del medio de cultivo MS.

5. SIEMBRA

Toda el área de trabajo debe ser desinfectada utilizando una solución de NaClO al 3% (Cámara de flujo laminar, piso, y demás superficies). Durante la desinfección del área de trabajo, se deben empacar las pinzas, mangos de bisturí, gorro, bata, guantes, y tapabocas en bolsas de papel individuales, las cuales deben estar selladas, para ser llevadas al horno a una temperatura de 70°C durante una hora. Dentro de la cámara de flujo laminar se debe disponer de: estructura diseñada para sostener la lupa el cual facilitará la visualización y posterior extracción de los meristemas, papel absorbente, una caja de Petri dentro de la cual se manipulará el

material vegetal, un frasco grande de vidrio para depositar residuos de papel aluminio y restos de material vegetal, otro frasco de vidrio con alcohol al 96% para esterilizar las cuchillas, dos mecheros (uno a cada lado de la estructura para observación) los cuales ayudarán mantener la esterilidad del ambiente, los frascos con el medio de cultivo, un rollo pequeño de papel vinipel, además de un spray con alcohol al 96% y un marcador para rotular las Unidades Experimentales. Transcurrida una hora de la ubicación de las bolsas de papel en el horno, se deben llevar a la cámara de flujo laminar, para activar y someterlos a rayos UV durante 10 minutos. **OJO LOS EXPLANTES NO SE COLOCAN DENTRO DE LA CAMARA MIENTRAS LOS RAYOS UV ESTÁN ENCENDIDOS**, (Los rayos UV son mutágenos y pueden modificar la genética del explante).

Pasados 10 minutos, encender la cámara de flujo laminar, el operador debe colocarse la indumentaria de Bioseguridad, en primer lugar, es importante desinfectar las manos con un poco de alcohol, inicialmente el operador debe ponerse el tapabocas, luego, proceder a colocarse la bata y por último los guantes (es fundamental que el operador antes de ingresar al cuarto de siembra lave sus manos con una solución jabonosa anti-bacterial). Encender los mecheros de etanol (96%), y rociar un poco de etanol con un aspersor sobre la zona de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar, y con ayuda de una hoja de papel absorbente limpiar la zona en un solo sentido siempre de adentro de la cámara hacia afuera de ésta; esterilizando así la superficie constantemente al igual que las manos, rociando etanol sobre éstas y frotándolas (hacer ese ejercicio constantemente para mantener asepsia, siempre lejos de los mecheros, para evitar accidentes). Para iniciar la siembra, sujetar un explante del recipiente con ayuda de las pinzas, ubicarlo debajo de la lupa, y sobre caja Petri, de tal manera que se localice la yema axilar o apical dependiendo sea el caso, acto seguido, Con uno de los bisturíes (Previamente marcados para diferenciar aquel que estará en contacto con el sistema vascular de la planta y aquel con el cual se realizará la extracción del meristemo) cortar el peciolo, y los primordios foliares que protegen al meristemo, dejándolo así despejado. Con el segundo bisturí realizar la extracción del mismo, ejerciendo una leve presión en la base. Llevar el meristemo al frasco

que contiene el medio de cultivo (OJO: No se debe ejercer mucha presión, porque el meristemo puede quedar sumergido en el medio, y morir rápidamente), levantando levemente el papel aluminio para evitar el contacto con el ambiente, debido a que se siembran 5 meristemos por cada frasco es importante trabajar siempre cerca del mechero. Una vez extraídos y sembrados los cinco meristemos, se procede a cubrir el frasco con papel vinipel, asegurándose que quede bien cubierto, y se rotula con la fecha, la especie sembrada, y el operador a cargo. **NOTA: Todo el ejercicio de siembra debe realizarse evitando movimientos bruscos dentro de la cámara, ya que dichos movimientos traen corrientes de aire con patógenos ambientales. También debe evitarse hablar durante a siembra, para evitar contaminación con patógenos bucales.**

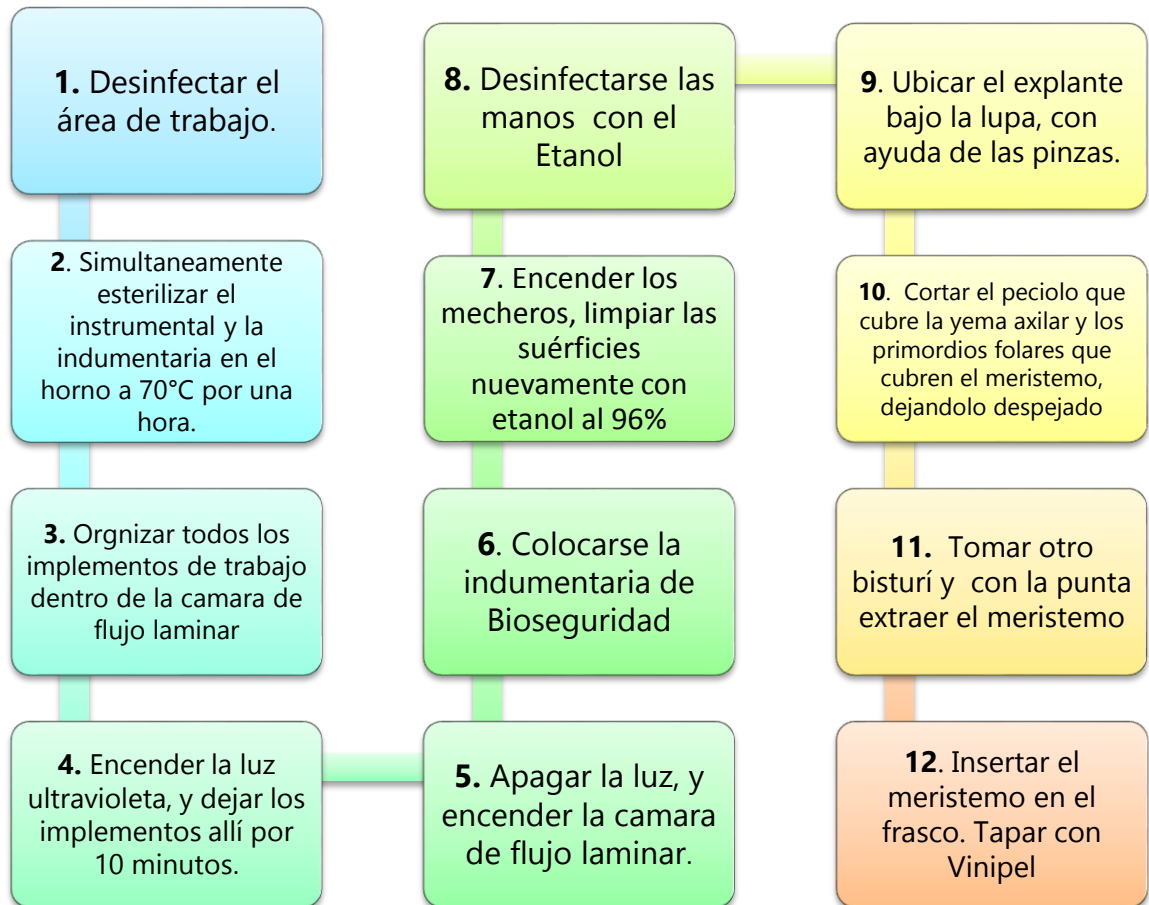


FIGURA 5: PROTOCOLO DE SIEMBRA: Proceso de manejo de la especie durante la siembra para establecimiento *in vitro*.

ANEXO 2: TABLAS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LAS DIFERENTES VARIABLES

A: Tabla ANOVA para la variable Longitud de Tallo:

Analysis of Variance for LONGITUD - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:TRATAMIENTO	780,862	3	260,287	7,03	0,0001
B:REPETICIÓN	2121,96	2	1060,98	28,65	0,0000
RESIDUAL	20661,3	558	37,0275		
TOTAL (CORRECTED)	23940,6	563			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Análisis de varianza para longitud ANOVA multifactorial. Variable dependiente: Longitud. Factores: Tratamiento y Ensayo.

Analysis of Variance for LONGITUD - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:REPETICIÓN	2121,96	2	1060,98	28,65	0,0000
B:TRATAMIENTO	780,862	3	260,287	7,03	0,0001
RESIDUAL	20661,3	558	37,0275		
TOTAL (CORRECTED)	23940,6	563			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Análisis de varianza para longitud ANOVA multifactorial. Variable dependiente: Longitud. Factores: Ensayo y Tratamiento.

B: Tabla del ANOVA para la variable número de nudos:

Analysis of Variance for #NUDOS - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:TRATAMIENTO	46,6631	3	15,5544	1,54	0,2027
B:REPETICION	351,59	2	175,795	17,42	0,0000
RESIDUAL	5629,53	558	10,0888		
TOTAL (CORRECTED)	6050,57	563			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Análisis de varianza para Número de Nudos ANOVA multifactorial. Variable dependiente: Número de Nudos. Factor: Tratamiento.

C: Tabla de ANOVA para la variable número de hojas:

Analysis of Variance for # HOJAS - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:TRATAMIENTO	109,394	3	36,4648	12,00	0,0000
B:REPETICION	194,951	2	97,4756	32,08	0,0000
RESIDUAL	1695,39	558	3,03834		
TOTAL (CORRECTED)	1985,82	563			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Análisis de Varianza para Número de Hojas: Variable Dependiente: Número de Hojas, Factores: Tratamiento y Repetición

D: Tabla TEST RANGOS MULTIPLES para la variable número de hojas:

Multiple Range Tests for #HOJAS by TRATAMIENTO

Method: 95,0 percent Tukey HSD

TRATAMIENTO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	125	0,282172	0,167004	X
2	60	0,474913	0,233503	X
4	199	1,29501	0,13493	X
1	180	1,29729	0,138148	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*0,822375	0,679038
1 - 3	*1,01512	0,525672
1 - 4	0,00227598	0,488442
2 - 3	0,192741	0,724111
2 - 4	*-0,820099	0,71051
3 - 4	*-1,01284	0,531416

* denotes a statistically significant difference.

Test de Rangos Múltiples para la variable Número de Hojas: Comparación entre todos los tratamientos evaluados. Variable: Número de Hojas. Factores: Tratamientos.

ANEXO 3: Tabla de Componentes para Medio MS (1992)

TABLA COMPONENTES MEDIO MS				
SLN STOCK	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN EN SLN STOCK g/L	CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO mg/L	Vol. SLN STOCK en ml/L
A	NH4NO3	82.5	1650.0	20
B	KNO3	95.0	1900.0	20
C	CaCl2. 2H2O	88.0	440.0	5
D	KH2PO4	34.0	170.0	5
E	H3BO3	1.240	6.200	5
	KI	0.166	0.830	
	Na2MoO4 - 2H2O	0.050	0.250	
	CoCl2 - 6H2O	0.005	0.025	
F	MgSO4 - 7H2O	74.00	370.0	5
	MnSO4 - 4H2O	4.460	22.30	
	ZnSO4 - 7 H2O	1.720	8.600	
	CuSO4 - 5H2O	0.0050	0.025	
G	Na2 EDTA	7.47	37.35	5
	FeSO4 - 7H2O	5.57	27.85	
H	Tiamina	0.02	0.1	5
	A. Nicotínico	0.10	0.5	
	Piridoxina	0.10	0.5	
	Glicina	0.40	2.0	

Fuente: Murashige & Skoog (1962)