

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL**

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE TRES VARIEDADES  
DE PAPA (*Solanum tuberosum L.*) EN TRES VARIANTES DEL  
MEDIO BASICO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)  
Y TRES SUBCULTIVOS**

**AUTORA: MARIA ISABEL PAVON VILLEGAS  
ASESOR: ING. MARBELL AGUILAR MARADIAGA**

**Managua, Nicaragua - 1993**

## **DEDICATORIA**

**Dedico el presente trabajo con especial cariño a mi madre Guadalupe Villegas Castro y a mi hermano Edwin Villegas R. que gracias a sus esfuerzos y sacrificios he coronado una de mis más grandes aspiraciones.**

**De igual manera a la familia Delgado-Mayorga y al Dr. Max Mayorga Castillo quienes en todo momento me han brindado su apoyo moral y material.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Deseo expresar mi más alta gratitud a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo y de manera especial a las siguientes:**

- **Ing. Marbel Aguilar M.**
- **Ing. Guillermo Reyes Castro**
- **Ing. Rodolfo Munguía**
- **Ing. José Dolores Cisnes**
- **Y al Programa MOLIVS.**

# INDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
RESUMEN	iv
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Cultivo de meristemos	3
2.1.1 Importancia del cultivo de meristemos	3
2.1.2 Propagación masiva de clones	4
2.1.3 El cultivo de meristemos en la erradicación de virus	4
2.2 Medios de cultivos (Generalidades)	5
2.3 Componentes de un medio de cultivo	6
2.3.1 Sales Minerales	6
2.3.2 Vitaminas	6
2.3.3 Reguladores de crecimiento	7
2.4 Materiales inertes de soporte	10
2.5 Factores físicos	10
2.5.1 Temperatura	10
2.5.2 Luz	11
2.5.3 pH del medio	12
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Localización del experimento	13
3.2 Materiales y equipo	13
3.3 Esterilización de materiales y equipo	13
3.4 Preparación de los medios de cultivo	14
3.5 Siembra del material vegetal	14

3.6	Diseño del Experimento	15
3.7	Tratamientos	16
3.8	Evaluaciones	16
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>17</b>
4.1	Primer Subcultivo	17
4.1.1	Altura de plántula	17
4.1.2	Número de hojas	18
4.1.3	Longitud de entrenudos	18
4.2	Segundo subcultivo	19
4.2.1	Altura de plántula	19
4.2.2	Número de hojas	20
4.2.3	Longitud de entrenudos	21
4.3	Tercer subcultivo	21
4.3.1	Altura de plántula	21
4.3.2	Número de hojas	22
4.3.3	Longitud de entrenudos	23
<b>V.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>24</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>31</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</b>	<b>32</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>38</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>		<b>Página</b>
1	Efecto de tres medios de cultivo sobre la altura, longitud de entrenudos y número de hojas de tres variedades de papa en tres subcultivos.	25
2.	Efecto de tres medios de cultivo sobre el número de hojas de la variedad Desirée en tres subcultivos.	27
3.	Efecto de tres medios de cultivo sobre el número de hojas de la variedad DTO-28 en tres subcultivos.	28
4.	Efecto de tres medios de cultivo sobre el número de hojas de la variedad Baraka en tres subcultivos.	28

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>		<b>Página</b>
1	Constituyentes del medio básico de Murashige y Skoog,(1962).	14
2.	Variantes del medio MS,(1962).	15
3.	Factores en estudio realizados en el experimento durante el periodo comprendido de Enero a Julio de 1991.	16
4.	Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula (cm) de tres variedades de papa en el primer subcultivo.	17
5.	Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios del número de hojas de tres variedades de papa en el primer subcultivo.	18
6.	Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos (cm) de tres variedades de papa en el primer subcultivo.	19

7. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula (cm) de tres variedades de papa en el segundo subcultivo. 20
8. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios del número de hojas de tres variedades de papa en el segundo subcultivo. 20
9. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos (cm) de tres variedades de papa en el segundo subcultivo. 21
10. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula (cm) de tres variedades de papa en el tercer subcultivo. 22
11. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios del número de hojas de tres variedades de papa en el tercer subcultivo. 23
12. Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos (cm) de tres variedades de papa en el tercer subcultivo. 23

## **RESUMEN**

Actualmente el cultivo de tejidos vegetales como una de las técnicas más modernas en la agricultura, permite obtener elevados volúmenes de material vegetal de buena calidad para la siembra en numerosos cultivos, impactando directamente en el incremento de la calidad y rendimiento de las cosechas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de las variedades de papa Desirée, DTO-28 y Baraka en tres medios de cultivo: M1 (Sales MS + 0.5 mg/l \* AIA + 0.2 mg/l Kinetina + 0.2 mg/l Tiamina-HCL); M2 (Sales MS + 0.2 mg/l Tiamina-HCL) y M3 (Sales MS + 0.25 mg/l \*\*GA<sub>3</sub> + 0.2 mg/l Tiamina-HCL) y tres subcultivos continuos. Se evaluaron las variables Altura de plántula, Longitud de entrenudos y Número de hojas.

Las tres variedades manifestaron una dinámica de crecimiento muy variada en los medios de cultivo y en los subcultivos. Desirée registró disminución del número de hojas en la medida que incrementaron los subcultivos. Igual tendencia mostró DTO-28. Por el contrario Baraka superó ligeramente el número de hojas en el subcultivo dos al obtenido en el subcultivo uno, alcanzando los valores más altos en el subcultivo tres.

Desirée y Baraka presentaron un comportamiento aceptable en el medio dos y DTO-28 en el medio tres.

\*AIA = Acido Indol Acético

\*\*AG<sub>3</sub> = Acido Giberélico

## I. INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la familia Solanaceae y al género *Solanum*. Es originaria de América del Sur (Montaldo, 1984; López, *et al.*, 1984) y es parte fundamental de la dieta humana. Provee cantidades significativas de proteínas, carbohidratos, hierro y doce vitaminas esenciales. Está considerada entre los primeros cinco cultivos alimenticios junto con el trigo, arroz, maíz y cebada (Mejía y Vitorelli, 1988). Además es utilizada en la alimentación animal en países templados y fríos (Montaldo, 1984).

En la actualidad la papa se produce en muchos países del mundo. El cultivo puede propagarse sexual y asexualmente, siendo éste último método de mayor preferencia en la producción comercial, ya que asegura la conservación de los caracteres varietales durante generaciones sucesivas, implicando menor costo (Costa y Estrada, 1988).

En Nicaragua se cultiva la papa en los departamentos de Estelí, Madriz, Matagalpa y Jinotega en los cuales la producción está limitada por la falta de tubérculo-semilla de buena calidad y por la incidencia de plagas y enfermedades (Mairena, 1991. Comunicación personal).

El cultivo de tejidos vegetales, es una solución viable para resolver algunos de estos problemas. En los últimos años el desarrollo de la técnica de micropropagación ha tenido gran éxito, y permite obtener grandes volúmenes de plantas libres de plagas y enfermedades, las cuales poseen mayor vigor y homogeneidad genética (Hurtado y Merino, 1987); además, garantiza la producción de material en cualquier época del año, posibilitando así la programación para los períodos en que haya mano de obra disponible (Centro Internacional de la Papa, 1985).

A pesar de numerosas investigaciones sobre micropropagación de la papa, existen pocas publicaciones de trabajos relacionados con el comportamiento de las variedades en diferentes medios nutritivos, considerando factores como el tamaño del meristemo, concentración de reguladores de crecimiento y consistencia del medio (Aguilar y Reyes, 1987).

Dadas las ventajas que el cultivo de tejidos vegetales representa para la agricultura el objetivo de la presente investigación fue estudiar el comportamiento en la micropropagación de las variedades de papa Desirée, DTO-28 y Baraka por el efecto de tres variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos.

## **II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 Cultivo de Meristemos**

Diversos autores explican de manera particular la definición de meristemo, pero en común señalan que el meristemo es un tejido que contiene células en continua división celular no diferenciadas, de carácter embrional y metabolismo intenso con dimensiones no mayores de 0.1 mm de longitud (Lozoya, 1985a, Navarro, 1987; Espinoza *et al.*, 1989).

Amesquita y Mingo-Castel, (1989) citando a otros autores apuntan que los procesos de diferenciación de los meristemos están influenciados por diversos factores como son: Tamaño del meristemo, tipo y composición del medio de cultivo, concentración de los reguladores de crecimiento, localización de la yema en el brote y condiciones ambientales de incubación.

Las plantas adultas poseen varios tipos de meristemos: Primarios, intercelulares y foliares. En los meristemos primarios están los de tallo y de raíz, los que a su vez pueden ser terminales o laterales. Según la especie, los meristemos de tallo son más complejos y variables que los de raíz (Margara, 1988).

#### **2.1.1 Importancia del cultivo de meristemos**

El cultivo de meristemos se usa fundamentalmente en el saneamiento de cultivares infectados con virus y en la propagación vegetativa a gran escala (Margara, 1988). En la papa, los meristemos son ideales en la propagación por las siguientes razones: Genéticamente son más estables que otros tejidos, es menor el nivel de infección viral y pueden erradicarse completamente patógenos de los mismos (Espinoza *et al.*, 1989).

Del resto de tejidos que se cultivan *in vitro* los meristemos apicales son más eficientes para producir plantas, las cuales en un medio adecuado regenerarán a las mismas más

rápidamente y conservarán la identidad genética de sus progenitores por la naturaleza diploide de las células meristemáticas (Navarro, 1987).

### **2.1.2 Propagación masiva de clones**

En caña de azúcar a través del cultivo de meristemas se han obtenido elevadas tasas de multiplicación, Suvaire y Galzy, (1987) plantean que se pueden obtener 10 mil plantas en un año a través de un meristemo. Mendre *et al.*, (1983) reportan que se pueden producir hasta 200 mil plantas en seis meses, mientras que Lee, (1986) afirma que se pueden producir potencialmente hasta 400 mil plantas partiendo de un solo individuo. Sin embargo, el Colectivo de Laboratorio de Biotecnología de la UCLV, (1988) recomiendan obtener de un meristemo como máximo 10 mil plantas de caña de azúcar para evitar posibles variaciones genéticas.

Damasco y Barba, (1983) reportan que se pueden obtener a partir de un meristemo un millón de plantas de banano en 10 meses. Allan, (1979) señala que después de conservar material genético de camote (*Ipomoea batatas* L.) a tasas mínimas de crecimiento, mantuvo al mismo en un medio de multiplicación durante 15 pases sucesivos produciéndose una propagación potencial de más de un millón de plantas en un año con un alto grado de uniformidad genética en la progenie.

### **2.1.3 El cultivo de meristemas en la erradicación de virus**

Morel y Martin (1952) fueron los primeros investigadores en obtener plantas de *Dalia* libre de virus mediante cultivo de meristemas (Villalobos, 1985a; Hurtado y Merino, 1987).

Se sabe que aunque la distribución de los virus en la planta hospedera no es uniforme, son los meristemas los que están exentos de virus o contienen las más bajas concentraciones de éstos. Por esta razón, es que el empleo de meristemas es la vía más eficiente para erradicar virus de plantas enfermas (Mejía y Vitorelli, 1988).

También se eliminan otros patógenos como hongos, bacterias, micoplasmas, etc. pero los virus por su complicado metabolismo y su tamaño en relación al de su hospedero, presentan mayor complejidad para eliminarlos de los tejidos que infectan (Lozoya, 1985a).

Mediante pruebas de detección de virus, en meristemos de varias especies de plantas se han encontrado resultados positivos, tal es el caso del (TMW) en meristemos de tabaco, y tomate, el (PVX) en papa y el virus del mosaico en clavel (Mejía y Vitorelli, 1988).

Esto ha conducido a combinar el cultivo de meristemos con tratamientos de termoterapia y/o quimioterapia obteniéndose mucho éxito (Navarro, 1987). En papa se obtuvieron 40% de plantas sanas con termoterapia, exponiéndose las plantas a temperaturas mayores de 38°C durante 10 días. En clavel, yuca, fresa y crisantemo que soportan mayores temperaturas que la papa se puede obtener hasta un 100% de plantas sanas (Lozoya, 1985a).

## **2.2 Medios de cultivo (generalidades)**

La composición del medio de cultivo y el empleo de tejidos viables entre otros factores, influyen en el éxito del cultivo de tejidos. A los investigadores Sacks (1860) y Knops (1861) se debe la creación del primer medio nutritivo llamado Solución de Knops y aún empleado en la actualidad, ellos observaron que las plantas absorbían nutrientes inorgánicos (Villalobos, 1985a).

A partir del descubrimiento de que se podían obtener plantas de tejidos no diferenciados se comenzó a realizar investigaciones que se relacionaron con las necesidades nutricionales de los cultivos *in vitro* (Margará, 1988).

Actualmente se utilizan un sin número de medios de cultivo que toman el nombre del autor y el año de su creación. Así, por ejemplo, el medio básico de Murashige y Skoog, (1962) es el más ampliamente usado en la mayoría de especies incluida la papa; los cuales

se diferencian por la composición y concentración de las soluciones empleadas y pueden ser sólidos, semisólidos y líquidos (Merino, 1987).

### **2.3 Componentes de un medio de cultivo**

Para un crecimiento vigoroso y saludable, las plantas necesitan grandes cantidades de macronutrientes, pequeñas cantidades de micronutrientes; así como vitaminas, reguladores de crecimiento y carbohidratos (López, 1985; Withers, 1985).

Un medio de cultivo adecuado está compuesto de: Sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos, fuente de carbono, agar y otros suplementos orgánicos, los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración (Mejía y Vitorelli, 1988).

#### **2.3.1 Sales Minerales**

Las sales que las plantas requieren en mayor cantidad son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca) y azufre (S), los cuales se adicionan como iones, cationes o en forma de compuestos para una mejor absorción de los mismos (López, 1985).

En menor cantidad, se agregan los micronutrientes que se usan como sales de iodo (I), hierro (Fe), boro (Bo), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y cobalto (Co). Estos elementos son componentes de la planta y son importantes para su fisiología y metabolismo (Mejía y Vitorelli, 1988).

#### **2.3.2 Vitaminas**

Son requeridas por las plantas en pequeñas cantidades y son importantes como catalizadores en el metabolismo (López, 1985).

La Tiamina es la única vitamina importante para el desarrollo de las células vegetales, su papel está íntimamente ligado con el metabolismo de los carbohidratos y es sintetizada en el extremo de las raíces (Ramos *et al*, 1985; López, 1985; Margara, 1988). También se

pueden agregar otras vitaminas de menos uso que la Tiamina: Acido nicotínico, Pirodoxina-HCL, Mio-inositol y Acido D-pantoténico (Mejía y Vitorelli, 1988).

### **2.3.3 Reguladores de crecimiento**

Se denominan así a diversas sustancias que las plantas producen endógenamente en pequeñas cantidades necesarias para modificar el crecimiento y la diferenciación celular. Estas sustancias pueden tomar otros nombres como: Sustancias de crecimiento, fitohormonas, hormonas de crecimiento, etc. (Guern, 1973). Existen también análogos sintéticos que se incorporan a los medios de cultivo y cumplen las mismas funciones (Mejía y Vitorelli, 1988). Leopold y Kriedeman, (1975) citados por Barba, (1987); reportan la existencia de cinco tipos de reguladores de crecimiento divididos en tres grupos: 1) promotores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas; 2) inhibidores de crecimiento (ácido abscísico); y 3) etileno.

#### **Auxinas**

Las auxinas desempeñan una función importante en la expansión de tallos y coleóptilos estimulando también la división celular (Weaber, 1984). Así mismo las auxinas en interacción con las citocininas regulan la iniciación de brotes y raíces. Una alta concentración de auxinas favorece el enraizamiento mientras se inhibe la formación de brotes, por el contrario las altas concentraciones de citocininas inducen la iniciación de brotes y suprime el enraizamiento (Murashige, 1974).

En cultivo de tejidos las auxinas de uso frecuente son: El Acido Indolacético (AIA), Acido Indolbutírico (AIB), Acido naftalenacético (ANA) y el Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) las cuales actúan sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Mejía y Vitorelli, 1988).

El AIA es una auxina natural que por efectos de la luz y la enzima AIA-oxidasa presente en tejidos cultivados *in vitro* es degradada, por ésta razón debe agregarse en

altas concentraciones (1-30 mg/l). En cambio el ANA es una auxina sintética y no es igualmente oxidable como el AIA, puede adicionarse en bajas concentraciones 0.1-2.0 mg/l). El 2,4-D es una auxina más potente que el ANA y el AIA (Dodds y Roberts, 1982).

López, (1985) y Barba, (1987) reportan que el AIA y el AIB se adicionan en concentraciones que varían de 0.1-10 mg/l. De acuerdo a la magnitud con que las auxinas promueven la expansión celular éstas pueden seguir un orden creciente: 2,4-D, ANA, AIB, y AIA (López, 1985).

Villalobos *et al.*, (1991) reportan que la inducción de raíces en *Opuntia amyloacea* fue posible en un medio MS sin suplemento de auxinas aunque la adición de éstas mejoró la capacidad de diferenciación de las raíces en los brotes.

### **Citocininas**

Las Citocininas más empleadas en cultivo *in vitro* son: Kinetina (KIN), Bencil Amino Purina (BAP) y Zeatina (ZEA). Las dos primeras son compuestos sintéticos mientras que la ZEA es de ocurrencia natural. La Kinetina es adicionada a una concentración de 0.1 mg/l para la inducción de callo y se puede emplear el agua de coco como una citocinina en concentración de 10-15% (Murashige, 1974).

Las citocininas actúan en interacción con las auxinas (Morel, 1973). Al igual que en plantas intactas, en tejidos *in vitro* las auxinas y la kinetina participan en la actividad meristemática y desarrollo de órganos; el AIA y la kinetina son requeridos para la síntesis activa de ADN, mitosis y procedimiento continuo de división celular (Skoog y Miller, 1957).

Villalobos (1985b) considera que las citocininas combinadas con las auxinas estimulan la división celular interactuando en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular. En cultivo *in vitro* las citocininas en mayores concentraciones que las auxinas inducen la formación de órganos iniciando el desarrollo de yemas. Así mismo, se

ha comprobado que el papel de las citocininas en la iniciación de raíces es limitado. Parece ser que éstas controlan el sistema vascular de las mismas (Skoog y Miller, 1957).

Villalobos *et al.*, (1991) reportan que en la micropropagación del *Agave* empleando medios de cultivo que contenían KIN (1 mg/l) + AIA (0.5 mg/l), obtuvieron un brote de 6 cm de largo por cada yema incubada a los 15 días. Comparativamente las yemas cultivadas en un medio con KIN (1 mg/l) y AIA (2 mg/l) a los 45 días alcanzaron un promedio de 6 brotes de 3 cm por cada explante.

### **Giberelinas**

En la naturaleza existen giberelinas a las cuales se conocen como GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub> hasta GA<sub>40</sub>. Estas se encuentran en mayor cantidad en la proximidad del ápice del tallo y se transportan rápidamente por toda la planta (Barba, 1987).

El papel principal de las giberelinas es la elongación extrema de los entrenudos sin aumentar su número. Esto se debe al crecimiento de la cantidad y tamaño de las células. En variedades enanas al aplicar este tratamiento, éstas se transforman en plantas normales. Se cree que las giberelinas son sintetizadas en las hojas muy jóvenes (Guern, 1973).

Villalobos (1985b) afirma que se utilizan las giberelinas en algunas especies para obtener plantas libres de virus mediante cultivo de meristemos y su adición al medio de cultivo no es crítica, Murashige (1974) considera que las giberelinas estimulan el crecimiento de órganos y generalmente detienen la iniciación de órganos. En presencia de luz el Acido Giberélico (GA<sub>3</sub>) inhibe la formación de raíces; sin embargo en oscuridad, especialmente en combinación con auxinas estimulan el enraizamiento.

El AG<sub>3</sub> utilizado en el bioensayo de la zanahoria estimula la división celular en lugar de producir alargamiento, especialmente en presencia de carbohidratos. La concentración varía entre 0.01 a 1.0 mg/l, pero cuando éstas se exceden de 1 mg/l se vuelven tóxicas

como se ha experimentado en cultivos de *Haplopappus*; en consecuencia se recomienda utilizar **AG3** a bajos niveles y con cautela, son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros (Krikorian, 1991).

## **2.4 Materiales inertes de soporte**

El agar es más ampliamente usado, provee un gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Cuando se utiliza medio líquido, el papel filtro o la fibra de vidrio pueden servir de puente entre el explante y el medio de cultivo (Cisne, 1989).

Existen marcas comerciales de agar que poseen trozos de microelementos, que en combinación con los del medio pueden provocar toxicidad al igual que falta de aireación, por disminuir la velocidad de difusión o por concentración de metabolitos producidos en la región de excisión de material leñoso de fácil capacidad oxidativa (Fuentealba, 1989).

## **2.5 Factores físicos**

Las condiciones físicas a las cuales son sometidos los explantes *in vitro* se pueden controlar perfectamente. Estas varían dependiendo de la especie y propósito del cultivo de tejidos. La temperatura y la luz son los factores físicos más importantes (Perea y Navarro, 1988).

### **2.5.1 Temperatura**

Los cultivos *in vitro* pueden mantenerse en un rango amplio de temperatura. Villalobos (1985b) reporta que los explantes pueden someterse a temperaturas que varían de 20-30°C y sugiere que los pretratamientos con bajas temperaturas pueden influir en la morfogénesis *in vitro*. Es aceptable para la incubación temperaturas entre 25-30°C aunque según la especie varían entre 20-32°C (Lozoya, 1985b). Las temperaturas de 20-25°C favorecen la rizogénesis *in vitro* (Margara, 1988).

En la conservación de germoplasma las bajas temperaturas juegan un papel importante en la reducción del crecimiento de los tejidos sin que afecte la viabilidad de los

mismos cuando se combinan con modificaciones a los medios de cultivo. Esto permite la conservación de material vegetal a mediano plazo aumentando el periodo de transferencia a un medio fresco.

Roca *et al.*, (1992) reportan que en el cultivo de la papa a 24°C las plántulas crecen rápidamente y a los 6 meses se deterioran irreversiblemente; sin embargo, a 8-10°C el crecimiento es lento y mantienen alta viabilidad.

### 2.5.2 Luz

La luz es un factor fundamental en la morfogénesis en condiciones controladas ya que influye en la diferenciación y crecimiento (Villalobos, 1985b). Esta afecta el desarrollo del inóculo incidiendo en la síntesis y la acumulación del almidón así como en las hormonas endógenas entre otras sustancias (Lozoya, 1985b).

Los aspectos más importantes de la luz son: Duración diurna (fotoperíodo) que generalmente se regula de 16-18 horas luz y 8 horas oscuridad y la intensidad que se mide en lux y generalmente varía de 1000-10000 lux (Lozoya, 1985b; Villalobos, 1985b; Perea y Navarro, 1988).

La alta intensidad de luz es necesaria para lograr un buen enraizamiento cuando se desea aumentar la cantidad de propágulos que serán transferidos al suelo. Esto lo han conseguido en *Helianthus tuberosus* con 5000 lux y fotoperíodo de 12 horas. Los días largos no influyen en el desarrollo de cultivo de tejidos de plantas las cuales están normalmente respondiendo al fotoperíodo (Murashige, 1974).

Villalobos *et al.*, (1984) demostraron que la luz interacciona con la citocinina BAP para inducir el proceso morfogenético en cotiledones de *Pinus radiata*. En el experimento los cotiledones cultivados en medios suplementados con BAP y expuestos a total oscuridad no mostraron crecimiento. Por el contrario sólo 3 días bastaron para iniciar el proceso de diferenciación el cual aumentó con el incremento de los días de exposición a la luz.

### 2.5.3 pH del medio

En general un alto pH (6.0) da buena solidez al medio de cultivo y un bajo pH (4.5) no permite que el agar gelifique (Department of Tropical Crop Science Agricultural University, 1984).

El colectivo de Biotecnología de la UCLV, (1988) consideran que el pH baja dos décimas de unidades durante la esterilización de los medios de cultivo. En los medios líquidos baja más que en los sólidos y por tal razón recomiendan elevarlo de 2 a 4 décimas por encima del pH óptimo, para un buen desarrollo en el proceso fisiológico de las plantas.

El pH debe ajustarse a cada caso en particular (Márgara, 1988). Según la especie que se cultive éste varía, por ejemplo: Camote (5.6); yuca (5.7-5.8); y papa (5.6-5.7) (Allan, 1979; Roca, 1980; Mejía y Vitorelli, 1988) respectivamente.

Márgara, (1988) citando a Ston (1963) reporta en clavel un 59% de éxito con pH 5.5 y solamente de 4% con pH 6. Dodds y Roberts, (1984) citando a diversos autores reportan que la fusión de protoplastos en avena (*Avena sativum* L. y maíz (*Zea mays*, L. está influenciada por un pH alto (10.5) y una alta concentración de calcio a temperatura de 37.5°C.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Localización del experimento**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el Km. 12 1/2 carretera norte, Managua en los meses comprendidos de Enero a Julio de 1991.

#### **3.2 Materiales y equipo**

Pinzas	alcohol 70%
placas petri	destilador de agua
hojas de escalpelos	marcadores
potenciómetro	masquintape
agitadores y calentadores electromagnéticos	parafina
balanza analítica	beakers
mecheros de Bunsen	pipetas
horno	cámara de flujo laminar
autoclave	papel aluminio
	algodón

#### **3.3 Esterilización de materiales y equipo**

Los frascos se esterilizaron en autoclave a 125°C durante 45 minutos. Las placas petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en horno a 170°C durante una hora. Antes de transferir el material vegetal a los medios de cultivo, se esterilizó la cámara de flujo laminar con rayos ultravioletas durante 15 minutos y se limpió con alcohol al 70%. Así mismo éste fue empleado para frotarse constantemente las manos durante la transferencia del material. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C y a 1 atmósfera de presión durante 21 minutos.

### 3.4 Preparación de los medios de cultivos

Se utilizaron las sales del medio básico de Murashige y Skoog, (1962) (Tabla 1).

**Tabla 1** Constituyentes del medio básico Murashige y Skoog, (1962)

Solución	Constituyentes	Concentración Final (mg/l)
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg
2	KNO <sub>3</sub>	1900 mg
3	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub>	370 mg
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg
5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg
6	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	22.3 mg
7	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub>	8.6 mg
8	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub>	0.25 mg
9	Cu SO <sub>4</sub>	0.025 mg
10	Co Cl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg
11	KI	0.83 mg
12	Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub>	440 mg
13	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 mg
14	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub>	27.8 mg
15	Tiamina-HCL	0.4 mg

Fuente: Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Una vez aforados los medios de cultivo, se les ajustó el pH a 5.6 con la adición de hidróxido de potasio (KOH) al 1N, luego se les agregó el agar y se disolvió en agitadores electromagnéticos hasta su ebullición. Posteriormente se vertieron en sus frascos respectivos.

### 3.5 Siembra del material vegetal

Las plantas que se utilizaron procedían de condiciones *in vitro* las que se dividieron en segmentos de 10 mm aproximadamente bajo condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar, estos segmentos se inocularon en frascos de 11.5 cm de alto por 6.5 cm de diámetro los cuales contenían 30 ml del medio base MS semi-sólido con diferentes variantes de vitaminas y hormonas (Tabla 2).

**Tabla 2 Variantes del medio básico Murashige y Skoog, (1962), cantidades en mg/l**

<b>CONSTITUYENTES</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>
Auxinas (AIA)	0.5	-	-
Citocininas (Kinetina)	0.2	-	-
Giberelinas (AG <sub>3</sub> )	-	-	0.25
Tiamina-HCL	0.2	0.2	0.2
Piridoxina	1.0	-	-
Glycina	0.2	-	-
Acido nicotínico	1.0	-	-

M1 = Medio uno.

M2 = Medio dos.

M3 = Medio tres.

Los frascos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a temperatura de 25°C +/- 1; con una intensidad lumínica de 2500 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad durante treinta días.

Se realizaron tres multiplicaciones sucesivas (subcultivos) siguiendo los pasos anteriormente descritos.

### **3.6 Diseño del Experimento**

El experimento se estableció en un Diseño completo al Azar (DCA) en un arreglo trifactorial. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y se realizó una separación de medias de Duncan al 5% de probabilidad determinándose los siguientes factores y niveles como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 3 Factores en estudio realizados en el experimento durante el período comprendido de Enero a Julio de 1991**

<b>Factor A: Variedades</b>	<b>Factor B: Medios de Cultivo</b>	<b>Factor C: Subcultivos</b>
-a <sub>1</sub> = Desirée	-b <sub>1</sub> = Primer tratamiento	-c <sub>1</sub> = Primer subcultivo
-a <sub>2</sub> = DTO-28	-b <sub>2</sub> = Segundo tratamiento	-c <sub>2</sub> = Segundo subcultivo
-a <sub>3</sub> = Baraka	-b <sub>3</sub> = Tercer tratamiento	-c <sub>3</sub> = Tercer subcultivo

### **3.7 Tratamientos**

Se utilizaron las variedades de papa Desirée Baraka y DTO-28 y tres medios de cultivo (Tabla 2) con veinte repeticiones por tratamiento y tres subcultivos.

### **3.8 Evaluaciones**

Las evaluaciones se realizaron a los 30 días, después de inoculados los explantes. Las variables evaluadas fueron:

**Altura de la planta:** Se midió con una regla graduada en centímetros a cada una de las observaciones desde la base del tallo hasta la yema apical.

**Longitud de entrenudos:** Se midió en centímetros como la distancia existente entre un nudo y el subsiguiente en cada una de las observaciones.

**Número de hojas:** Se contaron todas las hojas completamente desarrolladas en cada una de las observaciones.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Primer subcultivo

#### 4.1.1 Altura de plántula

En la ANDEVA realizado a la variable altura se observan diferencias significativas en el comportamiento entre variedades al igual que en las interacciones variedades-medios de cultivo, sin embargo, entre los medios no existen estas diferencias (Anexo 1).

En la variable altura de la plántula, la variedad Desirée en el tercer tratamiento presentó el mayor valor 9.30 cm diferenciándose significativamente de los obtenidos en los tratamientos uno y dos según la prueba de DUNCAN para rangos múltiples; la variedad DTO-28 aunque no reflejó diferencias estadísticas por efecto de los tres tratamientos, numéricamente presentó mayor altura en el primer tratamiento con 7.50 cm; Baraka también no presentó diferencias estadísticas en los tres tratamientos, pero en los valores cuantitativos, en el tercer tratamiento manifestó ligeramente mayor altura en el primer y segundo tratamiento con valores respectivos de 4.11, 3.65 y 3.02 cm (Tabla 4).

**Tabla 4 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula (cm) de tres variedades de papa en el Primer subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	6.18 b	7.05 b	9.30 a
DTO-28	7.50 b	7.18 b	6.25 b
Baraka	3.65 c	3.02 c	4.11 c
%cv. = 34.66559			

### 4.1.2 Número de hojas

En el ANDEVA de la variable número de hojas se observan diferencias significativas entre las variedades, los medios de cultivo y las interacciones (Anexo 3).

En la variable número de hojas estadísticamente no existieron diferencias entre las variedades Desirée y DTO-28, pero sí entre éstas y Baraka. Los promedios de las evaluaciones registradas por Desirée en el primer tratamiento y DTO-28 en el primer y tercer tratamiento fueron mínimas con valores respectivos de 5.80, 5.70 y 5.75.

Otra diferencia numérica mínima se observó entre Desirée en el tercer tratamiento con 7.25 y DTO-28 en el segundo con 7.00. Baraka con resultados estadísticos menores que las otras variedades, también presentó una dinámica de crecimiento con diferencias mínimas por influencia de los tratamientos, registrándose promedios de 3.55, 3.66 y 3.65 para el primero, segundo y tercer tratamiento respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios del número de hojas de tres variedades de papa en el primer sub-cultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	5.80 a	6.25 a	7.25 a
DTO-28	5.70 a	7.00 a	5.75 a
Baraka	3.55 b	3.66 b	3.65 b
%cv. =	11.58907		

### 4.1.3 Longitud de entrenudos

En el ANDEVA de la variable longitud de entrenudos se observan diferencias significativas entre las variedades en estudio y las interacciones variedades-medios de cultivo (Anexo 3).

En la longitud de entrenudos, los menores promedios se expresaron por efecto del segundo tratamiento en las tres variedades con valores de 1.18, 1.08 y 1.10 cm para Desirée, DTO-28 y Baraka respectivamente. Las variedades Desirée y DTO-28 registraron los promedios más altos en el tercer tratamiento con 1.42 y 1.37 cm para cada una de ellas; mientras que Baraka obtuvo el mejor resultado en el primer tratamiento con 1.32 cm. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos (cm) de tres variedades de papa en el primer subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	1.24 ab	1.18 ab	1.42 a
DTO-28	1.31 ab	1.08 b	1.37 ab
Baraka	1.32 ab	1.10 b	1.25 ab
$\%cv. = 34.60032$			

## 4.2 Segundo Subcultivo

### 4.2.1 Altura de plántula

En el Anexo 4 se presenta el ANDEVA de la variable altura de plántula observándose diferencias significativas entre variedades y medios de cultivo por separado no existiendo diferencias entre las interacciones variedades-medios de cultivo.

Según la prueba de DUNCAN en el tratamiento uno Desirée y DTO-28 tienen promedios similares 6.95 y 6.75 respectivamente, diferenciándose de Baraka con promedio de 5.55. En el tratamiento dos Desirée obtuvo el más alto promedio con 5.32 diferenciándose significativamente de DTO-28 con promedio de 3.15 y ésta de Baraka con promedio de 3.94 (Tabla 7).

**Tabla 7 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula (cm) de tres variedades de papa en el segundo subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	6.95 a	5.27 b	5.32 b
DTO-28	6.75 a	3.15 c	4.40 bc
Baraka	5.55 b	3.94 bc	4.93 b
%cv. = 43.03464			

#### 4.2.2 Número de hojas

En la variable número de hojas el ANDEVA determinó que existen diferencias significativas entre variedades y medios de cultivo por separado, pero no existen entre las interacciones (Anexo 5).

DUNCAN refleja diferencias significativas para las tres variedades en el tratamiento uno; en el tratamiento dos DTO-28 y Baraka no difieren entre sí con promedio de 3.80, pero Desirée difiere significativamente de éstas con promedio de 5.10. En el tratamiento tres Desirée obtuvo promedio de 4.9 y DTO-28 de 4.2, ambas diferenciándose significativamente de Baraka la cual obtuvo promedio de 3.90 (Tabla 8).

**Tabla 8 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de número de hojas de tres variedades de papa en el segundo subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	6.15 a	5.10 bc	4.90 cd
DTO-28	5.25 b	3.80 f	4.20 de
Baraka	4.15 e	3.80 f	3.90 f
% cv. = 14.89344			

### 4.2.3 Longitud de entrenudos

El ANDEVA realizado a la variable longitud de entrenudos demostró que existen diferencias significativas entre las variedades y los medios de cultivo por separado, pero no hay grado de significancia entre las interacciones variedades-medios de cultivo (Anexo 6).

Según DUNCAN las tres variedades alcanzaron los más altos valores en el tratamiento uno sin obtener diferencias significativas. En el tratamiento dos las tres variedades obtuvieron similares valores diferenciándose significativamente de los obtenidos en el tratamiento uno. En el tratamiento tres Desirée y DTO-28 no obtuvieron diferencias significativas entre sí, pero Baraka se diferencia significativamente de éstas (Tabla 9).

**Tabla 9 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos (cm) de tres variedades de papa en el segundo subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	1.42 a	0.96 b	0.90 b
DTO-28	1.38 a	0.92 b	1.00 b
Baraka	1.53 a	1.07 b	1.38 a

% cv. = 35.69537

### 4.3 Tercer Subcultivo

#### 4.3.1 Altura de plántula

El análisis de varianza de la variable altura refleja que existen diferencias significativas entre las variedades y medios de cultivo por separado, pero no existen diferencias entre las interacciones variedades-medios de cultivo (Anexo 7).

En altura de plántula, las variedades Baraka y Desirée por influencia del tercer tratamiento obtuvieron los mayores promedios con 8.37 y 7.97 cm respectivamente, DTO-28 expresó mayor altura en el primer tratamiento, aunque no se observaron diferencias estadísticas con los promedios alcanzados por efecto del tercer tratamiento con valores en cada uno de ellos de 6.85 y 6.49 cm (Tabla 10).

**Tabla 10 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de altura de plántula de tres variedades de papa en el tercer subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	6.53 bc	7.30 abc	7.97 ab
DTO-28	6.85 bc	6.30 c	6.49 bc
Baraka	6.96 abc	7.60 abc	8.37 a
% cv. = 28.86098			

#### 4.3.2 Número de hojas

El ANDEVA de la variable número de hojas refleja que las variedades entre sí, presentan diferencias significativas, sin embargo, los medios de cultivo y las interacciones variedades-medios de cultivo no reflejan diferencias significativas (Anexo 9).

Baraka obtuvo mayor número de hojas que las otras variedades en los tres tratamientos, destacándose el primer tratamiento con promedio de 7.3 hojas por plántula. No se presentaron diferencias significativas entre Desirée y DTO-28 en los tres tratamientos. Desirée con promedios de 4.65 en el primer tratamiento y 4.70 en el tercero alcanzó similar promedio al obtenido por DTO-28 en el tercer tratamiento con 4.60. Los resultados se observan en la Tabla 11.

**Tabla 11 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de número de hojas de tres variedades de papa en el tercer subcultivo**

	M1	M2	M3
Desirée	4.65 b	4.95 b	4.70 b
DTO-28	4.25 b	4.45 b	4.60 b
Baraka	7.30 a	7.05 a	6.65 ab
% cv. = 9.767511			

### 4.3.3 Longitud de entrenudos

Los resultados del ANDEVA de la variable longitud de entrenudos indican que existen diferencias significativas entre las variedades y también entre las interacciones variedades-medios de cultivo, pero no hay diferencias entre los medios de cultivo (Anexo 8).

La prueba de DUNCAN para la variable longitud de entrenudos, refleja mayor cantidad de sub-grupos que en los subcultivos 1 y 2. Baraka presentó los menores promedios con 0.64, 0.88 y 1.02 para el primero, segundo y tercer tratamiento respectivamente. Desirée en el segundo tratamiento y Baraka en el tercero obtuvieron diferencias mínimas en promedio (Tabla 12).

**Tabla 12 Prueba de DUNCAN al 5% de probabilidad y promedios de longitud de entrenudos en tres variedades de papa en el tercer subcultivo**

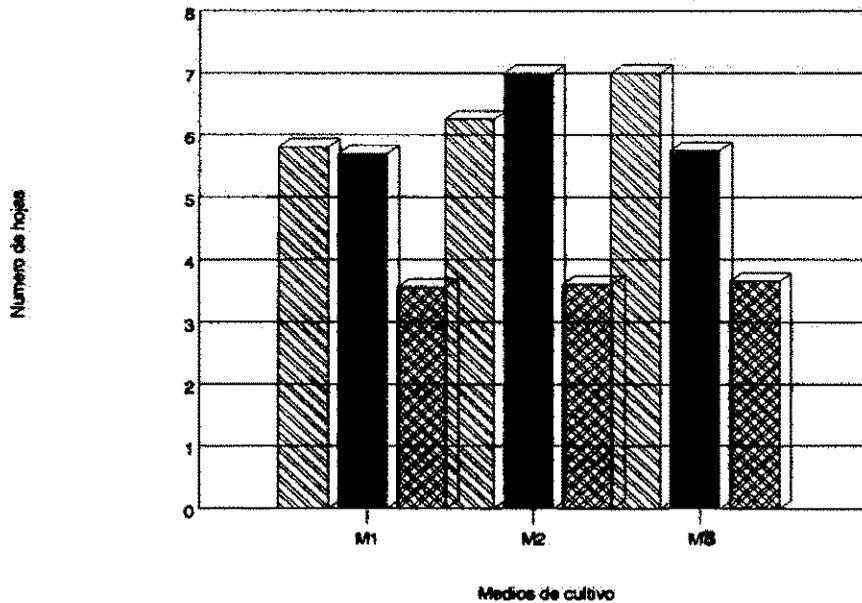
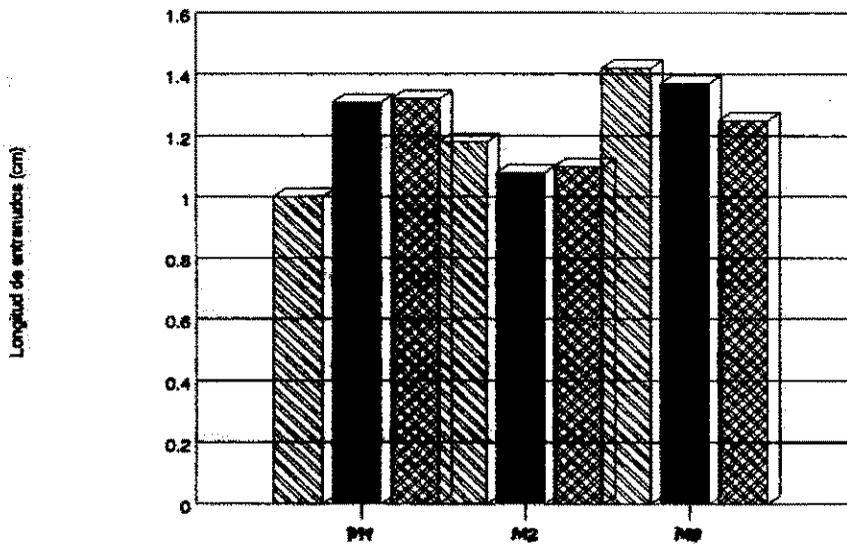
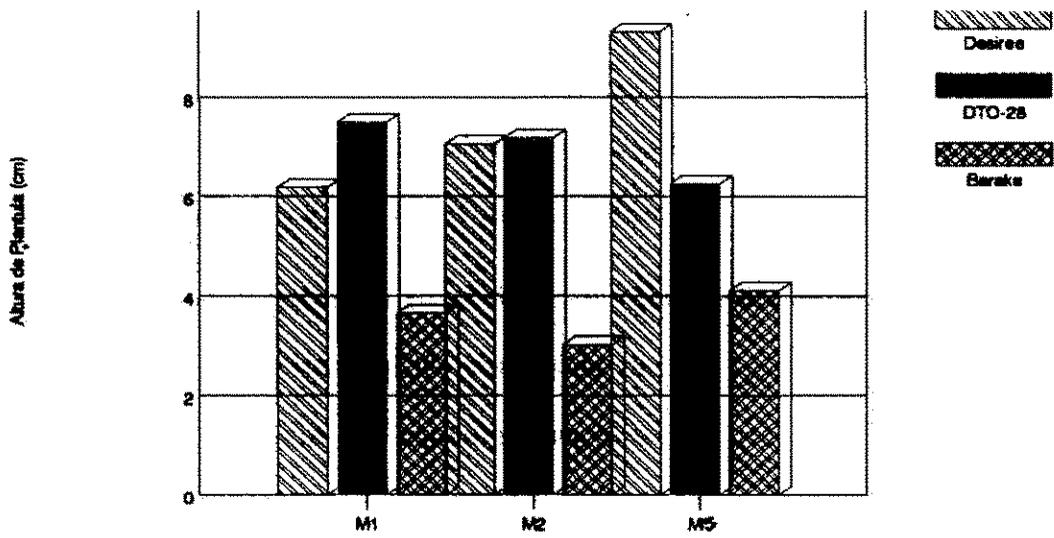
	M1	M2	M3
Desirée	1.52 ab	1.05 cd	1.37 b
DTO-28	1.62 a	1.38 ab	1.25 bc
Baraka	0.64 e	0.88 de	1.02 cd
% cv. = 34.67224			

## V. DISCUSION

A través de la micropropagación se obtiene una tasa de multiplicación más rápida y elevada que por métodos tradicionales. Esta técnica ha sido utilizada en muchas especies entre ellas el cultivo de la papa (*S. tuberosum* L.) la que se propaga asexualmente por segmentos de tallo o tubérculos y sexualmente por medio de semilla botánica, siendo la primera, la forma de propagación más empleada porque asegura la conservación de las características varietales durante generaciones sucesivas (Costa y Estrada, 1988). Karp *et al.*, (1982) señalan que las plantas producidas de yemas meristémicas son generalmente de naturaleza uniforme y que las raras variaciones son atribuidas a mutaciones espontáneas.

En el presente estudio, las plantas originadas a partir de la inoculación de yemas axilares, presentaron un buen aspecto morfológico y fisiológico, pero con diferencias en los resultados producto de una dinámica de crecimiento muy variada, tanto por el efecto que ejercieron los tratamientos sobre las variedades en cada una de las variables evaluadas (altura de plántula, longitud de entrenudos y número de hojas) como por las diferencias en la constitución genotípica de cada una de las variedades produciéndose el siguiente comportamiento en los tres subcultivos: Generalmente, al ser mayor la altura de la plántula y menor la longitud de entrenudos, se incrementó el número de hojas y al ser mayor la altura y la longitud de entrenudos, menor fue el promedio de hojas formadas. Esta tendencia puede observarse en la figura 1.

En dependencia de una u otra tendencia que se presentó, la tasa de multiplicación podrá ser mayor o menor debido a que cada hoja tiene en la base del pecíolo una yema axilar que estará en capacidad de producir una nueva plántula debidamente formada en un período aproximado de cuatro semanas. Amirouche *et al.*, (1985) señalan que las



**Figura 1. Efecto de tres medios de cultivo sobre la altura, longitud de entrenudos y número de hojas de tres variedades en el primer subcultivo**

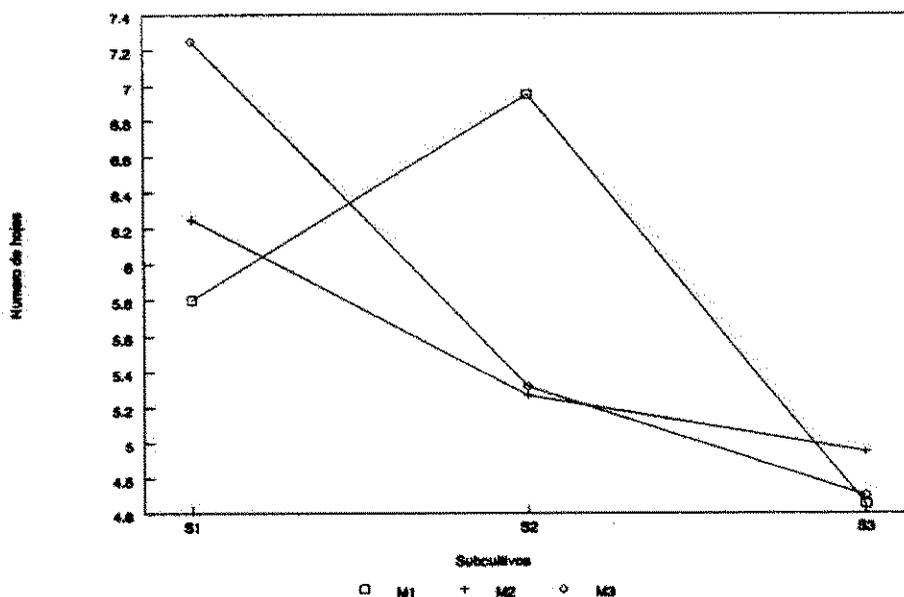
plantas de papa que desarrollan mayor altura tienden a producir mayor número de entrenudos que las que tienen menor altura.

Se debe considerar en relación a los resultados obtenidos que en el estudio realizado se utilizaron indistintamente yemas de partes apicales, centrales y basales; sin realizar una selección previa del material vegetativo, partiendo que el presente experimento servirá para su posterior aplicación a nivel comercial donde se incluye el empleo de yemas ubicadas en diferentes partes de la plántula.

Maroti *et al.*, (1982) señalan que entre los muchos factores afectan la diferenciación de los ápices meristemáticos está la localización de la yema en la plántula. Estudios realizados por Nowak y Colborne, (1989) en microtuberización de papa no incluyeron yemas apicales por encontrar diferencias significativas en la respuesta a la tuberización.

Considerando lo señalado por Caligari y Powel, (1989) sobre la importancia de la producción de hojas con sus yemas axilares en la micropropagación de la papa, dado que cada yema originará una nueva plántula, se determinó la mejor respuesta de las tres variedades haciendo énfasis en los resultados expresados por la variable número de hojas, resultados que están influenciados en gran medida por los constituyentes que caracterizan a cada tratamiento y por la interacción entre éstos y el genotipo de cada una de las variedades estudiadas.

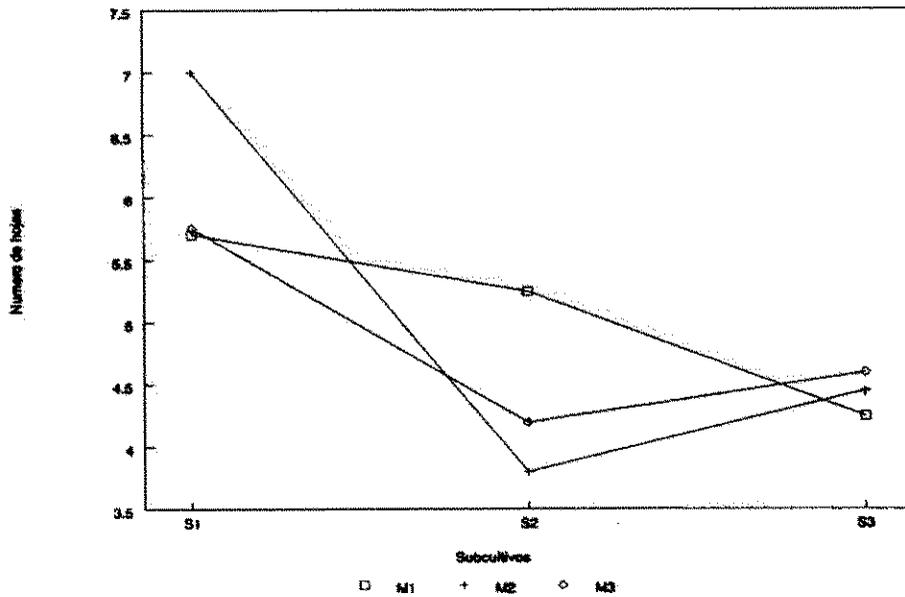
La variedad Desirée redujo el número de hojas a medida que se incrementaban los subcultivos, cuando los segmentos de tallo con su yema axilar se inocularon en el tercer tratamiento (sales MS + 0.25 mg/l de GA<sub>3</sub>); en el primer tratamiento (sales MS + 0.5 mg/l de AIA + 0.2 mg/l de Kinetina + Vitaminas) el número de hojas experimentó un ligero incremento en el segundo subcultivo. Las fluctuaciones del número de hojas se observan en la figura 2.



**Figura 2. Efecto de tres medios de cultivo sobre el número de hojas de la variedad Desirée en tres subcultivos**

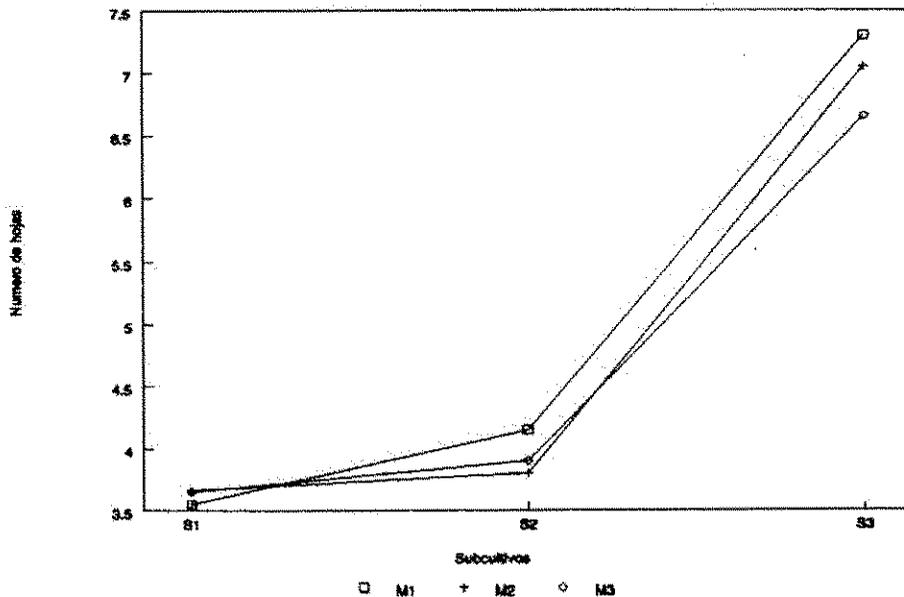
En base a la mejor estabilidad mostrada por Desirée, se determinó que el segundo tratamiento es favorable para realizar el proceso de micropropagación, además que con el empleo de este tratamiento se reducen las posibilidades de obtener plántulas con características atípicas, debido a que no contiene reguladores de crecimiento. Costa y Estrada, (1988) citando a Lozoya y Merinos, (1985) recomiendan que durante la micropropagación de papa, para mantener estable las características varietales no se deben emplear todo tipo de hormonas como auxinas y citocininas, porque pueden inducir a mutaciones.

La variedad DTO-28 disminuyó la formación de hojas con el incremento del número de subcultivos, cuando los segmentos de tallo se inocularon en el primer tratamiento. En el segundo y tercer tratamiento después de la reducción de número de hojas en el segundo subcultivo, se produjo un incremento en el tercer subcultivo, pero las plántulas no llegaron a alcanzar los promedios obtenidos en el primer subcultivo. En la figura 3 se observa la dinámica de DTO-28 en los tres subcultivos y los tres tratamientos.



**Figura 3. Efecto de tres medios de cultivos sobre el número de hojas de la variedad DTO-28 en tres subcultivos**

La mayor estabilidad de hojas se logra en el tercer tratamiento que contiene las sales MS con 0.25 mg/l de GA<sub>3</sub>. Morel, (1973) recomendó la adición de ácido giberélico al medio de cultivo ya que provoca un funcionamiento normal del meristemo o yema apical de papa, dando como resultado la formación de un tallo normal con hojas.



**Figura 4. Efecto de tres medios de cultivo sobre el número de hojas de la variedad Baraka en tres subcultivos**

Un comportamiento que caracterizó a Baraka fue que el número de hojas se incrementó en cada subcultivo y en los tres tratamientos (Figura 4), destacándose con los promedios obtenidos las plántulas desarrolladas en el primer tratamiento y con ligera ventaja al tratamiento dos que no contiene reguladores de crecimiento.

Aunque el mejor comportamiento de Baraka se manifestó en el primer tratamiento, los reguladores de crecimiento que contiene, pueden ser fuente de variación somaclonal reportada por muchos investigadores. Evans y Bravo, (1986) señalan que la variación somaclonal es provocada por la adición de kinetina al medio de cultivo, produciendo alta frecuencia de poliploidía. Allan, (1979) en trabajos realizados en camote (*Ipomoea batatas* L.) utilizando concentraciones de 0.1 mg/l de kinetina y 0.5 mg/l de AIA obtuvo un gran porcentaje de callos formados. Yeoman y Forsche, (1980) reportan que la kinetina en conjunto con auxinas son responsables del aumento de la variabilidad del género *Musa* spp.

## **VI. CONCLUSIONES**

Tomando en cuenta los análisis estadísticos y las observaciones en el ensayo se concluye:

- 1.- Desirée y Baraka obtuvieron un comportamiento aceptable en el medio dos y DTO-28 en el medio tres.
- 2.- Con el aumento del número de subcultivos disminuyó el coeficiente de multiplicación de las variedades Desirée y DTO-28 y se incrementó el de Baraka.
- 3.- El número de hojas de las variedades en estudio, lo determinó la relación numérica que existe entre las variables altura de plántula y longitud de entrenudos.
- 4.- Cada variedad responde de manera particular debido al efecto de los tratamientos y a su genotipo.
- 5.- En el proceso de micropropagación no se observaron evidencias fenotípicas de variación somaclonal en las tres variedades estudiadas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- 1. Debido a que no se obtuvieron diferencias significativas de las tres variedades en los tres medios de cultivo se puede prescindir de la adición de Kinetina en la micropropagación de papa.**
- 2. Las variedades Desirée y Baraka mostraron un comportamiento aceptable en el tratamiento dos, y DTO-28 en el medio tres, por lo tanto, se pueden utilizar estos medios de cultivo como método de rutina en la micropropagación de la papa por resultar más económicos.**

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M. y Reyes, G. 1987. Estudio de cultivo *in vitro* en el mejoramiento y producción de semilla de plátano (*Musa sp.*). Tesis Ing. Agr. Universidad Central de las Villas, Cuba. 40 p.
- Allan, J. J. 1979. Tissue culture storage of sweet potato germplasm. Ph. D. Thesis. Nirmingham, G.B., University of Birmingham. 253 p.
- Amezquita, J. M. y Mingo-Castel, A.M. 1989. Cultivo de ápices meristemáticos de tallo y micropropagación de patata (*Solanum tuberosum* L. C.V. "Kenebec" y "Jaerla". Investigación Agraria. (España) Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. 4(1) 7-17.
- Amirouche, L.; Stuchbury, T. y Matthews, S. 1985 Comparasions of cultivar perfomance on different nutrient media in a routine method for potato propagation. Potato Res. 28, 469-478.
- Barba, Alvarez, S. 1987. Rguladores de crecimiento vegetal. Ed. por Daniel Hurtado V. y María Eugenia Merino en: Cultivo de Tejidos Vegetales. 1 ed. México, D.F. Trillas, 229 p.
- Caligari, S.P. , P.D. and W. Powell, 1989. Variability in response of potato cultivars to micropopagation I. *In vitro* perfomance Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee Ann, appl. biol. p. 115-121.
- Centro Internacional de la Papa. 1985. Boletín de informaciones tecnológicas agropecuarias. Lima, Perú, 4(1).
- Cisne, J.D. 1989. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias, 78 p.

- Colectivo de Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas. 1988. Ponencia: Perspectivas, resultados y recomendaciones para el empleo de la micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum sp.* híbrido). Universidad Central de las Villas, (Cuba), 14 p. Sin publicar.
- Costa, E. y Estrada, C. 1988. Comportamiento de tres variedades de papa sobre diferentes medios de cultivos para la micropropagación *in vitro*. Ciencia Técnica Agraria (Cuba), 7 (2).
- Damasco, D.P. y Barba R.C. 1983. *In vitro* culture of "saba" banana (*Musa balbisiana* (C.B.) Biotecnology in: International Agriculture Reserch. Philipinas, pág. 41-44.
- Department of Tropical Crop Science Agricultural University. 1984. Introductory course on *in vitro* culture. (Netherlands). Wageningen. 84 p.
- Doods, J.H. and Roberts, L.W. 1982. culture of plant cells, tissues and organs en: Experimentns in plant tissue culture. Cambridge University Press. p. 1-9.
- Doods, J.H; and Roberts, L.W. 1984. Experiments in plant tissue culture, 3 ed. EE.UU. Cambridge University Press. 178 p.
- Espinoza, N.; Lizarraga, R. Silva-Rodríguez, D.; Buitrón, F.; Bryan, J. y Dodds, J.H. 1989. Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Lima, Perú, Centro Internacional de la papa. Guía de Investigación, CIP, 17 p.
- Evans, D.A. and Bravo, J. E. 1989. Phenotypic and genotipyc stability of tissue cultured plants, eds. Zimerman, R.H. *et al*, en: Tissue culture as a plant production system for horticultural crop. Netherlands. p. 73-96.
- Fuentealba A., J.E. 1989. Micropropagación y multiplicación rápida de papas. Uniervsidad Austral de Chile. 5 p.

- Guern, M. 1973. Diversos aspectos de la idea de reguladores de crecimiento en: Reguladores de Crecimiento. 1ed. Barcelona, ACTA-Oikos-tau. p. 21-29.
- Mendre, R.R.; Iyer, R.S. y Koywat, M. 1983. Rapid multiplication of sugar cane (U.K.) 1:5-8.
- Hurtado, D.V. y Merino M.M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. 1 ed. México, D.F., Trillas, 229 p.
- Karp, A.; Noloan, R. S.; Thomas, E. y Bright, S. W. J. 1982. Chromosome variation in protoplast derived potato plants. Theor. Appl. Genet. 63:265-272.
- Krikorian, A. D. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación en: Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia. Pág. 41-77.
- Lee, T.S.G. 1986. Producing Healthy Sugar Cane (*Saccharum* spp.) seedstalks by the tissue cultured method sixth. International Congress of Plant, Tissue and cell culture, Minneápolis, Minnesota, E.U.
- López Zada, M.; Vásquez, B.E.; López ,F.R. 1984. Raíces y tubérculos. La Habana, Pueblo y Educación. p. 245-248.
- López Peralta, C. 1985. Medios de cultivo. Ed. por Victor M. Villalobos en: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivos de tejidos vegetales. Chapingo (México). Colegio de Posgraduados. 160 p.
- Lozoya Saldaña, H. 1985a. Cultivo *in vitro* de ápices para la obtención de plantas libres de patógenos. Ed. por Victor M. Villalobos en: Fundamentos Teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo (México) Colegio de Postgraduados. 160 p.

- Lozoya Saldaña, H. 1985 b. Micropropagación de especies herbáceas. Ed por Manuel Loyola en el: Cultivo de Tejidos vegetales en México. 1 ed. México, D.F. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, p. 65-79.
- Márgara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*; los meristemos y la organogénesis. Ed. por Mateo Box, J.M. y Urbano Terrón. P. Madrid, Mundi-prensa, 231 p.
- Maroti, M.; Rudolf, J.; Bognar, J., Pozsar, B.I. 1982 *In vitro* plantlets from potato shoot segments. Acta Bot. Acad. Sci. Hungarice, 28 (1-2), 127-132.
- Mejía Anaya, R. Vitorelli, C. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. Lima, (Perú). Programa de Investigación en Papa. Instituto nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. 111 p.
- Merino Manzanares, M.E., 1987. Medios de Cultivo. Ed. por Daniel Hurtado y María Eugenia Manzanares en: Cultivo de Tejidos Vegetales. 1 ed. México, D.F. Trillas, 229 p.
- Montaldo, A. 1984. Cultivo y Mejoramiento de la papa, San José, C.R. IICA, Serie de libros y materiales educativos, 676 p.
- Mora, M. I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores químicos para la conservación del germoplasma *in vitro* de *Musa sp.* Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R. Universidad de Costa Rica/CATIE, 94 p.
- Morel, G. 1973. Propiedades fisiológicas y formas de actuar de las auxinas y giberelinas en Reguladores de Crecimiento. 1 ed. Barcelona, ACTA-Oikos-tau. p. 31-51.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Plant Physiol. 25:135-166.

- Navarro Urrutia, S. 1987. Cultivo de meristemos. Ed. por Daniel V. Hurtado y María Eugenia Merino M. en: Cultivo de tejidos vegetales. 1 ed. México. D. F. Trillas, 229 p.
- Nowak, J. and D, Colborne. 1989. *In vitro* tuberization and tuber proteins as indicators of heat stress tolerance in potato. American Journal (EE.UU.) 66 (1): 35-45.
- Perea, M. y Navarro, W. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. Universidad Nacional de Costa Rica, CONICIT.
- Ramos, Ferrer, A. ; Boffill de C., I.; Chenagusia, R.A. Ferrer Fernández, A.; Hernández Fernández, M.; Huelva López, R. y Váldez Carmenate, R. 1985. Bioquímica para estudiantes de Ciencias Agropecuarias, La Habana, Cuba, Pueblo y Educación. 228. p.
- Roca, M. W. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Cali, (Col.) Centro Internacional de Agricultura Tropical. Guía de Estudio. 40 p.
- Roca, M.W.; Escobar, R.; Mafla, G. 1992. Conservación de Germoplasma de Yuca *in vitro*. Principios y Técnicas, CIAT, Cali, (Col.). p. 15
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation en plant tissues cultured *in vitro*. Society for experimental biology (London) and Cambridge University Press (New York). Simposio, 11:118-131.
- Suvaire, D. y Galzy, R. 1987. Micropropagación de la canne sucre par batetutage *in vitro* action d'une auxine et du'une citoquinine. Agronomía Tropical. vol. 36 No.1.
- Villalobos Arámbula, V. M.; Oliver, M.J.; Yeung, E.C. and Thorpe, T.A. 1984. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of *radiata pine* culture *in vitro*. Physiol, Plant. 61:483-489.

- Villalobos Arámbula, V. M. 1985a. Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Colegio de post-graduados. 160p.
- Villalobos A, V.M. 1985 b. Las bases morfogénicas de en la micropropagación de especies perennes. Ed. por Manuel L. Roberts y Victor Manuel Loyola en el: Cultivo de tejidos vegetales en México. 1 ed. México, D.F. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, p. 55-64.
- Villalobos, V. M.; Mejía Muñoz, J.M.; Escobar Araya, H.A. 1991. Micropropagación de opuntias y agaves en: Cultivos de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis Mroginski. CIAT. Cali, Colombia, p. 642-650.
- Weaber, R.J. 1984. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. 1ed. México, Trillas. 622 p.
- Withers, L.A. 1985. Requisitos mínimos para mantener materiales de propagación en cultivo de tejidos. Roma., FAO. 38 p.
- Yeoman, M.M. y Forsche, E. 1980. Cell Proliferation and Growth in callus culture. En: Perspectives in Plant cell and Tissue culture. Academic Press. New York, 250 p.

# IX.- ANEXOS

## TABLA 13

### ANEXO 1. ANDEVA DE LA VARIABLE ALTURA EN EL PRIMER SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	540.461	270.2305	61.92459	3.05 *
Med	2	25.036	12.51782	2.86852	3.05 NS
Var*Med	4	107.611	26.90271	6.16488	2.42 *
Error	171	746.221	4.363864		
TOTAL	179	1,419.328			

### ANEXO 2. ANDEVA DE LA VARIABLE NUMERO DE HOJAS EN EL PRIMER SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	14.500120	7.250012	93.266953	0.5 *
Med	2	0.653565	0.3267822	4.2038243.05*	
Var*Med	4	1.742188	0.4355469	5.6030052.42*	
Error	171	13.292600	7.73451E-0.2		
TOTAL	179	30.188473			

### ANEXO 3. ANDEVA DE LA VARIABLE LONGITUD EN EL PRIMER SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	9.072876e-02	4.536438e-02	2420823	3.05 NS
Med	2	1.700745	8503723	4.537924	3.05 *
Var*Med	4	3942566	9.856415e-02	5259773	2.42 NS
Error	171	32.0441	1873924		
TOTAL	179	34.22983			

# TABLA 14

## ANEXO 4. ANDEVA DE LA VARIABLE ALTURA EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	44.77588	33.38794	4.578605	3.05 *
Med	2	164.4766	82.23828	16.81873	3.05 *
Var*Med	4	32.27686	8.06921	1.650252	2.42 NS
Error	171	836.1363	4.88969		
TOTAL	179	1077.666			

## ANEXO 5. ANDEVA DE LA VARIABLE NUMERO DE HOJAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	2.770264	1.385132	12.52922	3.05 *
Med	2	1.860596	0.930298	8.415013	3.05 *
Var*Med	4	0.3466675	8.663941E-02	0.7836971	2.42 NS
Error	171	18.90442	0.11055		
TOTAL	179	23.88184			

## ANEXO 6. ANDEVA DE LA VARIABLE LONGITUD DE ENTRENUDOS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO

F de V.	G de L	S de C	Cuad. Medio	Valor de Fc	Ft
Var	2	1.743912	0.8719559	4.934305	3.05 *
Med	2	6.67195	3.335976	18.87793	3.05 *
Var*Med	4	0.24580	6.145096E-02	0.347744	2.42 NS
Error	171	30.21793	0.76713		
TOTAL	179	38.879			