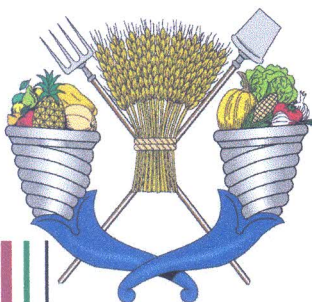




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro* EN PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) cvs. ATLANTIC Y FRITOLAY-1867.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA

MA. DEL CONSUELO SÁNCHEZ-ENCISO

Chapingo, Méx., Agosto de 2004



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



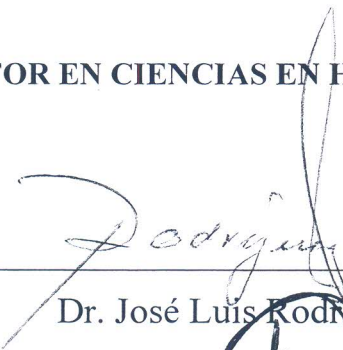
Instituto de Horticultura

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *IN VITRO* EN PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) CVS. ATLANTIC Y FRITOLAY-1867.**

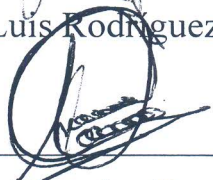
Tesis realizada por Ma. Del Consuelo Sánchez Enciso bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

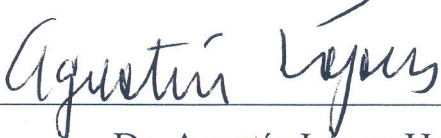
DIRECTOR _____


Dr. José Luis Rodríguez de la O

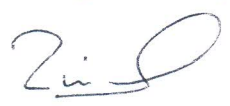
ASESOR _____


Dr. Sergio Barrales Domínguez

ASESOR _____


Dr. Agustín López Herrera

ASESOR _____

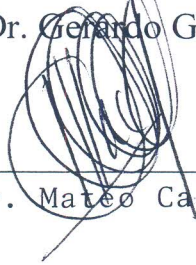

Dr. Guillermo Zárate de Lara

ASESOR _____


Dr. Gerardo Gonzáles de la Cruz

ASESOR

EXTERNO _____


Dr. Mateo Cadena Hinojosa

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Departamento de Fitotecnia, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, por su valiosa dirección y asesoría durante el desarrollo de ésta investigación.

Al Dr. Sergio Barrales Domínguez, por su valiosa colaboración y apoyo en la revisión y sugerencias para mejorar la presente investigación.

Al Dr. Agustín López Herrera, por su disponibilidad y observaciones en la revisión de la tesis y por su valioso apoyo académico

Al Dr. Guillermo Zárate de Lara por su valiosa colaboración en la realización de la tesis, por su apoyo incondicional y por su aliento a seguirme superando,

Al Dr. Gerardo González de la Cruz, por su apoyo en la realización de la presente investigación y apoyo en la revisión.

Al Dr. Mateo Cadena, por su colaboración para la mejora del presente escrito.

A Mony, Juan y Alejandro por su ayuda y apoyo en cada paso de este proceso de superación.

Al Personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia por su valiosa ayuda en el laboratorio.

Al Personal de la Coordinación de Postgrado, por todo el apoyo recibido durante la realización de mis estudios de postgrado.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron en la realización de este trabajo y que involuntariamente no mencioné.

DEDICATORIA

A Dios.

A Jesús Silverio⁺ por ser un sueño en mi vida.

A Carlos Roberto por ser la luz que siempre me ilumina.

A Guillermo por ser la mano que me levanta, el hombro que me soporta y la esperanza en el amor.

A mis Padres Clement y Jesús⁺, por ser siempre un ejemplo de paciencia y voluntad y por todas sus bendiciones.

A mis Hermanos, por ser siempre un apoyo a lo largo de mi vida

A mis Amigos donde quiera que estén, por sus valiosos consejos y amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora del presente trabajo Ma. Del Consuelo Sánchez Enciso, es originaria de Texcoco, Estado de México. Realizó estudios de Licenciatura en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Obtuvo el grado de Maestro en Ciencias en el Instituto de Fitopatología del Colegio de Postgraduados. Colaboró en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Pecuarias y Forestales como Investigador, y en la Universidad Autónoma Chapingo como Profesor Investigador. Posteriormente realizó sus estudio de Doctorado en ciencias en Horticultura, en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la UACh.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Valor nutricional de la papa	8
2.2. Semilla botánica de papa	12
2.3. Semilla tubérculo de papa	14
2.4. Producción de semilla de papa	18
2.5. Producción de microtubérculos <i>in vitro</i>	23
2. 6. Almacenamiento	25
2.7. Cultivo de tejidos vegetales en papa	26
2.8. Totipotencia celular	27
2.9. Formación de callo	28
2.10. Formación de callo en papa	29
2.11. Embriogénesis somática	31
2.12. Embriogénesis somática en papa	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Localización	43
3.2. Explantes	43

	Página
3.3. Medios de cultivo	44
3.4. Embriogénesis somática directa	45
3.5. Embriogénesis somática indirecta	46
IV. RESULTADOS	49
4.1. Embriogénesis somática directa	49
4.2. Embriogénesis somática indirecta	56
4.3. Germinación	69
4.4. Contaminación	70
V. DISCUSION	72
5.1. Embriogénesis somática directa	72
5.2. Embriogénesis somática indirecta	75
5.3. Germinación	79
5.4. Contaminación	83
VI. CONCLUSIONES	86
VII. LITERATURA CITADA	89
VIII. ANEXOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Agregados celulares de color verde en el mesófilo de hojas de papa cultivar Fritolay-1867	50
2	Estructuras embrionarias globulares de color verde brillante a los 35 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.	50
3	Embriones oblongos de color verde amarillento a los 45 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.	51
4	Embriones maduros de diferentes tamaños de color verde oscuro y café claro a los 60 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.	52
5	Plantas de papa obtenidas a partir de embriones somáticos de explantes de mesófilo de hoja de papa cultivar Fritolay-1867, a las nueve semanas.	53
6	Promedio de embriones registrados de la quinta a la novena semanas posteriores a la siembra de explantes de mesófilo de hojas de papa cultivar. Fritolay-1867.	54
7	Regresión cuadrática para el número promedio de embriones obtenidos a partir de la quinta a la novena semanas de incubación de explantes de mesófilo de hoja de papa cultivar Fritolay-1867.	55

Figura		Página
8	Explantos de hipocótilo de papa de la cultivar Atlantic con agregados celulares los siete días de incubación.	57
9	Explantos de hipocótilo con inicio de masa callogénica compacta y verde blanquecino, cultivar Atlantic.	57
10	Masa callogénica de consistencia compacta y coloración verde intenso a los 35 días de incubación, cultivar Atlantic.	58
11	Callos a los 63 días de incubación de consistencia friable y coloración amarillo translúcidos, cultivar Atlantic.	58
12	Determinación de peso fresco de los callos a los 63 días de incubación en oscuridad, cultivar Atlantic.	59
13	Callos de 71 días de consistencia friable y coloración café claro, en medio con concentración baja de 2,4-D ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cultivar Atlantic.	59
14	Peso promedio de peso fresco de callos, cultivar Atlantic, que no formaron embriones, a los 8, 15 y 21 días creciendo en medios de cultivo con y sin 2,4-D.	60
15	Peso promedio de peso fresco de callos, cultivar Atlantic. que si formaron embriones, a los 8, 15 y 21 días creciendo en medios de cultivo con y sin 2,4-D.	61

- | | | |
|----|--|----|
| 16 | Callos de 135 días, consistencia friable y color café, con protuberancias redondeadas de coloración verde translúcido, cultivar Atlantic. | 62 |
| 17 | Embriones en diferentes etapas de desarrollo a los 150 días de incubación, cultivar Atlantic. | 62 |
| 18 | Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante ocho días, cultivar Atlantic. | 63 |
| 19 | Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 21 días, cultivar Atlantic. | 64 |
| 20 | Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 15 días, cultivar Atlantic | 65 |
| 21 | Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante ocho días, cultivar Atlantic. | 66 |
| 22 | Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 21 días, cultivar Atlantic. | 66 |

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro* EN PAPA
(*Solanum tuberosum* L.) cvs. ATLANTIC Y FRITOLAY-1867

SOMATIC EMBRYOGENESIS *in vitro* IN POTATO
(*Solanum tuberosum* L.) cvs. ATLANTIC AND FRITOLAY-1867

Ma. del Consuelo Sánchez-Enciso¹ y José Luis Rodríguez de la O²

RESUMEN

Con el objetivo de establecer las condiciones de medios de cultivo que permitan obtener embriogénesis *in vitro*, y caracterizar los eventos morfológicos y de desarrollo que condujeran hasta la formación de embriones somáticos de papa de las variedades Fritolay-1867 y Atlantic, así como la germinación hasta la obtención de plantas completas, se evaluaron los efectos del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Thidiazuron, Kinetina, ácido giberélico (GA₃), L-Glutamina y ácido abscísico (ABA), como los reguladores de crecimiento y promotores de la embriogénesis somática en papa. Los resultados permitieron observar la formación de los embriones a partir de hipocótilos vía formación previa de callos embriogénicos en el cultivar Atlantic, y por mesófilo de hojas vía directa en el cultivar Fritolay-1867. El efecto del 2,4-D, el Thidiazuron y la Kinetina, fueron favorables durante el proceso de formación de callos, los cuales presentaron diferentes características morfológicas de acuerdo a su capacidad embriogénica observada, como: consistencia compacta y textura friable, coloración café a café oscuro, peso fresco de 0.1338 g ; a los 135 días se promovió la formación de 17 embriones en la superficie de estos callos, y a los 170 días los embriones maduros iniciaron su germinación. Cuando se obtuvieron embriones por vía directa, tanto el Thidiazuron como el ácido giberélico fueron los que presentaron un efecto sobre la maduración y germinación de embriones hasta la obtención de plántulas completas.

Los resultados obtenidos establecen que en la obtención de embriones somáticos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. tanto por embriogénesis somática directa, como indirecta, depende del cultivar. Sin embargo, es necesario uniformizar las respuestas para optimizar el proceso de conversión y aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*.

Palabras Clave: Embriones somáticos, Thidiazuron, Kinetina, 2,4-D, ácido giberélico.

ABSTRACT

In order to establish the optimal media conditions to produce embryogenesis *in vitro* and also to characterize the morphological and developing events that lead to somatic embryos, germination and finally to the production of new potato plants for the Fritolay-1867 and Atlantic potato cultivars, the effect of grow regulators and embryogenesis promoters such as 2,4dichlorophenoxyacetic acid (2,4D), Thidiazuron, Kinetina, giberelic acid (GA₃), L-Glutamina and abscisic acid (ABA) were evaluated. The production of embryos from stem-internodes, going first through the embryogenesis callus stage for the Atlantic cultivar and through leaf sections directly for the Fritolay-1867 cultivar, was observed. A favorable effect for 2,4D, Thidiazuron and Kinetina during the callus stage was obtained. The callus had different morphological characteristics according to their embryogenic aptitude, such as: compact consistency, friable texture, brown to dark brown coloration and fresh weight of 0.1338 g. After 135 days, 17 embryos were promoted on the callus surface and later on, when 170 days were completed, the mature embryos start germinating. When the embryos were directly obtained, both the Thidiazuron and giberelic acid had an effect through the maturation and germination of the embryos and finally the production of new plants. The results allow us to claim that the production of somatic embryos *in vitro* for *Solanum tuberosum* L., either through direct or indirect somatic embryogenesis, strongly depends on the specific cultivar. However, it is necessary to standardize the responses to optimize the conversion and adaptation processes of *in vitro* plants.

Key words: Somatic Embryos, Thidiazuron, Kinetina, 2,4-D, giberelic acid.

¹ Tesista

² Director

Figura**Página**

- | | | |
|----|---|----|
| 23 | Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L ⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 15 días, cultivar Atlantic. | 67 |
| 24 | Germinación de los embriones a los 170 días de incubación, cultivar Atlantic. | 69 |
| 25 | Plantas de papa obtenidas de embriones somáticos de explantes de hipocótilo de papa cultivar. Atlantaic, a las 21 semanas de incubación. | 69 |

I. INTRODUCCION

La papa es un cultivo importante en todo el mundo, y es parte integral de la dieta alimenticia de una gran porción de la población mundial (Miller y Lipschutz, 1984). Constituye en la actualidad el cuarto cultivo más importante después del trigo, maíz y arroz, y su producción anual representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos. El producto llega a más de mil millones de consumidores de todo el mundo; actualmente 500 millones de consumidores en los países en vías de desarrollo, cuya dieta básica incluye la papa (FAO, 1999 citado por Moré *et al.*, 2000).

En México el consumo anual *per capita* de papa es de 12.3 Kg, que comparado con el de otros países como Estados Unidos (58.4 Kg) o de Holanda (85.8 Kg), resulta relativamente bajo. La papa ocupa el 6° lugar de importancia como alimento del pueblo Mexicano (Hernández *et al.*, 2001).

El aumento en la producción mundial de papas, se ha basado más en un mejoramiento productivo que en una ampliación de la superficie destinada a esta especie. Se estima que entre los productos agrícolas, el cultivo de la papa es el que tiene el mayor potencial de crecimiento, ya que los rendimientos obtenidos están lejos de alcanzar su potencial máximo, incluso en algunos países desarrollados (De Amesti, 2000). De acuerdo a los datos proporcionados por la FAO (2000) citado por Hernández *et al* (2001), en México la superficie nacional sembrada con papa se incrementó de 47,000 ha en 1963 a 73,900

ha en el año 2000 y el rendimiento nacional medio aumentó en el mismo período de 8 ton/ha a 21.5 ton/ha.

El cultivo es de gran valor alimenticio, por la producción de proteína por unidad de tiempo y superficie, y por la producción de energía. Su proteína es particularmente valiosa debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales de los cuales se han identificado unos veinte, sobre todo el ácido aspártico, el ácido glutámico, la asparagina, la glutamina y la atginina, los cuales no son comunes en las proteínas de otras plantas. En ello se asemeja a la proteína de la leche y es sobresaliente la forma en que se complementa con otras proteínas como la de la soya (Estrada, 2000; Rousselle *et al.*, 1999). Este cultivo provee al menos 12 vitaminas esenciales, incluyendo altas cantidades de vitamina C, minerales y también proporciona cantidades significativas de hierro y carbohidratos (Miller y Lipschutz, 1984).

Existen siete especies de cultivares de papa, incluyendo diploides (*Solanum ajanhiuri*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*), triploides (*S. x chautauca*, *S. x juzepczukii*), tetraploides (*S. tuberosum ssp. tuberosum*, *S. tuberosum spp. Andigena*), y una pentaploide (*S. x curtilobum*) (Hawkes, 1978b). *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* es la especie de papa que se cultiva en el Hemisferio Norte. Es ampliamente sostenido que la subespecie *tuberosum* evolucionó de *andigena* a través de selección artificial, más tarde fue introducida a Europa a finales del siglo dieciséis. El origen de *spp. andigena* es en la parte central de los Andes, Sur de Bolivia y Norte de Perú, en Sudamérica (Hawkes, 1978a). Esta subespecie fue adaptada a fotoperíodo corto, por lo que no producía durante los días largos de verano en Europa; de tal forma que selecciones para

líneas precoces fueron para algunos, el resultado en los cambios graduales de la subespecie andigena a la subespecie tuberosum. Otros autores como Lewis (1966), sugirieron que los cambios ocurrieron después de las epifitias del tizón tardío durante los años de 1840, donde declinó el cultivo de la papa en Europa y Norte de América, obligando a una intensiva selección para resistencia a éste patógeno. Recientemente, Grun (1979) citado por Miller y Lipschutz (1984), sugiere que los cultivares de papa actuales pueden ser derivados de *S. tuberosum spp tuberosum*, de la región costera de Centro y Sur de Chile. Él encontró que los factores citoplásmicos (genes citoplásmicos) de papa fueron muy similares a los biotipos chilenos de *spp tuberosum*, pero fuertemente diferentes de los de *spp andigena*.

La utilización de tubérculos como semilla, presenta una serie de desventajas entre las que se encuentran: la necesidad de utilizar grandes áreas para su producción, insuficiencia de semillas de buena calidad, la transferencias de virus, elevados costos de importación de semilla élite, transporte, almacenamiento y refrigeración (Cárdenas, 1989).

La eficiencia en todas las fases de la producción de tubérculo-semilla, con la finalidad de reducir el costo unitario, puede requerir mas que el aumento en la productividad, corregir ineficiencias en la planificación, almacenamiento y comercialización. El valor de un sistema bien organizado de semilla no debe medirse únicamente por las ganancias en producción, sino que también hay que considerar otros aspectos como la estabilidad de la producción, la disminución de riesgos de diseminación de plagas y enfermedades, y la capacidad de un país para responder por medio del mejoramiento genético y la

biotecnología, a las exigencias de mercados globalizados, cambios climáticos inducidos e intensificación de la agricultura (Ezeta, 1999).

Al almacenar la semilla de papa debe proporcionarse a los tubérculos las condiciones ambientales y de manejo necesarias que permitan mantener su buen estado fisiológico, y minimizar las pérdidas de peso y calidad. Durante el almacenamiento se presentan cambios en la composición del tubérculo que manifiestan cuantitativa o cualitativamente la diferencia entre el producto que entra al almacén y el que sale para la siembra. Durante este período se producen pérdidas básicamente por brotación, evaporación, respiración y pudriciones causadas por microorganismos y daños de insectos, roedores y otras plagas. El almacenamiento adecuado de la semilla, entre otros aspectos, debe suprimir la dominancia apical y proporcionar el desarrollo de brotes en cantidad suficiente (Alcalá *et al.*, 1990). Una de las alternativas de solución es la utilización de semilla botánica. Sin embargo, el resultado de emplear semilla botánica también representa varios problemas, siendo los principales el desarrollo raquíptico de las plántulas y los tubérculos son de menor tamaño; además, se tienen problemas de polinización y cuajado de fruto lo que hace difícil la producción de semilla botánica.

Lo anteriormente expuesto, indica la necesidad de considerar otras alternativas, y una solución es la producción y utilización de semillas sintéticas o artificiales obtenidas mediante técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. En este proceso se utilizan explantes de embriones cigóticos u otros tejidos vegetales potencialmente embriogénicos, a partir de los cuales es posible lograr la obtención de callos, o no necesariamente, y posteriormente

inducir la formación de embriones somáticos, los cuales después de ser encapsulados pueden ser utilizados como cualquier semilla botánica (Cárdenas, 1989).

El uso de propágulos derivados de tejidos genéticamente uniformes, manipulados para poseer cualidades de manejo similares a las de las auténticas semillas podría ser ventajoso. El potencial de aplicación de las semillas sintéticas incluye: a) producción a gran escala de genotipos excepcionales para especies autoincompatibles que se propagan vegetativamente con dificultad; b) producción de semillas genéticamente uniformes para cultivos altamente heterocigóticos que generalmente se propagan mediante multiplicación vegetativa; c) propagación de nuevos genotipos producidos por ingeniería genética que son meióticamente inestables; d) comercialización y mantenimiento de germoplasma en el que se ha introducido inestabilidad meiótica; y e) mantenimiento de líneas puras parentales (Ortega, 1993).

En 1975, Lam reporta la inducción de cuerpos embrionarios y brotes de callos de tubérculos de papa, creciendo en un medio conteniendo sales de Murashige y Skoog (1962), complejos orgánicos de Nitsch, sacarosa, caseína hidrolizada (CH), ácido indolacético (IAA), ácido giberélico (GA), kinetina (KIN) y 6-benzylaminopurina (BA). La adición de BA a estos medios fue esencial para la inducción de brotes de embriones somáticos, sin embargo, los brotes que fueron producidos fueron anormales, y el medio fue subsecuentemente refinado para permitir la producción de plantas normales.

Las primeras modificaciones involucraron a los reguladores de crecimiento, así las concentraciones de IAA y KIN fueron incrementadas, añadiéndose ácido naftalenacético

(NAA) y zeatina (ZEA). La adición de GA a los medios de cultivo fue requerida para el desarrollo y elongación de brotes, y su ausencia estimula la producción de estructuras parecidas a nódulos que usualmente no desarrollan más que en la superficie de los callos (Miller y Lipschutz, 1984).

La inducción de la variación somaclonal *in vitro* utilizando cultivos de callos de papa, puede tener la capacidad de estudiar un gran número de aspectos morfológicos de este cultivo. Esta tecnología puede también ser aplicada a programas de mejoramiento para resistencia a enfermedades y finalmente, a partir de la embriogénesis somática, presenta una nueva oportunidad para la disminución de la variabilidad genética y el desplazamiento de variedades tradicionales debido a la introducción de variedades de alta productividad (Miller y Lipschutz, 1984).

Muchas plantas son estériles y no retienen a la semilla, por lo que la embriogénesis somática puede ser en muchos casos una forma de propagación para éstas plantas. Otras plantas, particularmente algunas especies tropicales, producen semillas recalcitrantes que no pueden ser conservadas en seco. Por lo tanto, el almacenaje por largos períodos de tiempo de estas especies en bancos de semillas no es actualmente posible. La embriogénesis somática y la formación de semilla sintética pueden ser una alternativa que permitirá el almacenaje por largo tiempo de muchas especies (McKersie, 1996). Tomando en cuenta que semilla artificial se define como, embriones somáticos encapsulados en una cubierta protectora, los cuales pueden ser producidos a bajos costos bajo un sistema de propagación en un volumen alto; así las ventajas inherentes de las semillas sintéticas son la producción de un gran número de embriones clonados y el

objetivo es el producir “semilla” clonada a un costo comparable al de semillas verdaderas (Jo Ann *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

- Establecer las condiciones *in vitro* que permitan obtener la embriogénesis somática en explantes de mesófilo de hoja y de hipocotilos de *Solanum tuberosum* cvs. Atlantic y Fritolay-1867.
- Evaluar la influencia de medios de cultivos, tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento que promuevan la obtención de embriones somáticos *in vitro*, así como su germinación hasta la obtención de plantas completas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Valor nutricional de la papa

La papa es un tubérculo cuyo valor nutritivo ha sido subestimado. La mayoría de la gente la considera como un alimento nutritivamente pobre. Esto es falso, ya que ésta aporta más nutrientes que energía al organismo, debido a que la papa es:

1. Una fuente de vitaminas, proveyendo cerca de 40% de la dosis diaria recomendada para la vitamina C. También contiene vitaminas del complejo B.
2. Rica en algunos minerales, como el potasio.
3. Una fuente de fenoles, compuestos que pueden tener un papel importante en la salud.
4. Virtualmente libre de grasa
5. Casi libre de azúcares solubles.
6. De baja densidad energética - la papa "llena" con muy pocas calorías. Una toma diaria de 150 -300 g de papa proporciona solo 4 - 8% de las calorías requeridas por un adulto.
7. Rápidamente digerible.
8. Una fuente de proteína de alta calidad, así sea deficiente en metionina, que es un aminoácido esencial.

9. La materia seca representa casi 24% de su peso; el resto es agua.

(Lister y Monro, 2000).

Su calidad nutricional puede mejorarse si se incrementan los niveles de aminoácidos esenciales como la glicina, beta-caroteno (un precursor de la vitamina A) y de otros antioxidantes, los glicoalcaloides pueden ser removidos o limitados (Lister y Monro, 2000). Los nutrientes de la papa son controlados en su gran mayoría por los genes, sin embargo, la interacción de estos con la edad y la madurez de los tubérculos, el clima, el suelo y las prácticas culturales realizadas durante su cultivo, almacenamiento y procesamiento, son factores que también tienen un efecto sobre los nutrimentos (Espinola, 2001).

Carbohidratos. La mayor parte de la materia seca del tubérculo se encuentra en forma de almidón, azúcares y polisacáridos no almidones. El 75% de la materia seca de la papa esta compuesta por almidón; cuando la papa se consume caliente, el almidón es rápidamente digerido por el organismo; si se consume fría, la digestibilidad del almidón se reduce.

Compuestos de Nitrógeno. Constituyen el segundo componente de la papa, con 3 a 15% de la materia seca (estos se incrementan con la madurez del tubérculo). Cerca de la mitad del total del nitrógeno en la papa se deriva de las proteínas. La calidad de las proteínas es alta (aunque es deficiente en metionina, un aminoácido esencial) y su cantidad es comparable con la del arroz y trigo. El valor de la proteína no se afecta significativamente al cocinar la papa.

Lípidos. El porcentaje de lípidos o grasa cruda en la papa "en fresco" es muy bajo. Las variedades de papa pueden desarrollarse con un determinado color con el fin de que absorban la menor cantidad de grasa durante el proceso de fritura o para que se haga un mejor uso de los productos de desecho.

Vitaminas. La papa contiene cantidades significativas de vitamina C (ácidos ascórbico y dehidroascorbico), además de otras vitaminas hidrosolubles, como tiamina y vitamina B6; las vitaminas solubles en aceite están presentes en pequeños trazos. Una papa cocinada pierde entre 18-24% de vitamina C a través de su cáscara; sin ella, la pérdida puede estar entre 35% - 50%. Aun así, la cantidad de vitamina C que queda luego de cocinarla es alta, y una porción de 150 g de papa provee cerca de 40% de los requerimientos diarios de esta vitamina.

Minerales. Posee potasio, especialmente en la cáscara, y cantidades moderadas de fósforo, cloro, azufre, magnesio y hierro.

Fenoles. La papa contiene un bajo porcentaje de compuestos fenólicos, la mayoría de los cuales se encuentra en la cáscara. Algunos de estos compuestos pueden ser destruidos durante la cocción, pero esto aun no esta bien documentado. Los fenoles afectan el ennegrecimiento de la papa. Las reacciones de aminoácidos y proteínas con carbohidratos, lípidos y fenoles oxidados, causan un deterioro de los alimentos durante su almacenamiento y procesamiento. Fuera de esto, hay una perdida de calidad nutricional y de seguridad, pues se producen compuestos tóxicos. Contrariamente,

algunos productos resultantes de la reacción de ennegrecimiento pueden tener efectos benéficos, como por ejemplo los antioxidantes.

Glicoalcaloides. Por otra parte, la papa puede también contener glicoalcaloides en su interior (frecuentemente encontrados en tubérculos verdes), aunque se ha reportado que grandes cantidades de glicoalcaloides pueden causar intoxicación en humanos. Sin embargo, el sabor amargo que le dan estos compuestos a la papa, actúa como un aviso para que no se siga consumiendo (Lister y Monro, 2000). Cuando se han analizado familias y/o clones que provienen de semilla sexual (TPS), se ha detectado material con altos contenidos de glicoalcaloides, estos son la solanina y chaconina y se les conocen con estos nombres por ser alcaloides unidos a moléculas de azúcares (glucosa, galactosa y ramnosa). Aunque estos compuestos existen en forma natural en el tubérculo, sus concentraciones podrían aumentar si las plantas son sometidas a diferentes situaciones de estrés, lo que se manifiesta en el sabor amargo de las papas. Por lo anterior se debe tener cuidado al reorientar la selección de material que provengan de semilla sexual, evitando de esta manera la introducción de material con riesgo de elevar sus niveles y presentar sabor amargo. El problema, aparte de éste sabor, es el riesgo de toxicidad.

La literatura reporta que el exceso de luz puede elevar los niveles de glicoalcaloides. Una de las razones para transportar la papa en sacos es precisamente evitar la exposición a la luz durante el trayecto comprendido entre el campo y el almacenaje o mercado. Sin embargo, es muy común observar que la papa con cáscara roja se comercializa sin tener precauciones en este aspecto, porque existe la creencia que el color protege al tubérculo

de la luz. El resultado de esta práctica son tubérculos con pulpa de color verdoso, debido al aumento de la clorofila y el incremento de los glicoalcaloides (Espinola, 2001).

Factores como la variedad, prácticas culturales y el clima, inciden en los niveles de glicoalcaloides. Los tubérculos no detienen la producción de glicoalcaloides después de ser cosechados y un manejo inapropiado puede causar un aumento de estos compuestos. El porcentaje de glicoalcaloides puede ser especialmente alto en papas verdeadas o dañadas. La cocción no altera sus niveles pero si la papa es rebanada o pelada, estos disminuyen dramáticamente pues en la cáscara es donde se concentran los glicoalcaloides en mayor concentración (Lister y Monro, 2000). Los niveles de alcaloides sobre 20 mg/100 g se consideran inseguros para el consumo humano, los efectos principales son irritación del aparato gastrointestinal y debilitan el sistema nervioso, que se manifiestan en dolor de cabeza, vómito, diarrea y dolor abdominal, así como síntomas neurológicos de apatía, somnolencia, estupor, confusión, alucinaciones, vértigo, temblores y debilitación visual (Anónimo a, s/a).

2.2. Semilla botánica de papa

Durante siglos el ser humano ha propagado la papa sembrando el tubérculo, o partes del mismo que tienen “ojos” de los cuales se originan más adelante los retoños. Estas partes son llamadas comúnmente “semilla de papa”. Este nombre puede ser confuso debido a que obviamente estos no son semillas de papa, por lo que se les ha denominado como “tubérculos de semilla” (Price, 2000).

El fruto de la planta de papa corresponde a una baya, la cual puede presentar una forma redonda, alargada, ovalada o cónica; su diámetro generalmente fluctúa entre 1 y 3 cm, y su color puede variar de verde a amarillento o de castaño rojizo a violeta. Las bayas presentan dos lóculos y pueden contener aproximadamente entre 200 y 400 semillas. Las semillas son muy pequeñas, aplanadas, de forma arrañada y pueden ser blancas, amarillas o castaño amarillentas (Anónimo b, s/a).

Las semillas botánicas de papa son levemente más pequeñas que las semillas de tomate y requieren, por lo tanto, mucho menos espacio; además es tan liviana y fácil de transportar que los costos de envío son muchos más bajos que el de los tubérculos convencionales. Fuera de los elevados costos de transporte, los tubérculos de semilla se golpean y dañan fácilmente durante la cosecha y el transporte (Anónimo c, s/a).

A medida que se siembran los tubérculos de la papa y éstos son cosechados, almacenados y resembrados año tras año, se desarrollan enfermedades en el tubérculo; el resultado es que el rendimiento de la papa disminuye con el tiempo (Price, 2000). La semilla botánica de papa en sí está libre de todas las enfermedades importantes de la papa. También mantiene su vigor por varios años, cuando se almacena bajo condiciones propicias, a diferencia de las tradicionales papas de tubérculo de semilla, que pueden pudrirse fácilmente o ser comidas por roedores (Anónimo c, s/a).

Los tubérculos de semilla de papa están inactivos (en dormancia) por varios meses después de que han sido cosechados, las semillas botánicas no tienen problemas con

estar en dormancia, están siempre listas para germinar cuando se les proporcione los medios apropiados (Anónimo c, s/a).

Por todas las razones arriba expuestas existen algunas empresas que empezaron a producir semilla de papa (botánica) libre de enfermedades, sin embargo, se toparon con algunos problemas que les impidió cultivar papa de semilla botánica, al igual que con otras hortalizas. Una de las principales razones ha sido que la semilla botánica de papa presenta una gran variabilidad genética. Así la compañía conocida como ECHO distribuyó en Estados Unidos la primera semilla botánica de papa llamada “Papa Explorer”, donde se encontró que había una gran variabilidad entre las plantas en términos de tipo, tamaño, color de la cáscara, forma de tubérculos, tamaño de la planta, días necesarios hasta alcanzar la madurez y calidad al cocinarla. De hecho se requerían de 180 días para producir una cosecha. Por lo anterior ésta compañía recomienda usar ésta semilla sólo como un inicio para obtener tubérculos de semilla libres de enfermedades, o como parte de un esfuerzo por encontrar una papa que se adapte mejor a una región determinada (Price, 2000).

2.3. Semilla tubérculo de papa

A nivel comercial, la papa se propaga vegetativamente por medio del tubérculo al cual se le da el nombre genérico de semilla, lo que permite mantener su constitución genética inalterable; sin embargo, existen otras formas de propagación por medio de semilla sexual o por partes vegetativas como esquejes, brotes y meristemos (Peña, 2000).

El tubérculo semilla es el órgano responsable de dar origen a una nueva planta y de su calidad depende en gran parte el rendimiento final. El concepto de calidad de semillas, incluye tanto el grado de sanidad como su estado fisiológico, por consiguiente, es necesario tomar todas las medidas posibles de protección durante la cosecha, la clasificación y el almacenamiento, con el fin de mantener al máximo el potencial de rendimiento de la semilla.

La semilla es el insumo más importante en cualquier proceso de producción, donde la condición básica para obtener niveles de productividad elevados es lograr que los tubérculos semilla, alcancen el estado de brotación mas adecuado al momento de la siembra; por lo tanto, las prácticas de manejo de poscosecha que se realicen con estos, se deben concentrar en aquellos factores y condiciones que influyen en el desarrollo de brotes vigorosos, que luego dan origen a tallos fuertes y libres de enfermedades. En general, es necesario considerar dos factores estrechamente ligados con la emisión de brotes:

1. El cultivar de papa es responsable de la duración del periodo de reposo.
2. La edad fisiológica del tubérculo semilla, la cual depende de las condiciones de almacenamiento a las cuales ha sido sometida la semilla (Anónimo a, 2000).

Durante el desarrollo fisiológico, el tubérculo pasa a través de los estados de reposo o dormancia, dominancia apical, brotación múltiple y senectud. La dormancia es el estado durante el cual los tubérculos no brotan, aun bajo condiciones ambientales favorables, que en otras circunstancias serian favorables para una brotación rápida; la duración de

este periodo es un factor determinante para definir el momento mas oportuno para la siembra. Es importante resaltar el riesgo que significa sembrar tubérculos que no hayan concluido su dormancia puesto que las plantas pueden emerger en forma irregular, con un solo tallo o tubérculos que se pueden desintegrar en el suelo antes de emerger, ocasionando con ello el fracaso del cultivo.

Las condiciones en las cuales se producen los tubérculos-semillas afectan la duración del periodo de dormancia, por ejemplo, las temperaturas altas, el bajo contenido de humedad y la baja fertilidad de un suelo durante el crecimiento del tubérculo, aceleran el desarrollo fisiológico y la reducción en el periodo de dormancia (Peña, 2000).

La senectud puede ser retardada, produciendo y almacenando tubérculos-semillas a temperaturas bajas. Los tubérculos producidos durante una temporada cálida del cultivo, alcanzan el estado de senectud más rápido que los producidos durante una temperatura fría.

El tamaño del tubérculo juega un papel muy importante en la producción de tallos, la semilla grande produce tallos más vigorosos y por consiguiente tienen mas ventajas que la semilla pequeña bajo condiciones adversas de suelo y ambiente, como sequía y heladas; pero el costo de semilla, por hectárea, se eleva debido a que la cantidad que se utiliza es el doble de la semilla pequeña. Así, por ejemplo al sembrar una densidad de 30,000 plantas por ha se necesita de 3 toneladas de semilla de tamaño de primera (tubérculos de mas de 100 g) y 1.99 tonelada de semilla pequeña (Peña, 2000).

La temperatura de almacenamiento ejerce una gran influencia sobre el potencial de producción del tubérculo-semilla. Las temperaturas altas de almacenamiento favorecen el crecimiento de los brotes, mientras que las temperaturas bajas lo retardan. Las temperaturas entre 10 y 20 °C parecen ser óptimas para el crecimiento de los brotes; sin embargo, para almacenar papa la temperatura debe ser menor. La humedad relativa estimula la formación de raíces en los brotes. En condiciones de alta temperatura, una humedad relativa alta estimula el crecimiento de los brotes.

La luz es uno de los factores que mas efecto tienen en la velocidad de crecimiento y vigor de los brotes. La clorofila y la solanina que se producen en los tubérculos sometidos a la acción de la luz solar, impiden la penetración de algunos microorganismos patógenos. Una semilla que se almacene en una bodega donde penetre la luz solar, da como resultado brotes vigorosos y resistentes a la penetración de hongos patógenos como *Rhizoctonia* y *Fusarium*; por el contrario, una semilla almacenada en una bodega oscura produce brotes largos y débiles que son muy susceptibles al daño mecánico y pudriciones.

El tubérculo en almacenamiento, necesita de cierta disponibilidad de oxígeno para poder respirar, por tal razón cuando el CO₂ producido en el proceso de respiración se acumula en una bodega sin circulación de aire, llega a ser perjudicial para la semilla en razón a que se presentan pudriciones por efecto de hongos y bacterias (Peña, 2000).

2.4. Producción de semilla de papa

En las últimas dos décadas la producción de semilla de papa en Latinoamérica ha experimentado notables avances gracias al desarrollo de los métodos de multiplicación rápida, utilizando secciones de tallo enraizadas o plántulas *in-vitro* multiplicadas masivamente, y en las técnicas de eliminación de patógenos por medio del cultivo de meristemo y termoterapia (Ezeta,1999).

a) Calidad de la semilla

Para muchos agricultores el tamaño de la semilla es un criterio muy importante por su relación con el costo unitario o por la exigencia de la siembra mecánica. Otros dan mucho valor a la procedencia de la semilla identificando la calidad con la localidad de producción. En algunos casos se considera la apariencia externa del tubérculo, estado de conservación, brotamiento y presencia de síntomas visuales de plagas y enfermedades. En realidad todas estas observaciones son apreciaciones parciales de un concepto integral de calidad que incluye dos grandes grupos de factores relacionados a la fisiología y a la sanidad. Estos factores tienen íntima relación con las condiciones climáticas del lugar de producción, con el proceso productivo mismo y con el manejo poscosecha de la semilla.

La relación entre el estado fisiológico y el potencial productivo es bien conocida. La semilla producida en climas fríos exhibe una curva de crecimiento más amplia y un mayor potencial productivo que la semilla producida en climas cálidos. El concepto de edad fisiológica fue introducido para explicar este comportamiento diferencial de la

semilla por su grado de juvenilidad o envejecimiento fisiológico. Algunos otros factores ambientales y de manejo de la producción y la poscosecha modifican la edad fisiológica de la semilla y consecuentemente su precocidad y productividad. Entre los factores que inducen al envejecimiento fisiológico en la producción están el fotoperíodo de días cortos y la alta temperatura, el déficit hídrico y la baja fertilización nitrogenada de las plantas madre y principalmente la alta temperatura durante el almacenamiento. Los tratamientos con hormonas y reguladores de crecimiento también influyen sobre la edad fisiológica de la siguiente generación (Ezeta, 1999).

La sanidad también guarda estrecha relación con los factores climáticos y ambientales de los centros de producción. Los mejores lugares para la multiplicación son aquellos que por sus condiciones climáticas severas y por su aislamiento de otros cultivos permiten producir semilla bajo la mínima presión de infección de enfermedades transmitidas por diversos vectores, de los cuales los mas conocidos son los áfidos. Estas condiciones se consiguen en regiones de mayor latitud o por medio de la altura en los países situados en los trópicos. En América Latina se presentan ambas situaciones, Argentina y principalmente Chile presentan condiciones excepcionales para la multiplicación de semilla en sus regiones australes. Los países andinos recurren a las zonas altas para producir sus semillas e igualmente sucede en varios países centroamericanos. En México así como en Argentina se utilizan ambos recursos, es decir la altura y la latitud (Ezeta, 1999).

Las óptimas condiciones climáticas deben ser complementadas con adecuadas prácticas productivas y conveniente manejo poscosecha. La sanidad depende también de las

prácticas agronómicas, desde la selección del campo, de la semilla, el descarte de plantas atípicas o con síntomas de enfermedades, el control de plagas y enfermedades durante el crecimiento, y la cosecha oportuna y selección antes del almacenamiento en condiciones adecuadas (Ezeta, 1999).

b) Multiplicación de semilla

Cabe mencionar que en México existen programas formales de producción de semilla certificada principalmente para las variedades Alpha, Mondial, Atlantic y Gigant, con las que se abastece 20 % de los requerimientos de semilla a nivel nacional y el resto es sembrado con material de dudosa calidad fitosanitaria, varietal y fisiológica. Sin embargo, las variedades nacionales sembradas en 26 % de la superficie, no se encuentran inscritas en programas de certificación. La falta de semilla de buena calidad ha sido uno de los factores que han contribuido a que la superficie sembrada con variedades mexicanas haya disminuido desde 40 % de la superficie nacional en la década de los ochenta hasta 26 % en los últimos años (Hernández *et al.*, 2001).

Hasta hace ocho años gran parte de la semilla sembrada en México provenía de semilla importada de otros países (Canadá y Holanda principalmente), la cual era reproducida hasta por cinco generaciones y luego renovada. Sin embargo, de 1992 a 1995 se cancelaron las importaciones de semilla y los agricultores más importantes se vieron obligados a establecer sistemas propios que les permitieron auto-abastecerse de semilla de buena calidad sin tener que recurrir a las importaciones. La prohibición de las importaciones durante tres años, estimuló la capacidad productiva de semilla de papa en

México y así mismo, hizo adquirir conciencia a agricultores e investigadores de los problemas que se tienen en la producción de semilla de papa y del potencial que se tiene para resolverlos. La propagación de semilla por esquejes y por minitubérculos se ha ido incrementando desde entonces, hasta que en la actualidad se tienen diez laboratorios de cultivo de tejidos y 17 invernaderos especializados para la producción de minitubérculos. Con esta infraestructura instalada se estima que es posible abastecer la mayor parte de las necesidades de semilla a nivel nacional, sin embargo, se sigue teniendo el problema de la alta tasa de degeneración de la semilla (principalmente por hongos del suelo, virus, punta morada y *Paratrioza cockerelli*) cuando la semilla reproducida en invernaderos es sacada al campo. El modelo básico de multiplicación rápida consiste en la producción de minitubérculos a partir de esquejes enraizados y transplantados a macetas o almácigos con substrato esterilizado. (Hernández *et al.*, 2001).

c) Debilidades en los sistemas de producción de semilla

Aunque existen grandes diferencias entre los países latinoamericanos hay un número de debilidades que aparecen en diferente grado de intensidad. A continuación se presenta una lista de las más frecuentes.

- Incumplimiento de leyes y reglamentos de producción de semilla.
- Obsolescencia o inaplicabilidad de las normas legales
- Indefinición de responsabilidades institucionales para la supervisión y el control de calidad.

- Inestabilidad del personal capacitado para producción de semilla pre-básica en las instituciones públicas
- Debilidad de las asociaciones de productores
- Poca coordinación entre oferta y demanda para definir qué se multiplica, dónde y cuánta semilla pre-básica o básica se necesita.
- Competencia entre el sector público y el sector privado en la producción de semilla
- Sobredimensionamiento de la infraestructura para producción de semilla prebásica
- Baja eficiencia productiva en laboratorios, invernaderos y campo
- Elevado costo de producción
- Inestabilidad de precios
- Fuga de semilla del sistema formal hacia el mercado de consumo
- Deshonestidad de intermediarios en el mercado de semilla

El riesgo más evidente e inmediato derivado de la falta de buenos sistemas de producción de semilla, consiste en la diseminación de enfermedades, principalmente aquellas sistémicas causadas por virus, viroides, fitoplasmas y bacterias, por medio del movimiento descontrolado de semillas dentro de un país. Este riesgo se extiende también a la introducción de plagas y enfermedades exóticas desde países vecinos o aún desde

otro continente. Otro riesgo es la incapacidad de reaccionar con rapidez y eficiencia a los cambios en la demanda inducidas por las oportunidades en la industria y la exportación o nuevas condiciones climáticas que requieren la difusión de variedades mejor adaptadas y productivas, de mejor calidad y más resistentes a plagas y enfermedades. Por último está el riesgo de perder competitividad sea por la caída en la productividad o por el aumento de los costos unitarios de producción (Ezeta, 1999).

2.5 Producción de microtubérculos *in vitro*

La producción de microtubérculos *in vitro* surgió como una alternativa a los minitubérculos. La tuberización *in vitro* ha sido ampliamente estudiada siendo posible la producción de grandes cantidades en pequeños ambientes (Ezeta, 1999). Aunque la producción *in vitro* de tubérculos de papa, o microtuberización, data de hace 40 años, la aplicación de éstos en modelos confiables de sistemas de investigación ha tenido un lento desarrollo. Diversos factores, como el uso de reguladores y medios de crecimiento en la industria de microtubérculos, la naturaleza heterotrófica del sistema *in vitro* y las respuestas de cultivares específicos han conducido a dificultades de interpretación. Una anotación preventiva es también necesaria en vista de las aparentes diferencias en el crecimiento y desarrollo, alteraciones metabólicas y variaciones somaclonales encontradas en los microtubérculos, que no se encuentran en los tubérculos que crecen en campo. La evidencia de fuertes y consistentes analogías para inducción, crecimiento y desarrollo y metabolismo entre microtubérculos y tubérculos que crecen en campo, con frecuencia es defectuosa (Coleman *et al.*, 2001).

Los microtubérculos son muy susceptibles a la deshidratación durante el almacenamiento y son además difíciles de brotar aún utilizando sustancias químicas estimulantes (Anónimo a, 1999). La dormancia prolongada o altamente variable puede llegar a ser impedimento de consideración para el uso eficaz de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) por la industria semillera (Coleman y Coleman, 2000). Numerosos productos químicos han sido evaluados, pero sólo unos pocos han demostrado tener buena eficiencia; en la explotación comercial se ha ensayado con vapor de bisulfuro de carbón, etileno, clorohidrin y “rindite”, una mezcla de etileno con clorohidrin (7 partes por volumen), 1,2-dicloroetano y tetracloruro de carbono. Aunque el rindite parece ser potencialmente apropiado para romper artificialmente la dormancia en microtubérculos, presenta problemas de toxicidad para plantas y animales, por tal razón su uso no ha sido ampliamente aceptado (Soon *et al.*, 1999).

Otra modificación substancial al modelo ha sido el trasplante directo al campo de plántulas *in-vitro*. En este caso las plantas pasan por un período de adaptación en ambientes protegidos de la radiación solar directa, donde son transplantadas en algún sustrato que permite el desarrollo radicular y aclimatación de la plántula antes del trasplante definitivo al campo. Este método ha sido probado en varios países pero la mayoría de ellos lo han abandonado por las dificultades en el manejo de las plántulas, baja tasa de sobrevivencia y alto costo entre otros (Ezeta, 1999).

2.6. Almacenamiento

Debido a que en muchos países raramente es posible la producción continua de papa, se hace necesario su almacenamiento para abastecer la demanda del mercado y proveer los requerimientos de semilla para sembrar durante el ciclo de cultivo siguiente. En este sentido, mediante el almacenamiento adecuado y por un tiempo controlado el producto estará disponible cuando se requiera, lo cual contribuiría a estabilizar y reducir las excesivas fluctuaciones de los precios.

Comprender lo que ocurre durante las diferentes etapas de almacenamiento y entender la compleja naturaleza del tubérculo durante el proceso, son requisitos indispensables para llevar a cabo un programa exitoso de almacenamiento y asegurar la calidad del producto hasta su destino final (Plissey, 2000).

El principal objetivo del almacenamiento es conservar la mayor cantidad de agua dentro del tubérculo. Por esta razón, el sitio seleccionado debe ser oscuro y bien aireado. La oscuridad evita el verdeamiento y el desarrollo de sabores agrios, y la buena ventilación impide la actividad de hongos y bacterias en los tubérculos. Además, la humedad relativa debe ser alta con el fin de evitar la pérdida de agua, la presión de aplastamiento y el encogimiento del tubérculo. De todas maneras, el manejo que se le dé a la papa durante su almacenamiento, dependerá del uso que se le vaya a dar una vez que termine el proceso. Durante el almacenamiento, la papa pierde calor, dióxido de carbono y agua a través de la respiración. En condiciones de baja humedad relativa, puede disminuir peso en forma acelerada, en razón a la pérdida de agua (Plissey, 2000).

La temperatura y la humedad relativa dentro del sitio de almacenamiento pueden influir en la relación azúcar/almidón, la actividad de varias enzimas, la pérdida de agua y en la diseminación de enfermedades (Plissey, 2000).

2.7. Cultivo de tejidos vegetales en papa

Gómez *et al.* (1997), mencionan que la papa ha mostrado una gran plasticidad en su desarrollo haciendo posible la regeneración de plantas enteras *in vitro* a partir de diferentes fuentes de explantes. Así por ejemplo se ha logrado regenerar plantas de *Solanum tuberosum L.* a partir de discos de tubérculo (Lam, 1975; Jarret *et al.*, 1984), secciones nodales de tallo, anteras, raíces (Dodds y Roberts, 1984) y actualmente de manera más rutinaria a partir de hojas (Webb *et al.* citado por Dodds y Roberts, 1984).

El factor más importante para que la regeneración sea posible es el balance adecuado de reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas. El ácido indolacético (AIA) y la bencilaminopurina (BAP), son efectivos para inducir la regeneración de brotes (Park *et al.*, 1995; Hulme *et al.*, 1992; Lam, 1975; Hoque *et al.*, 1996 citados por Gómez *et al.*, 1997), aunque se ha demostrado que no siempre es necesaria la adición de auxinas al medio para obtener regeneración y el uso de otras fuentes de citoquininas como el ribósido de zeatina pueden mejorar significativamente la eficiencia de esta regeneración (Yadav, 1995; Park *et al.*, 1995 citados por Gómez *et al.*, 1997).

Otros factores que pueden afectar de manera considerable la respuesta morfogénica son la fuente del explante y su estado fisiológico, condiciones de luz y temperatura

(Lam, 1975), tratamiento inicial de oscuridad y la acumulación de etileno en la atmósfera del frasco, entre otros (Gómez *et al.*, 1997).

Debido a que la respuesta morfogénica puede variar de un genotipo a otro, Gómez y colaboradores (1997), exploraron las posibilidades de inducir embriogénesis somática u organogénesis en las variedades de papa Diacol Capiro y Parda Pastusa a partir de explantes de hoja, estudios que son el inicio a las posibilidades de aplicar nuevas técnicas de mejoramiento genético, como es el caso de la producción de plantas transgénicas.

2.8. Totipotencia celular

La regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos es la manifestación de la totipotencia celular (Gómez *et al.*, 1997). Las células de las plantas son totipotentes, esto es que contienen toda la información genética requerida para regenerar una planta en su totalidad (Litz y Jarret, 1987, citados por Martínez, 1997), la cual puede ocurrir de manera parcial siguiendo la ruta organogénica (*callogénesis o rizogénesis*) o en forma completa siguiendo la ruta embriogénica. Ambos fenómenos pueden ocurrir directa o indirectamente, es decir sin la presencia de fase callosa previa a la regeneración o con ella respectivamente, aunque en la práctica no siempre es posible distinguir estos dos modelos de desarrollo ((Montoya, 1991, Segura, 1993; Litz y Jarret, 1991; George y Sherrington, 1984 citados por Gómez *et al.*, 1997).

La posibilidad de regenerar una planta completamente a partir de una célula, fue propuesta primeramente por Haberlandt en 1902 (Chen y Sharp, 1990) Tuvieron que transcurrir más de 50 años para que esta teoría fuera confirmada al introducir embriones somáticos y regenerarse plantas *in vitro* a partir de callos derivados de ápices radiculares de zanahoria (Litz y Jarret, 1987 citados por Martínez, 1997).

Para que una célula exprese su totipotencia, primeramente sufre una desdiferenciación (reversión hacia el estado meristemático y formación de callo), seguida de una rediferenciación que es la habilidad de los componentes celulares de formar órganos o plantas completas, capacidad que se mantiene mientras las células dispongan de un sistema membranal intacto y un núcleo viable (Bhojwani y Razdan, 1983).

2.9. Formación de callo

Un callo es una masa amorfa de células parenquimatosas acomodadas en forma suelta y que tienen su origen en células que proliferan del tejido parental (Dodds y Roberts, 1984). El desarrollo de callo a partir de un fragmento de tejido vegetal se divide en tres etapas: inducción, división o proliferación y diferenciación (Aitchison *et al.*, 1977).

Si en el explante asilado sólo existen células diferenciadas, es necesario producir una desdiferenciación, antes de que tenga lugar la división celular, siendo las células parenquimatosas las que generalmente pueden sufrir este proceso. Si un explante contiene tejido meristemático en el momento de su aislamiento, este se puede dividir en forma inmediata, sin necesidad de que se produzca una desdiferenciación. La

desdiferenciación juega un papel muy importante, ya que permite, a las células maduras de una planta adulta, presentar una redefinición. En este proceso, las células adultas son capaces de forma temporal, de pasar de su forma adulta a su forma juvenil (rejuvenecimiento). Este rejuvenecimiento puede tener consecuencias muy importantes: Las células son inducidas a dividirse de forma intensiva; las células rejuvenecidas presentan un mayor crecimiento y potencial de división; las células rejuvenecidas son capaces de regenerar órganos y/o embriones. Después de la desdiferenciación, las células pueden empezar a dividirse de forma intensiva, bajo la influencia de algunos factores como los reguladores de crecimiento que puedan existir en el medio; así se forma un tumor que recibe el nombre de callo. Un callo es en principio un tejido no organizado y poco diferenciado; cuando se examina de forma crítica un tejido de callo, puede verse que está lejos de ser algo homogéneo, ya que generalmente está constituido por dos tipos de tejidos: Uno diferenciado y otro no diferenciado (Pierik, 1990).

Desde un punto de vista funcional, la característica más importante de un callo es que éste es capaz de desarrollar brotes, raíces o embriones, los cuales pueden dar lugar a plantas normales (Dodds y Roberts, 1984).

2.10. Formación de callo en papa

Jarret *et al.* (1984), experimentando con yemas axilares de varios genotipos de papa dulce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) en un medio MS, encontraron que $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D fue suficiente para estimular el desarrollo de callos en todos los genotipos a los 10 días después de la inoculación.

Por otra parte Cárdenas (1989), encontró que las hojas de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) obtenidas a partir de semilla-tubérculo y utilizadas como explantes, presentan un gran potencial para la formación de callos en un medio de MS adicionándole 4 μ M de 2,4-D ,y que por el contrario altas concentraciones de BA reducen drásticamente la formación de callos.

Los programas en investigación biotecnológica durante las dos últimas décadas han abierto oportunidades sin precedentes en algunas áreas de la investigación biológica básica y aplicada. El cultivo de tejidos vegetales es un componente importante de la biotecnología en plantas, presenta nuevas estrategias para el mejoramiento de cereales, leguminosas, especies forestales y ornamentales. Además el cultivo *in vitro* de células provee un buen sistema para muchos estudios básicos en el mejoramiento de plantas, fisiología vegetal, genética y biología celular. Las manipulaciones celulares a través de métodos sofisticados de ingeniería genética para incrementar la calidad y mejoramiento de los productos vegetales, ha tenido sus bases en el cultivo de tejidos para llegar a la meta final (Bapat, 2000).

Aunque los sistemas actuales de micropropagación y transformación están basados casi exclusivamente en la organogénesis de brotes, la embriogénesis somática contribuye a mejorar los métodos de aplicación biotecnológica, ofreciendo un gran potencial para la propagación masiva a gran escala y para la producción eficiente de clones o variedades de plantas transgénicas y a futuro para la producción de semilla artificial (Parrot *et al.*, 1991 citados por Gómez *et al.*, 1997).

2.11. Embriogénesis somática

La embriogénesis *in vitro* se ha definido como el proceso de desarrollo que produce un embrión perfecto a partir de una sola célula, de la cual, todos los derivados son partes de una estructura que adquiere bipolaridad en su etapa inicial, tal como ocurre en la embriogénesis cigótica (Street y Withers, 1974 citados por Martínez, 1997).

La utilización de técnicas biotecnológicas basadas en la obtención y regeneración de embriones somáticos ha demostrado ser una herramienta importante para el mejoramiento clásico, pues constituye un método eficiente para la propagación clonal de aquellas variedades que resulten de interés económico (Moré *et al.*, 2000). Se considera como un método eficiente para la propagación *in vitro* de un número de especies de importancia agronómica y hortícola (Kepczynski, s/a).

La embriogénesis somática se refiere a la iniciación de embriones de células somáticas previamente diferenciadas. Casi todas las células de las plantas tienen la capacidad de llegar a ser embriogénicas bajo condiciones específicas. Esta característica confía en la reprogramación de la expresión del gen y dispara muchos cambios estructurales que son similares a los encontrados en embriones cigóticos normales. Como un resultado, las técnicas de embriogénesis somática han contribuido con gran información sobre los cambios genéticos, morfológicos y fisiológicos que tienen lugar durante la formación del embrión cigótico en vivo y durante su desarrollo temprano. Además, de un sistema modelo para entender el desarrollo del embrión, la embriogénesis somática puede ser usada como un camino para propagar un gran número de individuos genéticamente

idénticos con poca manipulación. Sólo un número limitado de células formarán embriones somáticos en cierto tiempo y la diferencia en éste dependerá de la especie de que se trate. Esto depende en parte del genotipo y de la fuente del explante (Cosgrove, 1999).

El desarrollo de embriones somáticos y plántulas, a partir de un explante se puede resumir como sigue. En primer lugar se deben desdiferenciar las células ya diferenciadas, y posteriormente iniciar la división. De esta forma se origina una masa no diferenciada de células parenquimáticas vacuoladas. Estas se transforman en células ricas en citoplasma que se hacen embriogénicas por la influencia de la auxina. Las células embriogénicas, a partir de las cuales se originan los embriones, muestran una serie de características comunes, típicas de las células en proceso de división rápida. Entre ellas se pueden citar, un tamaño pequeño, contenido citoplásmico denso, núcleo grande, con nucleolos grandes y prominentes, vacuolas pequeñas, y una gran cantidad de granos de almidón. Su histoquímica y ultraestructura sugieren una actividad metabólica y una síntesis de RNA intensas (Pierik, 1990; Ortega, 1993).

Se pueden distinguir dos tipos diferentes de embriogénesis somática: directa e indirecta.

1. **Directa:** El embrión se origina directamente, a partir de una célula o tejido, sin que se produzca una formación previa de callo. Las células de las cuales se originan los embriones reciben el nombre de células determinadas pro-embriónicas (PEDC). El material inicial para este tipo de embriogénesis se encuentra ya completamente rejuvenecido.

2. **Indirecta:** En este tipo de embriogénesis, primero se forma un callo, a partir del cual se forman después los embriones. Las células de las cuales se originan los embriones, reciben el nombre de células determinadas embriogénicas (IEDS), y producen embriones cuando son inducidas a ello. Las células diferenciadas deben ser primero desdiferenciadas, para ser redeterminadas como células embriogénicas después de la división celular. Las auxinas (y a veces las citocininas), tienen gran importancia en este proceso (Pierik, 1990).

Steward *et al.*, (1958) y Reinert (1959) citados por Payne *et al.* (1992), observaron que cuando las células de zanahoria crecían en una suspensión o cultivo de callos, ellas eran capaces de formar una unidad estructuralmente distinta que se desarrollaba de una manera similar como un embrión cigótico. Aunque su origen era incierto, estos embriones somáticos pasaban por tres etapas morfológicas: globular, corazón y torpedo. Schiavone y Cooke (1985) citados por Payne *et al.* (1992), sugieren que puede ser útil el considerar un desarrollo intermedio entre los estados globular y el estado de corazón. Estos autores citan que la transición de la expansión isodiamétrica característica del embrión globular, a una extensión longitudinal resulta en un embrión "oblongo". La emergencia de cotiledones entonces puede ser usada para distinguir entre el estado oblongo y el de corazón. Payne, *et al.* (1992), reportaron que en los estados globular y corazón, las células de embriones de apio eran citoplasmáticamente densas y no mostraron signos de diferenciación; en el estado de torpedo, ocurre la diferenciación celular y fue observada una mayor organización interna del tejido.

Toshihiro y colaboradores (1997), encontraron que la proliferación o desarrollo de embriones somáticos fue inhibida por una alta densidad de células, ya que el número de embriones disminuyó cuando hubo una alta densidad de células, en comparación cuando la densidad fue menor; esta reducción en la formación de embriones somáticos también se observó cuando en el medio se incluyeron factores inhibitorios como la eliminación del 2,4-D. En adición, este hecho indica que los factores inhibitorios suprimen la división celular específicamente de la embriogénesis somática y la formación de embriones somáticos en un estado de manera específica.

En alfalfa, el tratamiento inductivo con 2,4-D es lo más común, sin embargo el uso de otras auxinas como el 2,4,5-T son eficaces, ya que la respuesta de estos compuestos son absolutamente complejos. Algunas auxinas como el IAA e IBA son ineficaces para la formación de embriones somáticos. Otros componentes inorgánicos en el medio tales como el potasio, y los componentes orgánicos como la prolina, pueden modular la embriogénesis o la respuesta del callo, pero no pueden sustituir a las auxinas (McKersie, 1996).

Jarret *et al.* (1984), experimentando con callos de yemas axilares de papa dulce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivadas en un medio con 0.1 a 0.3 mg·L⁻¹ de 2,4-D, encontraron que la transferencia de callos embriogénicos a un medio libre de auxinas después de la iniciación, estimula el desarrollo de embriones somáticos, permitiendo una maduración y germinación de los mismos.

En líneas de células embriónicas de zanahoria, bajar la concentración de auxina, subsecuente a la inducción de la embriogénesis, conduce inicialmente a una rápida metilación, que se revierte en la formación de embriones maduros. Esta embriogénesis es inhibida por una droga que induce hipometilación. La auxina que controla la metilación durante la embriogénesis somática, es mediada por el S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilcisteina (SAH), probablemente como sigue: al eliminar el 2,4-D da lugar a una reducida producción de etileno que aumenta la acumulación del SAM y la relación de transformación de SAM/SAH, que alternadamente da lugar al incremento de la metilación del DNA. Por lo tanto, en el momento en que el 2,4-D es retirado (en la etapa globular), la metilación es baja pero aumenta dramáticamente durante la formación del embrión torpedo; esto sugiere que la hipometilación del DNA induce un estado en la diferenciación de las células somáticas que se asemejan a los embriones cigóticos iniciales. La disponibilidad del SAM puede ser importante tanto en la adquisición del potencial embriónico, como en el control subsecuente del desarrollo del embrión. El retirar el 2,4-D da lugar a disminuir las cantidades de antioxidantes endógenos (glutathione, ácido ascórbico y vitamina E), que estimulan el desarrollo somático del embrión. Aumentando la cantidad de antioxidante endógeno por la aplicación de 2,4-D exógeno o de ácido ascórbico y de la vitamina E, inhibe embriogénesis. Estas observaciones condujeron al concepto de que el desarrollo ordenado del embrión requiere de un ambiente más oxidativo, que la proliferación de la célula (VonAderkas y Bonga, 2000).

2.12. Embriogénesis somática en papa

JayaSree *et al.* (2001), desarrollaron un procedimiento eficiente para la inducción de embriones somáticos de papa cv. Jyothi a partir de explantes de hojas y su regeneración en plántulas completas. Las secciones de hojas fueron inicialmente cultivadas en medio que contenía sales de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)(0.9 μM) + benziladenina (BA) (10 μM), sucrosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y myoinositol (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Después de dos semanas los explantes fueron transferidos a otro medio que contenía BA (10 μM) + zeatina (22.8 μM), los explantes fueron mantenidos en temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ con luz blanca fluorescente ($50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) con fotoperiodo de 16 horas durante 4-6 semanas. En este medio se disparó el desarrollo de embriones somáticos de los centros meristemáticos del tejido nodular, en los cuales se presentó una alta frecuencia de embriones desde el estado globular hasta el final del desarrollo cotiledonal. Estos mismos autores mencionan que la regeneración de embriogénesis somática a través de callos de hojas no había sido reportada hasta ese momento, y que ellos encuentran un método simple para la inducción de embriones directamente de tejido nodular a partir de explantes de hoja.

Fiebert *et al.* (2000), indujeron embriogénesis somática de puntas meristematicas de brotes de papa cv. Tomensa en medio líquido para la formación de semilla artificial. Los explantes fueron tomados de plantas de 3 a 4 semanas de edad propagadas *in vitro*. Los callos fueron inducidos en un medio suplementado con NAA (3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA (0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y fueron multiplicados en otro medio que contenía NAA (3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA (1.0

mg·L⁻¹), después de 15 a 20 días los callos presentaban un color verde intenso y consistencia compacta, los cuales se transfirieron para la formación de embriones con GA₃ (0.1 mg·L⁻¹) y zeatina (0.05 mg·L⁻¹) en donde estos se formaron después de 30 a 35 días. Los estudios histológicos confirmaron la naturaleza bipolar de los embriones, que desarrollaron en plantas normales.

Brotes, raíces y callos fueron obtenidos de discos de tubérculos de papa cv. Desiree cuando crecieron en un medio base con sales de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2,4-D y/o 6-benzylamino-purina (BAP). Los callos fueron formados con BAP (1 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹), callos y raíces fueron obtenidos con BAP plus (1 mg·L⁻¹) + 2,4-D (0.5 mg·L⁻¹) y los brotes fueron formados directamente cuando se utilizó BAP solamente. Se produjeron nódulos en la superficie de los explantes después de 4 semanas y de 2 a 6 brotes en cada nódulo; después de 9 semanas que fue el tiempo total de incubación, los brotes en pequeños trozos fueron transferidos a un medio que no contenía reguladores de crecimiento, de los cuales posteriormente desarrollaron raíces y plántulas. Un estudio histológico de los explantes en los sitios de formación de los nódulos, indica que los brotes desarrollados de las zonas meristemáticas iniciaron dentro de pequeños brotes de tejido similar a los que ocurren en la organogénesis, pero la presencia de meristemos de brotes y raíces asociado con los mismos cortes sugiere la formación de embriones somáticos (Esna-Ashari y Villiers, 1998).

Diferencias en la productividad de embriones somáticos *in vitro* de 18 cultivares tetraploides de papa (*Solanum tuberosum*) y tres especies silvestres de *Solanum* fueron

recientemente reportados por Seabrook y Douglass (2001), quienes utilizaron segmentos de tallos, hojas, raíces y microtubérculos como explantes, utilizando thidiazuron o 6-benzilamino-purina (BAP) en un primer medio y zeatina, ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (AG₃) en un segundo medio, produciendo embriones somáticos en un tiempo de 14-28 días. Los embriones desarrollaron en los estados globular, corazón y torpedo, siendo este último capaz de producir plántulas de tallos delgados. La diferencias genotípicas en la capacidad regenerativa fue claramente evidente, en donde diferencias considerables fueron observadas en el número de embriones somáticos obtenidos de los diferentes cultivares, y condujeron a la conclusión de que la regeneración vía embriogénesis puede ser bajo un control genético; así, si los genes que controlan la regeneración pueden finalmente ser aislados, muchas de las barreras para el mejoramiento de papa a través de la transformación pueden ser llevadas a cabo, porque los genes pueden ser entonces caracterizados y transferidos a genotipos seleccionados. Posteriormente a este trabajo y para examinar la posibilidad de la segregación de la embriogénesis somática, Seabrook *et al.* (2001) tomaron como explantes segmentos internodales de tallos de plantas germinadas *in vitro* obtenidas de tres cruza: Coastal Russet x AF 186-2; Coastal Russet x Lenape y AF 186-2 x Lenape. Los datos para el número de explantes que produjeron embriones y el número de embriones por explante fueron altamente significativo, los explantes de la primera cruza produjeron más embriones que las otras dos cruza, y la cruza de AF 186-2 x Lenape produjo menos de 10 embriones por explante, con lo que se concluyó que la regeneración de embriogénesis somática en papa esta probablemente bajo control nuclear y la herencia para la regeneración puede ser totalmente directa

En Cuba, se dispone de análogos de brasinoesteroides con diferentes estructuras químicas para estudios biológicos, y de cantidades suficientes de algunos de los más activos para evaluar su efectividad como reguladores del crecimiento, tanto en condiciones *in vitro*, como de campo (Núñez, 1999). Dos análogos de brasinoesteroides son el MH5 y DAA-6, los cuales se probaron para la formación de callos de papa con características embriogénicas. Desde los primeros días de la siembra, se observó un incremento en el crecimiento callogénico en aquellas combinaciones donde se utilizaron los análogos como sustitutos de la kinetina, destacándose el MH5 con una mejor inducción del callo. A partir de los 9 días del cultivo aparecieron diferencias en cuanto a consistencia, coloración y desarrollo del callo entre los tratamientos y con el control, los cuales se hicieron más notable con la evolución del callo, hasta los 35 días donde finalizó el cultivo. Al respecto, Ikekawa (1994) citado por Moré *et al.* (2000), planteó que al combinar el brasinoesteroides con la auxina, se estimula el crecimiento de tejidos de callos de un número de plantas, siendo más efectivo que la auxina y la benciladenina. Por otra parte la utilización del DAA-6 estimuló la aparición de raíces y tuberculillos en 33%, al parecer las dosis utilizadas provocaron un balance hormonal endógeno que propició el desarrollo de estas estructuras, aspecto desfavorable en el cultivo de células.

Cárdenas (1989), encontró que para que se de la iniciación de embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.) es esencial agregar al medio líquido 0.1 μ M de 2,4-D. Moré y colaboradores (2000), determinan que el medio de cultivo y dentro de éste, las fitohormonas son determinantes en la formación de un callo con características embriogénicas en papa, por lo que se hace necesario la búsqueda de nuevas variantes

hormonales que permitan mejorar la calidad de los mismos; así como, la reducción de los costos. Resulta de gran interés contar con nuevas alternativas hormonales en los medios de formación de callos de papa, aun más cuando se pueden alcanzar, en muchos casos resultados superiores a los encontrados con el empleo de las hormonas tradicionales. Sin embargo, no hubo respuesta del explante de papa al ser utilizados los análogos como sustitutos del 2,4-D, apareciendo un tejido necrosado a lo largo del cultivo, lo que puede estar relacionado con que estos compuestos no pueden sustituir a la hormona como estimuladores en el proceso de división celular y que por sí solos, no puede inducir los niveles de auxinas endógenas necesarias para este proceso, por lo que se manifiesta su actividad tipo citocinina.

Moré y González (2000), realizaron un experimento para evaluar el efecto y las dosis adecuadas del Pectimorf, sobre el proceso de formación de callos embriogénicos en papa de la variedad Desiré. Este compuesto es un biorregulador cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos de origen péctico, con efectos sobre el crecimiento y la organogénesis en plantas; el cual es capaz de inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, e incrementar de forma notable el desarrollo y el vigor de las vitroplántulas en diferentes cultivos según Cabrera y colaboradores (1998) citados por Moré y González (2000). Cuando estos autores emplearon el biorregulador como sustituto de la auxina, no se manifestó respuesta del explante al proceso de formación de callo, apareciendo a los 9 días de la siembra un tejido necrosado en la superficie del mismo, haciéndose cada vez más intenso, hasta llegar a la muerte de los tejidos a los 15 días aproximadamente. Este resultado pudo estar dado porque las dosis empleadas de Pectimorf no fueron capaces de estimular los niveles endógenos de auxina

necesarios para llevar a cabo el proceso de división celular y no lograr un balance hormonal adecuado para la inducción del mismo. La respuesta inhibitoria en el crecimiento de los callos al ser empleado el producto como sustituto auxínico, demostró una vez más, la necesaria presencia de la auxina para el desarrollo callogénico en papa, siendo el 2,4-D el regulador del crecimiento más empleado en este proceso.

Por el contrario en la valoración cuantitativa de la callogénesis con el empleo del Pectimorf como sustituto de la kinetina Cabrera y colaboradores (2000) citado por Moré *et al.* (2000), señalaron el efecto estimulador de este oligogalacturónido en el crecimiento de los callos de diferentes cultivos. Para el cultivo de papa se observó que las combinaciones $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D + $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pectimorf y $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D + $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Pectimorf, indujeron un callo con las mejores características embriogénicas en donde se manifestó una fase de latencia, que tuvo una duración de 5 días. En este momento no se manifestó crecimiento del explante, indicativo de un período adaptativo de las células a las nuevas condiciones del cultivo. La fase de crecimiento exponencial se evidenció desde los 6 hasta los 14 días, con un desarrollo acelerado del callo como muestra de una intensa división celular y consecuencia de la activa interacción de los componentes del medio, con el contenido hormonal endógeno del explante. Al respecto, Hidrobo (2002) reportó la influencia del medio en el crecimiento del callo de papa (var. Desirée) observando la presencia solamente de 3 fases de crecimiento del mismo.

Después de las observaciones iniciales de la embriogénesis somática, fueron considerables los esfuerzos dedicados a definir las condiciones del medio que permitan

la embriogénesis y caracterizar los eventos morfológicos y de desarrollo, que condujeron a la formación del embrión. El potencial existente para realizar manipulación genética específica a nivel de una sola célula y su regeneración, mejorara las plantas originadas de estas células. En comparación con otros métodos de regeneración, la embriogénesis tiene varias ventajas, porque ambas regiones meristemáticas están presentes en el embrión somático. La regeneración por este método requiere menos manipulación en comparación con otros, muchas de estas manipulaciones son realizadas en embriones de menos de un milímetro, por lo tanto, son menos sensibles a los daños físicos. Tal automatización puede aumentar significativamente el valor económico de plantas mejoradas por cultivo de tejidos. Las similitudes entre embriones somáticos y cigóticos, sugieren que la embriogénesis somática puede proporcionar los medios para la producción de semillas artificiales o sintéticas (Payne *et al.*, 1992).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Edo. de México, situada a 19° 29' de latitud Norte, 98° 53' de longitud Oeste y a una altitud de 2,251 msnm.

3.2. Explantes

El material inicial se obtuvo a partir de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) de las variedades Fritolay-1867 y Atlantic producidos en el laboratorio de Biotecnología de Sabritas®, certificadas libres de patógenos. Así mismo, cada uno de los materiales fueron sometidos a pruebas de calidad industrial que permiten establecer indicadores de materia seca y azúcares reductores, entre otros; adicional a esto, se cuenta además con información del comportamiento agronómico (rendimiento y productividad). Los minitubérculos de 1-2 cm de diámetro se sembraron en suelo y posteriormente de ellos se tomaron yemas para sembrarse en un medio de multiplicación *in vitro* que contenía sales inorgánicas MS suplementadas con tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), myo-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido nicotínico ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), piridoxina ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar ($8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en donde se obtuvieron plantas *in vitro*. Previamente a la siembra de las yemas se realizó su desinfestación, que se inició colocando el tejido en cajas petri con agua + detergente lavándose tres veces, se enjuagan perfectamente y se sumergen en Benlate

(500 mg/100 ml de agua) durante 10 minutos; nuevamente se enjuagan y se pasan por hipoclorito de sodio 10% durante 10 minutos. Finalmente dentro de la cámara de flujo laminar, se enjuagan por última vez tres veces más con agua destilada y esterilizada. Después de la desinfestación las yemas fueron seccionadas y colocadas en frascos de vidrio que contenían el medio arriba mencionado que se le denominó como Medio de Multiplicación.

Cuando las plantas contaban con un mes de edad, se tomaron segmentos de hoja de aproximadamente 5 mm de lado e hipocótilos de 2 mm de largo como explantes, sin necesidad de desinfestarse, se transfirieron a medios de cultivo para su establecimiento, esto se llevó a cabo bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar y con la ayuda de bisturí, pinzas, agua y agujas estériles.

A partir de este momento se establecieron dos rutas diferentes para la obtención de los embriones somáticos para ambas variedades, así se estableció un experimento para la obtención de embriones somáticos vía directa y un segundo experimento para la obtención vía formación de callo.

3.3. Medios de cultivo

Para evaluar ambas respuesta del tejido utilizado como explante, se utilizó un medio base que contiene las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS), complementándose con tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), myo-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido nicotínico ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), piridoxina ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido cítrico ($125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido

ascórbico ($125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cisteína ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y agar ($8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A este medio se le fueron agregando los diferentes reguladores de crecimiento necesarios para inducir la formación de embriones somáticos en cada uno de los experimentos, así como para evaluar las diferentes concentraciones utilizadas en cada caso y poder establecer el mejor tratamiento.

3.4. Embriogénesis somática directa

Se tomaron tres segmentos de hoja y colocándose por el envés se sembraron en frascos que contenían el medio básico más **thidiazuron** a tres concentraciones ($0.1, 1.0$ y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento en completa oscuridad y a una temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$ durante ocho semanas, para posteriormente incubarlos en fotoperíodo de 16 horas luz a una intensidad luminosa de $44 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, durante dos semanas más en el mismo medio de cultivo.

A los 70 días de haber sido sembrados los explantes iniciales, los embriones somáticos obtenidos se pasaron a un nuevo medio que contenía: sales MS a 100%, tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), myo-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), agar ($8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ácido giberélico ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo que en el paso anterior, durante 89 días hasta la formación de las plantas de papa. Estas se sembraron en vasos de unisel del # 10 con una mezcla de suelo y agrolita en una relación 3:1, humedeciéndose con agua más agrimicín a una dosis de $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y cubriéndose con una bolsa de plástico durante 3 días. Una vez que las nuevas plántulas tuvieron la capacidad

de adaptarse a estas condiciones climáticas, las bolsas fueron retiradas y las plantas se mantuvieron a temperatura ambiente y bajo riegos cada tercer día en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

El diseño experimental fue un Completamente al Azar con cinco repeticiones donde la unidad experimental la constituye un explante y la variable respuesta fue el número de embriones por explante. En cada una de las unidades experimentales se registró el número de explantes que formaron embriones, el tiempo de formación del embrión, así como forma e uniformidad de los mismos. Los resultados se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza, se construyeron intervalos de confianza para las medias, y finalmente se ajustó un modelo de regresión cuadrática.

3.5. Embriogénesis somática indirecta

Para la obtención de embriones somáticos vía formación de callo, tres segmentos de tallo fueron sembrados en forma horizontal en el medio base al que se le agregó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como regulador de crecimiento a 0.1, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹. Estos explantes también se colocaron dentro de la cámara de crecimiento en total oscuridad y a una temperatura de 26±1°C durante ocho semanas, al igual que como se incubaron los segmentos de hojas para la obtención de embriones somáticos en forma directa.

Una vez transcurridas las 8 semanas, los callos se sacaron para determinar el peso fresco en una balanza analítica "Sartorius", y colocarlos en dos medios de cultivo: uno donde fueron sometidos a una baja concentración de 2,4-D ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y el segundo sin este regulador de crecimiento; ambos medios contenían además las sales MS reducidas a 75% KNO_3 y a 25% NH_4NO_3 , L-Glutamina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y ABA ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La incubación procedió en presencia de luz bajo un fotoperíodo de 16 horas y a una intensidad luminosa de $44 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la temperatura que se requirió durante este proceso fue de $28\pm 1^\circ\text{C}$, evaluándose tres diferentes períodos de tiempo que fueron de ocho, quince y veintiún días.

Transcurridos cada uno de los tiempos establecidos, los callos fueron colocados en ocho medios de cultivo, compuestos del medio base más cuatro diferentes concentraciones de Thidiazuron y Kinetina, (0.1 , 0.3 , 1.0 y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), para la inducción y maduración de los embriones somáticos. Para poder transferir los callos a estos nuevos medios de cultivo, fue necesario utilizar agua destilada y esterilizada, con antioxidantes como ácido cítrico y ácido ascórbico ($125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), con la cual se cubrían completamente los callos dentro del frasco del medio, entonces se tomaban con una espátula con gran cuidado para evitar que se disgregaran y poder pasarlos al nuevo medio de cultivo; lo anterior con la finalidad de evitar que los callos se oxidaran y perdieran la capacidad embriogénica. Los callos se incubaron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que en el medio anterior, sólo que en este caso se mantuvieron durante 12 semanas, en las cuales se formaron los embriones y algunos de ellos maduraron durante este tiempo teniendo la capacidad de germinar dando origen a raíces y tallos.

El diseño experimental fue un Completamente al Azar donde el número de repeticiones fue de acuerdo a los días que se mantuvieron los callos en fotoperíodo de 16 horas luz y en presencia o ausencia del 2,4-D. La unidad experimental la constituye un callo en donde se evaluó su capacidad embriogénica, determinándose masa fresca de callos, color, textura y grado de oxidación; porcentaje de germinación de embriones; número, longitud y vigor de raíces y presencia de tallos. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente empleando un análisis de varianza.

IV. RESULTADOS

4.1. Embriogénesis somática directa

Se presentaron diferencias entre ambos cultivares probados, ya que los explantes del cultivar Atlantic a la tercer semana de incubación, presentaron varios niveles de necrosamiento del tejido y a la cuarta semana estos estaban completamente necrosados, para las tres dosis de thidiazuron evaluadas (0.1, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹).

Por el contrario en el cultivar Fritolay-1867, se obtuvieron 195 embriones somáticos a partir de secciones de mesófilo de hoja de 5 mm de lado, cuando se colocaron por el envés en el medio de cultivo que contenía thidiazuron a 1.0 mg·L⁻¹ como regulador de crecimiento, ya que en la dosis de 3.0 mg·L⁻¹ se observó un incremento en el tamaño de los explantes y la formación de tejido de cicatrización durante las primeras semanas, permaneciendo así hasta el necrosamiento del explante a la quinta semana de incubación.

Las secciones de mesófilo que permanecieron a una dosis de 1.0 mg·L⁻¹, durante las dos primeras semanas de incubación incrementaron su volumen; a la tercer semana formaron pequeños agregados celulares de consistencia compacta, algunos de forma globular y de una coloración verde intenso (Figura 1).

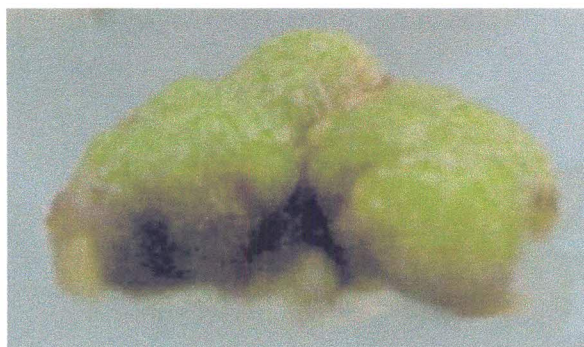


Figura 1. Agregados celulares de color verde en el mesófilo de hoja de papa cultivar Fritolay-1867.

Estos agregados continuaron su crecimiento y para la quinta semana se tornaron de un color verde brillante y fue en este momento en que las estructuras embrionarias globulares fueron diferenciándose con mucho mejor claridad, hasta alcanzar la forma final de los embriones (Figura 2).

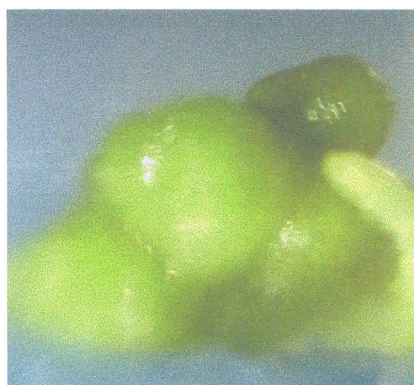


Figura 2. Estructuras embrionarias globulares de color verde brillante a los 35 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.

A la sexta semana de permanecer en la oscuridad se pudo observar que las estructuras embrionarias cambiaron a una coloración verde amarillento, incrementaron su tamaño e iniciaron una prolongación o extensión longitudinal del embrión para que de una forma

globular adoptaran una forma “oblonga”, formando grupos de diferentes tamaños en la superficie de los explantes, el cual presentaba una coloración café (Figura 3).

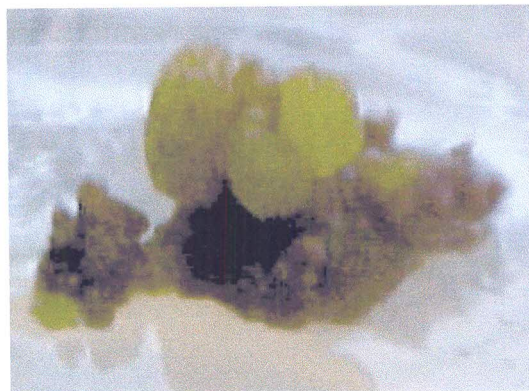


Figura 3. Embriones oblongos de color verde amarillento a los 45 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.

Cuando cumplieron ocho semanas los embriones fueron sacados de la oscuridad y se incubaron en el mismo medio en luz, durante una semana únicamente, para este tiempo las estructuras habían alcanzado diferentes tamaños los cuales variaron dependiendo del grado de madurez alcanzada para cada embrión, también la coloración varió dependiendo de la madurez, ya que presentaban desde un color verde con zonas blanquezinazas hasta un color café claro los más maduros, estos explantes presentaban excelentes características morfogénicas (Figura 4).

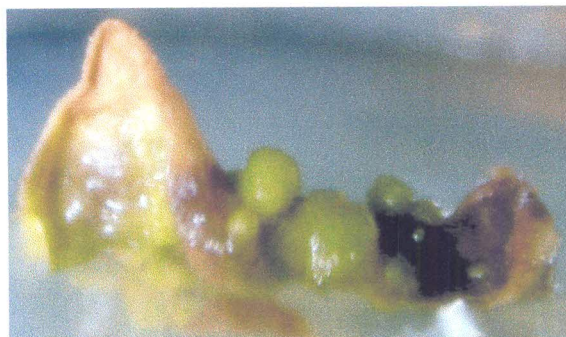


Figura 4. Embriones maduros de diferentes tamaños de color verde oscuro y café claro a los 60 días de incubación, cultivar Fritolay-1867.

El número de embriones vario considerablemente presentándose desde 15 hasta 52 embriones por cada laminar foliar de 5mm, estos embriones conservaron siempre el estado oblongo que obtuvieron desde la sexta semana de incubación, logrando su maduración.

A las nueve semanas y después de haber transferido los embriones al medio que contenía ácido giberélico, se obtuvieron los primeros indicios de la germinación de los embriones, lo que confirma la naturaleza bipolar de los mismos al desarrollar raíces y tallos dando origen a nuevas plantas completas de papa cultivar Fritolay-1867 (Figura 5).



Figura 5. Plantas de papa obtenidas a partir de embriones somáticos de explantes de mesófilo de hoja de papa cultivar Fritolay-1867, a las nueve semanas.

Del número total de embriones obtenidos por explante se calcularon el promedio de estos, desde su aparición hasta la novena semana en la cual germinaron. Estos promedios se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza y se construyeron intervalos de confianza para las medias (Anexo 1 y 2), encontrándose diferencias significativas ($P < 0.046$) entre el promedio de embriones de la 5ª a la 9ª semanas. En la figura 6 se observan claramente las diferencias de acuerdo como fue incrementándose el promedio de embriones durante estas semanas, en donde la mayor producción se registra durante la quinta, sexta y séptima semanas con promedios de 12.8, 23.8 y 30 embriones respectivamente. Para la octava semana el incremento parece detenerse levemente con un promedio de tan solo 33 embriones, y para la novena semana se obtuvo un promedio de 39 embriones por explante, lo que resultó en estas dos últimas semanas un comportamiento mas o menos constante en comparación con las anteriores. Este

resultado es de esperarse si se toma en consideración que durante la quinta, sexta y séptima semanas los embriones se encontraban incubándose en oscuridad total y que fue el momento en que se dio la formación de estos, una vez que fueron retirados de la oscuridad y transferidos a condiciones de fotoperíodo, los embriones iniciaron el proceso de maduración, por lo que es probable que algunos pudieron aparecer hasta ese momento, o bien que todos se formaron en las primeras etapas de incubación pero no fue posible diferenciarlos claramente unos de otros, ya que se encontraban en diferentes etapas de desarrollo debido a la asincronía celular, característica de este proceso

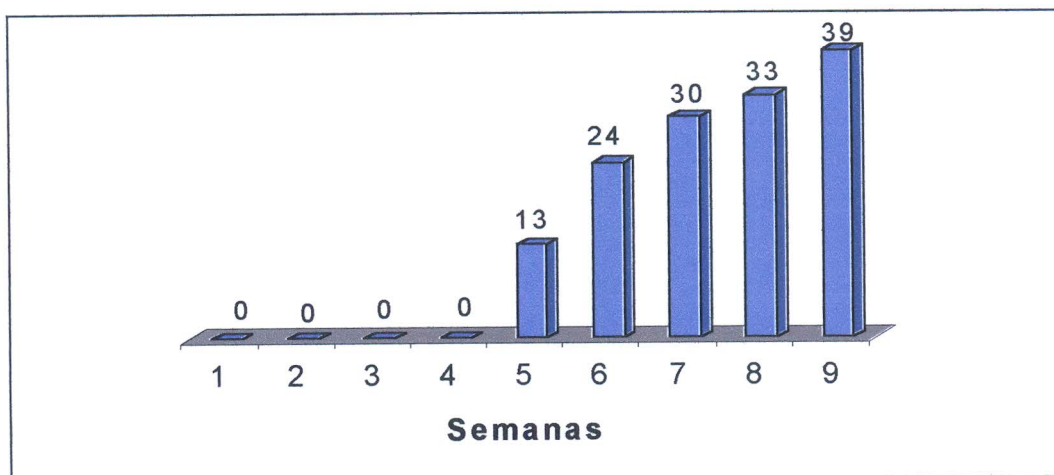


Figura 6. Promedio de embriones registrados de la quinta a la novena semanas posteriores a la siembra de explantes de mesófilo de hoja de Papa cultivar Fritolay-1867

La tendencia de crecimiento en el período comprendido entre la 5ª y la 9ª semanas se ajustó a un modelo de regresión cuadrática (Figura 7), de la forma:

$$y = -0.9429 x^2 + 19.36 x - 59.714$$

esto es:

$$\text{No. Embriones promedio} = -0.9429 \text{ Semana}^2 + 19.36 \text{ Semana} - 59.714$$

La ecuación explica el comportamiento del número de embriones promedio a través de la 5ª y la 9ª semanas en un 98.4%, mostrando que la razón de crecimiento disminuye a partir de la 7ª semana, como se observó en la gráfica de la Figura 6, dada por la ecuación:

$$\frac{dy}{dx} = -1.88x + 19.36$$

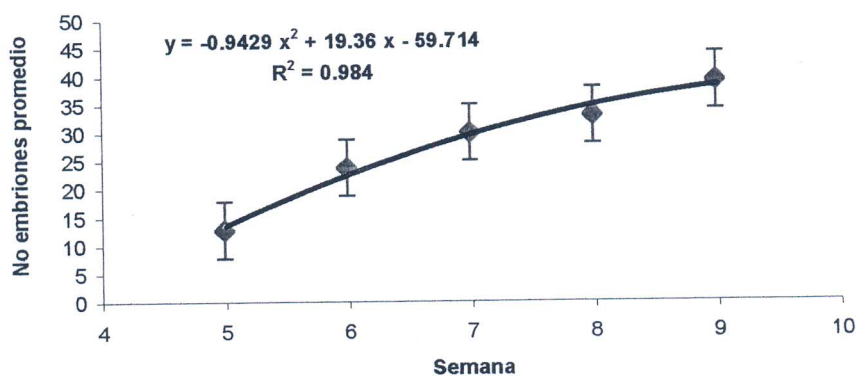


Figura 7. Regresión cuadrática para el número promedio de embriones obtenidos a partir de la quinta a la novena semana de incubación de explantes de mesófilo de hoja de papa cultivar Fritolay-1867.

La embriogénesis somática *in vitro* ensayada con el cultivar Fritolay-1867 de *Solanum tuberosum* L., en los medios de cultivo y para los reguladores de crecimiento empleados

en este experimento, sólo aseguraron un 5% de embriones germinados, pensando en la capacidad de conversión de los embriones somáticos en plántulas este porcentaje se considera bajo, debido probablemente a que los reguladores pueden exhortar múltiples efectos en estos procesos, dependiendo de la concentración, del estado del embrión cuando se aplicaron, o bien de la variedad de que se trate. El resto de embriones que no lograron germinar se necrosaron a partir de la novena semana de incubación.

4.2. Embriogénesis somática indirecta

Para la obtención de embriones somáticos en forma indirecta o por la formación de callo, tuvimos un comportamiento diferente para ambas variedades al igual que cuando se obtuvieron los embriones somáticos de manera directa. Con el cultivar Fritolay-1867 no se obtuvo ninguna respuesta, ya que a las dos semanas de haberse sembrados los explantes se necrosaron.

En este caso el cultivar Atlantic dio una respuesta positiva al formar embriones somáticos a partir de callos de secciones de hipocótilo de 2 mm de largo, cuando se utilizaron como reguladores de crecimiento el 2,4-D a 3.0 y 1.0 mg·L⁻¹ y Kinetina a una concentración de 3.0 mg·L⁻¹. Los segmentos de tallo presentaron entre los siete y 10 días fuertes agregados celulares en los extremos de los segmentos (Figura 8).



Figura 8. Explantes de hipocótilo de papa cultivar Atlantic con agregados celulares a los siete días de incubación.

Estos agregados empezaron a invadir el resto del explante formando una masa de color verde claro con zonas blanquecinas y de consistencia compacta (Figura 9).



Figura 9. Explantes de hipocótilo con inicio de masa callogénica compacta y verde blanquecino, cultivar Atlantic.

La masa compacta de tejido empezó a tomar una forma de estructuras callogénicas no diferenciadas unas de otras, para los 35 días esta masa era de consistencia semi-compacta y adquirió una coloración verde más intensa hacia el exterior y en el interior se presentaron algunas zonas de color crema (Figura 10).



Figura 10. Masa callogénica de consistencia compacta y coloración verde intenso a los 35 días de incubación, cultivar Atlantic.

A los 63 días de incubación los callos se caracterizaban por presentar consistencia friable, con presencia de espacios intercelulares en la masa callogénica, en cuanto a coloración cambiaron a un amarillo translúcido (Figura 11).



Figura 11. Callos a los 63 días de incubación de consistencia friable y coloración amarillos translúcidos, cultivar Atlantic.

A las ocho semanas los callos se sacaron de la oscuridad y fueron transferidos al medio con y sin 2,4-D, con fotoperíodos de 16 horas luz y a una mayor temperatura (dos grados por arriba de los 26°C), se determinó el peso fresco de los mismos que varió de 0.1930 g los más pequeños a 0.4169 g los de mayor tamaño, lo que indica que hubo una gran

variación en cuanto al tamaño de los callos alcanzado hasta este momento. Los callos poseían buenas características de consistencia y textura, y una coloración crema translúcida, estos se dividieron antes de colocarlos en el medio de cultivo, para obtener callos de pesos semejantes de aproximadamente 0.03 g de masa fresca cada uno (Figura 12).

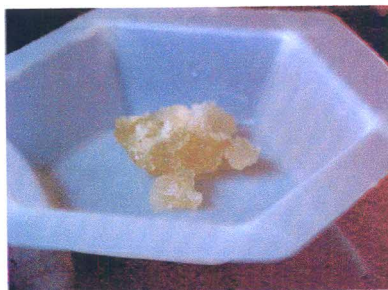


Figura 12. Determinación de peso fresco de los callos a los 63 días de incubación en obscuridad, cultivar Atlantic.

La masa callogénica a los 71 días, presentaba una consistencia muy friable y homogénea tornándose de un color café claro a café amarillento (Figura 13).



Figura 13. Callos de 71 días de consistencia friable y coloración café claro, en medio con concentración baja de 2,4-D ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), variedad Atlantic.

Los callos con los diferentes períodos (ocho, 15 y 21 días) en los medios con y sin 2,4-D, fueron transferidos a los medios que contenían Thidiazuron y Kinetina, en donde permanecieron el resto del tiempo. A los 135 días los callos presentaron una consistencia friable y estable, coloración café a café oscuro asociada al proceso de necrosamiento, y una masa fresca que vario considerablemente. Del análisis de varianza (Anexo 3) realizado para determinar el promedio de masa fresca de los callos, donde no aparecieron embriones, muestran diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) entre los pesos obtenidos cuando el medio contenía 2,4-D y cuando crecieron sin este regulador durante las tres diferentes fechas. Cuando se mantuvieron durante ocho y 21 días en el medio donde se adiciono la auxina, se produjeron los mejores resultados en la obtención del incremento en promedio de peso fresco de los callos (0.0828 g y 0.0887 g respectivamente), y cuando crecieron sin 2,4-D la diferencia fue de casi la mitad del peso, los cuales no sobrepasaron para ambas fechas los 0.05 g. De esta manera cuando los callos se mantuvieron durante 15 días en incubación, se presentó el mayor peso (0.0770 g) con 2,4-D (Figura 14).

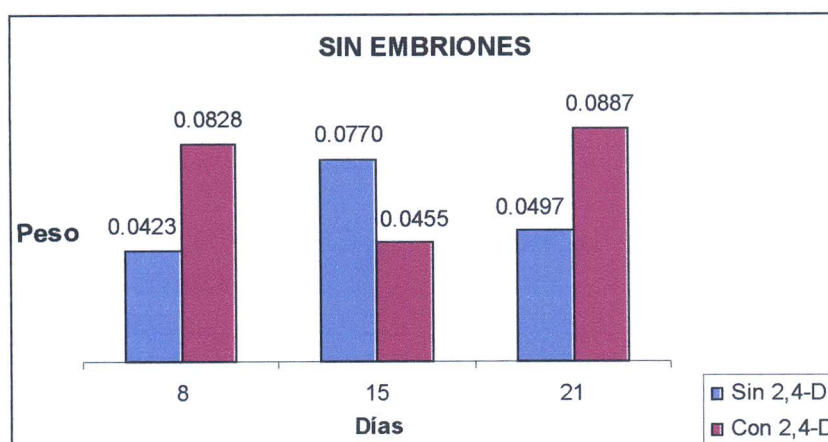


Figura 14. Peso promedio de peso fresco de callos, cultivar Atlantic que no formaron embriones, a los ocho, 15 y 21 días creciendo en medios de cultivo con y sin 2,4-D.

Un comportamiento similar se obtuvo en los callos donde aparecieron los embriones somáticos, mostrando diferencias estadísticas significativas entre los pesos de los tratamientos a los ocho y 21 días, ya que cuando los callos crecieron en presencia de la auxina poseían el mayor valor de peso fresco (0.1346 g y 0.1338 g respectivamente), en comparación con aquellos que crecieron sin 2,4-D (0.0632 g y 0.0668 g). A los 15 días de incubación los callos alcanzaron valores promedio en peso fresco de 0.10 g cuando se aplicó 2,4-D y de 0.08 g cuando no se agregó al medio 2,4-D en su composición, lo que nos muestra que en este caso no presentaron diferencias estadísticas entre ambos pesos (Figura 15).

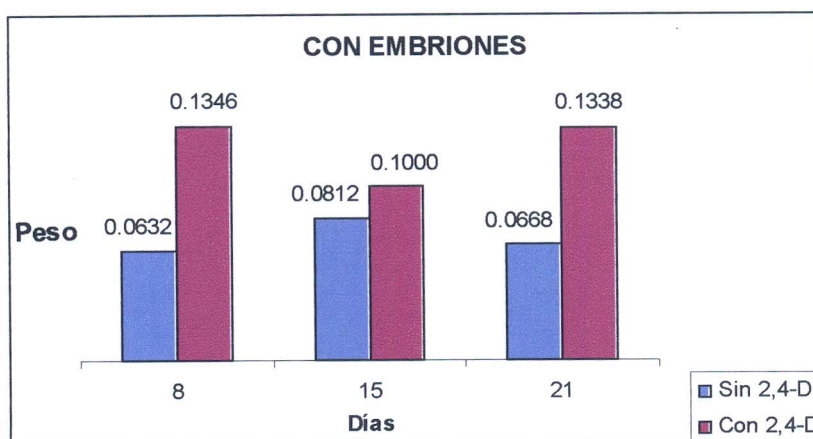


Figura 15. Peso promedio de masa fresca de callos, cultivar Atlantic que sí formaron embriones a los ocho, 15 y 21 días en medio de cultivo con y sin 2,4-D.

Para este tiempo en los callos (conocido como callos nodulares) se observó la aparición de unas estructuras globulares de color verde translúcido, diferenciadas del resto del callo y totalmente separadas del tejido materno. Estas estructuras primarias corresponden a los embriones somáticos que se desarrollaron en la superficie de estos callos posteriormente (Figura 16). Los embriones continuaron su desarrollo y para los

150 días habían alcanzado diferentes tamaños, los cuales variaron dependiendo de la madurez en la que se encontraba cada embrión (Figura 17).



Figura 16. Callos de 135 días, consistencia friable y color café, con presencia de protuberancias de coloración verde translúcido, cultivar Atlantic.



Figura 17. Embriones en diferentes etapas de desarrollo a los 150 días de incubación, cultivar Atlantic.

Durante el proceso de formación de los embriones somáticos cuando se mantuvieron en Thidiazuron y Kinetina, se observaron claras diferencias en cuanto al número de embriones formados entre los callos que anteriormente se incubaron durante ocho y 21 días en ambos medios (con o sin 2,4-D) y cuando se incubaron 15 días en estos mismos medios.

El Thidiazuron a los ocho y 21 días promovió el mayor número de embriones (21 y 17 respectivamente) cuando los callos fueron cultivados con 2,4-D anteriormente. A los ocho días y en las cuatro dosis (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹) probadas de Thidiazuron, se originaron en total nueve embriones, siendo el mejor tratamiento la dosis de 1.0 mg·L⁻¹ con el mayor número de embriones, produciendo cuatro de los nueve obtenidos (Figura 18).

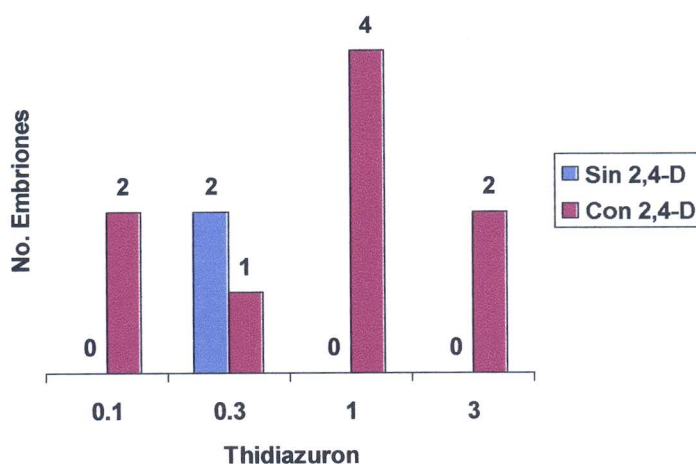


Figura 18. Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante ocho días, cultivar Atlantic.

A los 21 días se presentaron embriones solamente cuando en el medio se adicionó 1.0 mg·L⁻¹ de Thidiazuron incubados con 2,4-D anteriormente, y con 3.0 mg·L⁻¹ de Thidiazuron cuando crecieron sin la presencia de auxina (Figura 19).

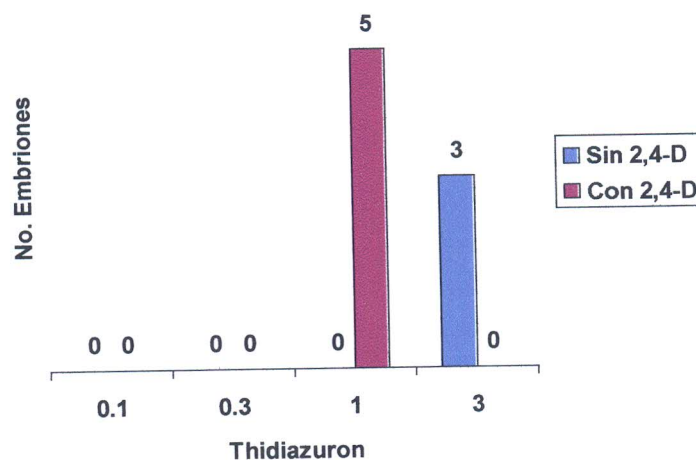


Figura 19. Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 21 días, cultivar Atlantic.

Los callos que fueron cultivados durante 15 días en un medio que no contenía 2,4-D, presentaron el mayor número de embriones (cuatro) con Thidiazuron a la dosis más baja (0.1 mg·L⁻¹); aunque también aparecieron embriones en los tratamientos a las dosis de 0.3 y 3.0 mg·L⁻¹. Cuando los callos crecieron en el medio con 2,4-D, durante este mismo tiempo, las dosis altas de Thidiazuron 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ formaron en cada caso dos embriones por tratamiento (Figura 20).

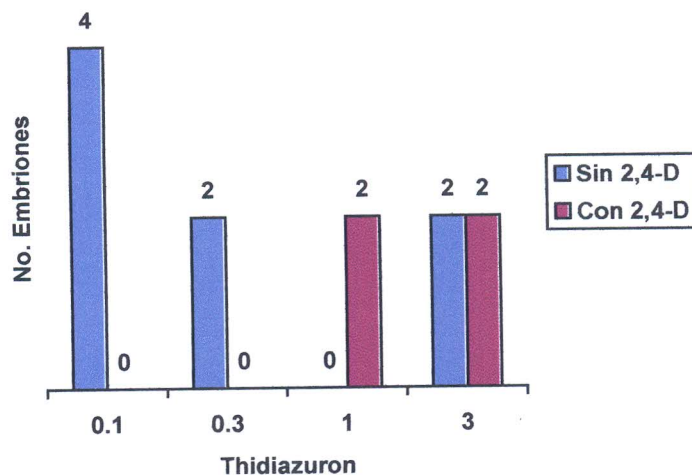


Figura 20. Número de embriones producidos con Thidiazuron a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 15 días, cultivar Atlantic.

Cuando se probó la Kinetina como promotor de la embriogénesis, nuevamente a los ocho y 21 días se observó el mayor número de embriones. Así a los ocho días y con dosis de 0.1 y 0.3 mg·L⁻¹ de Kinetina fueron los mejores tratamientos cuando los callos crecieron en presencia del 2,4-D (Figura 21), y a las dosis de 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ para los 21 días. En esta última fecha también se obtuvieron embriones pero en menor número a las mismas dosis de Kinetina pero sin 2,4-D (Figura 22).

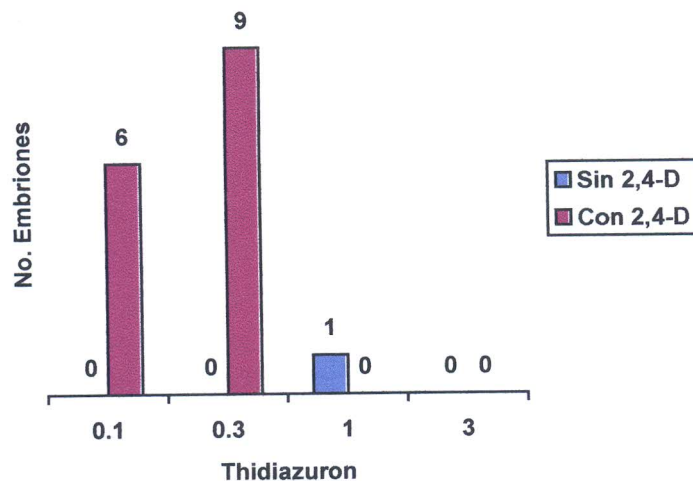


Figura 21. Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante ocho días, cultivar Atlantic.

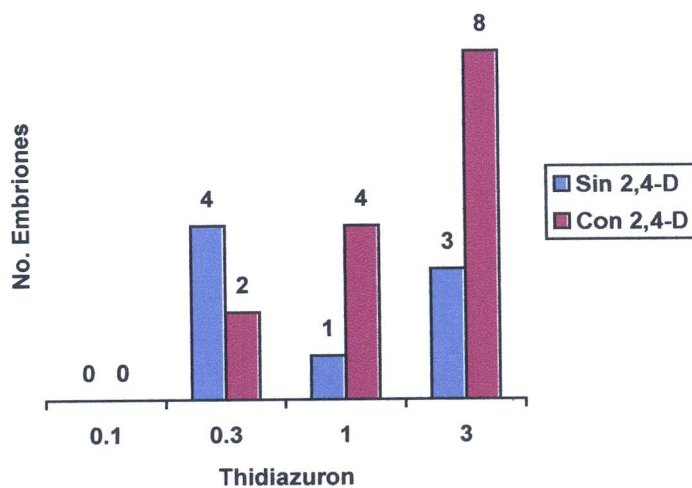


Figura 22. Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 21 días, cultivar Atlantic.

El comportamiento de los callos cuando se hicieron crecer durante 15 días en un medio sin 2,4-D ,previo al que contenía la Kinetina, fue diferente a las respuestas obtenidas durante los ocho y 21 días, ya que en este caso al igual que con el Thidiazuron, los mejores resultados se observaron cuando se incubaron en un medio sin auxina y produjo el mayor número de embriones (seis) a las dosis más bajas de Kinetina ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 23).

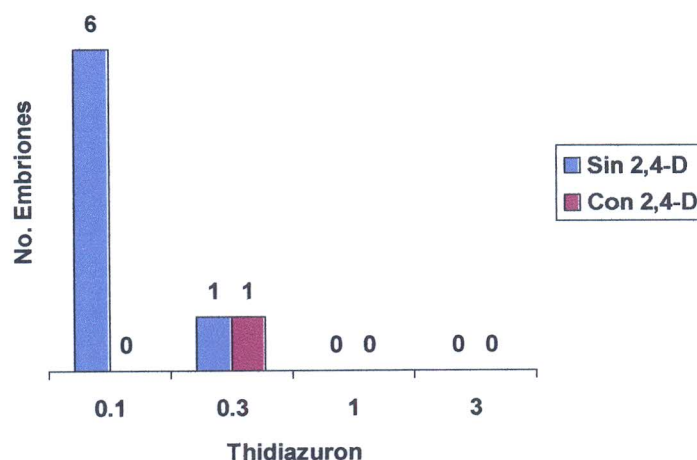


Figura 23. Número de embriones producidos con Kinetina a dosis de 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cuando los callos fueron incubados con o sin 2,4-D durante 15 días, cultivar Atlantic.

En el Cuadro uno se puede observar la proporción de embriones formados, cuando los callos se cultivaron con 2,4-D a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y en un medio que no contenía este regulador de crecimiento, a los ocho, 15 y 21 días, resultando como los mejores tratamientos a los ocho y 21 días creciendo en presencia de la auxina con un 67.7% y 54.8% de embriones formados respectivamente. Del análisis de correlación se obtuvieron los resultados para

peso fresco de los callos sin 2,4-D y que formaron embriones una correlación del 0.6096; y para peso fresco de callos con la auxina que formaron embriones, la correlación fue alta y positiva del 0.9766. A pesar de que se formaron embriones en las tres fechas y en presencia o no de 2,4-D, el único tratamiento que germinó a los 170 días de incubación (Figura 24), y dio origen a plantas completas de papa del cultivar Atlantic, fue cuando los callos se incubaron durante 21 días en presencia del 2,4-D y posteriormente se pasaron al medio con Kinetina a $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 25).

Cuadro 1. Porcentaje de embriones germinados a los ocho, 15 y 21 días de incubación con 2,4-D ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y sin este regulador.

Días	2,4-D	Prop. de 0	Prop. de 1
8	Sin	0.857	0.143
8	<i>Con</i>	0.323	0.677
15	Sin	0.545	0.455
15	<i>Con</i>	0.850	0.150
21	Sin	0.524	0.476
21	<i>Con</i>	0.452	0.548



Figura 24. Germinación de los embriones a los 170 días de incubación, cultivar Atlantic.



Figura 25. Plantas de papa obtenidas de embriones somáticos de explantes de hipocótilos de papa cultivar Atlantic a las 21 semanas de incubación.

4.3. Germinación

En el cultivar Fritolay-1867, se obtuvieron embriones somáticos en forma directa a partir de explantes de mesófilo de hojas, la germinación y conversión a plántulas se presentó en 5% de los explantes evaluados. Las plántulas, presentaron tallos raquíticos, etiolados, con poco vigor, además de follaje poco abundante y de tamaño pequeño.

Estas plántulas fueron transferidas a suelo, en donde permanecieron solamente por tres semanas; pasado este tiempo las plántulas no sobrevivieron a pesar de que se habían mantenido los primeros tres días cubiertas para evitar la deshidratación, y se regaron con agrimicín, fungicida para evitar la contaminación con microorganismos patógenos del suelo.

El porcentaje de plántulas obtenidas a partir de germinación de embriones somáticos vía indirecta de papa cultivar Atlantic, fue de 25% las cuales presentaban las mismas características morfológicas que las obtenidas por embriogénesis somática directa en Fritolay-1867. Estas plántulas se sembraron en suelo bajo el mismo procedimiento arriba descrito y la diferencia consistió en que las plántulas del cultivar Atlantic duraron cinco semanas vivas; pasado este tiempo las plántulas fallaron al trasplante a suelo.

4.4. Contaminación

En ambas variedades y en los todos los experimentos realizados el porcentaje de contaminación fue de 0%, lo que permitió que se pudieran llevar a cabo exitosamente cada uno de los procesos de la embriogénesis somática.

A pesar de que durante todo el procedimiento desde la obtención de yemas para dar origen a las plantas *in vitro* como proveedoras de los explantes (mesófilo de hojas y segmentos de tallo), durante la obtención de los embriones somáticos por ambas vías y hasta la obtención de las nuevas plántulas que se obtuvieron de estos embriones, no se detectó la presencia de ningún contaminante.

Después de dos años y medio de manipulación de ambos cultivares en el laboratorio, se presentó una bacteria de color anaranjado con pequeñas protuberancias creciendo sobre el medio de cultivo y también sobre explantes, callos y plantas de papa del cultivar Fritolay-1867. Esta bacteria en ningún momento apareció en Atlantic.

Muestras de esta bacteria se hicieron analizar para su identificación en el Laboratorio de Diagnóstico en Fitobacterias, del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Basándose en pruebas bioquímicas y en siembras de la bacteria en los medios YDC, CPG y NBY, se diagnosticó que se trata de una bacteria habitante del suelo del género *Cellulomonas sp.*

V. DISCUSIÓN

5.1. Embriogénesis somática directa

La calidad de los embriones somáticos obtenidos *in vitro* está influenciada por cada paso de la embriogénesis somática: iniciación, inducción, regeneración y maduración. El éxito final de la calidad de un embrión somático se traduce en si se convierte o no en una planta (Ortega, 1993).

La embriogénesis somática directa ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es producto de la función realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante. Así el empleo de la auxina es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas, no siendo la única forma para lograr este fenómeno. La concentración mínima y la duración del tratamiento con 2,4-D requerido para un efecto inductor es diferente para varios genotipos y especies, y la inducción de la división celular como una respuesta a esta auxina, puede resultar en un crecimiento polarizado coordinado para la formación de un embrión (Pérez Ponce, 1998).

Es muy importante la elección de la auxina en función del objetivo, como por ejemplo el ácido β -indolpropiónico (IPA), el ácido β -indolacético (IAA) y el ácido β -indolbutírico (IBA), son auxinas relativamente débiles y resultan ineficaces para la formación de

embriones somáticos (Box y Terrón, 1988); por lo que McKersie y Bowley (1998), concluyen que no se puede sustituir a este regulador del crecimiento, sólo se puede combinar con otros, ya que la respuesta de estos compuestos es absolutamente compleja. El thidiazuron como tratamiento inductivo de la embriogénesis en el cultivar Fritolay-1867, muestra que es posible el uso de otras auxinas capaces de modular con eficacia este proceso, lo mismo se observó al utilizar el 2,4,5-T en alfalfa (Redenbaugh, 2000). En el trabajo realizado en papa cultivar Jyothi en explantes de hoja, se observó que cuando se suministró 2,4-D solo en el medio de cultivo produjo callos blancos y friables pero sin centros meristemáticos, pero cuando esta auxina se combinó con BA indujeron tejido nodular que produjeron embriones somáticos (JayaSree *et al.*, 2001).

La selección del tejido embriogénico de acuerdo a sus características físicas asociadas a su capacidad embriogénica, durante subcultivos, será esencial y se debe de tratar de seleccionar las masas compactas de embriones globulares, los que darán lugar a embriones en estado cotiledonal cuando se retiren las auxinas del medio, y ser transferidos a un nuevo medio para su maduración (Anónimo d, 2000). Dicho procedimiento se llevó a cabo cuando se tomaron los embriones en estado globular del cultivar Fritolay-1867 y fueron transferidos al medio con ácido giberélico, para su maduración. Cuando los embriones alcanzaron su madurez fisiológica, perdieron su color verde y adquirieron una coloración café claro; lo anterior sucedió de la sexta a la octava semanas después de que los embriones primero alcanzaron la etapa del cotiledón; aunque algunos autores reportan que esta coloración puede cambiar a un tono amarillo cremoso en esta etapa (Anónimo d, 2000).

La etapa morfológica que presentaron los embriones somáticos del cultivar Fritolay-1867 correspondiente a la sexta semana, coincide con lo reportado por Payne, *et al.* (1992), donde sugieren un desarrollo intermedio entre el estado globular y el estado de corazón, mencionando que en la transición de la expansión isodiamétrica característica del embrión globular, a una extensión longitudinal resulta en un embrión “oblongo”. La emergencia de cotiledones puede ser usada entonces para distinguir entre el estado oblongo y el de corazón.

Por otra parte JayaSree *et al.* (2001), mencionan que la transición de embriones de forma globular a polar es un paso crítico en la embriogénesis, de tal forma que para que se de un desarrollo normal de embriones somáticos requiere de un tiempo preciso y una regulación espacial de la división, enlongamiento y diferenciación celular. Los reguladores del crecimiento pueden tener múltiples efectos en estos procesos, dependiendo de la concentración o en el momento de aplicación en los diferentes estados en que se encuentren las estructuras embrionarias.

Durante el proceso de maduración de los embriones los reguladores de crecimiento como el ácido giberélico también parecen ser esenciales en la obtención de buenos resultados, al promover el desarrollo de raíces y brotes de explantes de hoja de papa cv. Fritolay-1867, como ocurrió en este trabajo. JayaSree y colaboradores (2001), citan que en su estudio el ácido giberélico promueve el desarrollo de brotes, ya que la adición de este regulador en el medio de cultivo fue requerido tanto para el desarrollo como para la elongación de los brotes, y que en su ausencia solo se formaron estructuras parecidas a nódulos que no desarrollaron posteriormente.

Se ha podido comprobar que en muchos casos que en el embrión somático durante la maduración puede artificialmente inducirse dormancia (Gray y Purohit, 1991 citados por Pérez Ponce, 1998), y para romper la misma se pueden emplear tratamientos con frío o aplicaciones de ácido giberélico, lo cual provoca una aceleración en el crecimiento y germinación del embrión.

5.2. Embriogénesis somática indirecta

Pérez Ponce (1998), menciona que existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia, y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia. En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones por callo; estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón, torpedo y maduro). Mientras que en la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque estos grupos aparecen en un número menor de callos. El desarrollo de los embriones somáticos en papa var. Atlantic, corresponde al tipo de embriogénesis somática de alta frecuencia, ya que estos aparecieron hasta las 20 semanas de incubación y no se desarrollaron en todas las etapas sino que sólo permanecieron en un estado globular, aunque estos fueron capaces de germinar y dar origen a nuevas plantas; otra característica que presentaron fue la formar los embriones en un pequeño número de callos.

Con frecuencia se precisa de una elevada concentración de auxina para la inducción embrionaria, sin embargo para el desarrollo del embrión se debe bajar la concentración de auxina, y en algunos casos retirar completamente este regulador del medio (Pierik, 1990). Un aspecto que es importante tomar en consideración en este trabajo, es que los embriones obtenidos, durante su fase inicial requirieron de concentraciones altas de auxinas (2,4-D, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para la formación de callo embriogénico, y posteriormente este requerimiento disminuyó ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), hasta eliminar por completo a este regulador sustituyéndolo por Thidiazuron y Kinetina, que fue en el momento en el que se dio origen a los embrioides y por último a los embriones somáticos maduros.

El desarrollo de embriones somáticos en zanahoria (al igual que en papa cv. Atlantic) es un proceso que se lleva a cabo mediante dos pasos, cada uno requiere de diferentes medios. Los callos son iniciados y multiplicados en un medio rico de auxinas. La auxina generalmente usada es el 2,4-D en un rango de 0.5 a $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En este medio de proliferación los callos se diferencian en grupos localizados de células meristemáticas llamadas “grupos embriogénicos” (EC). En subcultivos repetidos en el medio de proliferación los grupos embriogénicos continúan su multiplicación sin aparecer todavía como embriones maduros. Si los grupos embriogénicos son transferidos a un medio con bajos niveles de auxina, o sin ésta (medio para el desarrollo de embriones), ellos desarrollan en embriones maduros.

La presencia de una auxina en el medio de proliferación parece esencial para que el tejido desarrolle embriones y en el medio de desarrollo los embriones maduren. Por lo

tanto el medio de proliferación puede ser considerado como el “medio inductor” para embriogénesis somática, y cada grupo embriogénico como un embrión desorganizado (Bhojwani y Razdan, 1983).

En el presente trabajo se pudo observar en forma clara como desarrollaron grupos embriogénicos tanto a una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y en ausencia de éste, formado embriones posteriormente en presencia de Thidiazuron y Kinetina. Aunque parece que el tiempo en que los callos se subcultiven en los medios con o sin la auxina juega un papel muy importante, ya que se obtuvo mayor masa fresca de los callos y mayor número de embriones cuando se hicieron incubar durante 15 días sin el 2,4-D; por el contrario los callos con grupos embriogénicos desarrollaron en mayor peso y como consecuencia en mayor número de embriones cuando se subcultivaron por ocho y 21 días en el medio con 2,4-D. Este comportamiento en cuanto al tiempo a los 15, ocho y 21 días fue igual tanto para Thidiazuron como para Kinetina. Por otra parte se obtuvieron mayor número de embriones maduros con Thidiazuron a los ocho y 15 días con y sin 2,4-D respectivamente, y con Kinetina a los 21 días en subcultivos anteriores con 2,4-D. El análisis de Correlación nos indica en todos los casos que efectivamente los callos con mayor masa fresca fueron aquellos que dieron origen a un mayor número de embriones maduros, por lo que se confirma que estos callos se diferencian en grupos localizados de células meristemáticas llamadas “grupos embriogénicos que serán los que desarrollen en embriones; al presentar este grupo de células su peso es mayor que en aquellos callos que no tienen las características embriogénicas.

Así, se ha establecido que los explantes tratados con 2,4-D y Kinetina producen callos y embriones somáticos, como una respuesta dependiente del genotipo. Las auxinas varían en su eficacia para inducir esta respuesta, como por ejemplo el ácido indolacético (IAA) no es efectivo, el ácido naftalenacético (NAA) promoverá la formación de callos, y el 2,4-D promoverá tanto la formación de callos como la iniciación de los embriones. Esto es una aparente respuesta tiempo-dosis a las auxinas: altas dosis durante períodos cortos, o bien dosis bajas durante períodos más largos, y ambos son efectivos. Estas dosificaciones requeridas varían entre los genotipos tratados. Por otra parte, la eliminación de las auxinas del medio es la llave que permite a las células proembriogénicas iniciar el desarrollo para poder establecer el estado globular de los embriones (Redenbaugh, 1993). Cuando estas células proembriogénicas son removidas de un medio que contiene auxinas a uno libre de éstas, se da usualmente una correspondencia uno a uno entre el número de proembriones y el número de embriones somáticos que maduran (Green *et al.*, 1987).

Wochok y Wetherell (1971) citados por Bhojwani y Razdan (1983), sugieren que el 2,4-D induce supresión en la maduración de los embriones y que puede ser a través de la producción de etileno endógeno. El ácido 2-clorofosfónico (Ethefon), que libera etileno en el tejido de las plantas, también suprime el desarrollo de embriones somáticos maduros sin una apreciable reducción en el crecimiento y multiplicación de los grupos embriogénicos en cultivos en suspensión en zanahoria. Además, esto ha sido mostrado cuando el tejido crece en medio con auxina produce más etileno que cuando crece en un medio sin auxina. Altos contenidos de etileno pueden resultar en aumentar la actividad de la celulasa, la pectinas, o ambas, causando colapso de los grupos embriogénicos antes

de la polaridad que es establecida en los proembriones para adelantarse en desarrollo organizado.

Por otra parte, la composición del medio de cultivo es crítica y la atención ha sido siempre enfocada en las fuentes y niveles de nitrógeno, especialmente en la reducción de este (Green *et al.*, 1987). En estos términos el balance de NH_4^+ y NO_3^- como fuentes de nitrógeno es un paso simple en el medio de regeneración, pero ha sido reconocido como un momento crítico para la formación de embriones (Redenbaugh, 2000); lo que fue fácil de observar en la formación de embriones somáticos en el cultivar Atlantic, ya que una vez que los callos presentaron cambios cualitativos como consistencia muy friable, masa callogénica homogénea y coloración de café-blanquecina a café-amarillenta, se encontró que un estímulo en la formación de callos embriogénicos fue la reducción de las sales MS diluyendo a 75% los KNO_3 y a 25% los NH_4NO_3 ; lo que concuerda con lo citado por Green *et al.* (1987). Para la ocurrencia de embriogénesis en células cultivadas de zanahoria, la presencia de una cantidad mínima de NH_4 endógeno es esencial; a menos que estos niveles umbrales sean logrados, la célula no puede lanzarse a desarrollar embriones, este nivel de NH_4 dentro de la célula es logrado con muy bajos niveles de NH_4 exógeno, pero requiere un nivel comparativamente alto de NO_3 (Bhojwani y Razdan, 1983).

5.3. Germinación

El criterio que permite reconocer un embrión somático es la *estructura bipolar*, que desarrolla precoz y simultáneamente un meristemo de tallo y un meristemo de raíz. Sin

embargo un problema esencial es el de los factores que afectan a la polaridad celular y a la orientación de los primeros planos de división conducentes a la formación de estructuras bipolares con funcionamiento concomitante de un meristemo gemmular y de un meristemo de raíz (Box y Terron, 1988).

La germinación o conversión de los embriones a plántulas ha sido usada sólo como medios de examinación de la calidad del embrión después de los tratamientos en los medio de elongación y maduración en donde han sido manipulados (Redenbaugh, 1993).

En la mayoría de los trabajos realizados, se hace poca distinción entre los procesos de germinación y conversión. La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o el brote, mientras que la conversión es definida por Stuart y Strickland (1984) citados por Pérez Ponce (1998), como la sobrevivencia y desarrollo en fase de propágulo en condiciones ambientales *ex vitro* o sea en el suelo. En los embriones obtenidos en forma directa a partir de explantes de hojas del cultivar Fritolay-1867, todos los embriones que presentaron la habilidad para germinar, también fueron capaces de desarrollar propágulos los cuales se hicieron crecer en suelo bajo condiciones del laboratorio; aunque el porcentaje de estos embriones germinados fue tan solo de 5%. Las plántulas presentaron tallos raquíticos, etiolados, con poco vigor, además de follaje poco abundante y de tamaño pequeño; características que han sido reportadas para plantas que crecen bajo condiciones de cultivo, caracterizándose por presentar: tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de los tejidos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas

con baja funcionalidad, etc., como respuesta a la ausencia de las condiciones estresantes (Pérez Ponce, 1998).

En el caso de los embriones obtenidos a partir de callos de hipocótilos del cultivar Atlantic, se tuvieron diferentes porcentajes de formación de embriones somáticos para cada tratamiento; así para los ocho días con 2,4-D se tuvo 67.7% y sin 2,4-D tan solo 14.3%; a los 15 días con 2,4-D 15 % y sin 2,4-D 45.5%; a los 21 días con la auxina se obtuvo 54.8% y sin este regulador el 47.6%. En todos los casos los embriones tuvieron la capacidad de germinar (formaron raíces), pero tan solo el tratamiento a los 21 con 2,4-D y posteriormente con Kinetina, fue en el que se lograron plántulas completas haciéndose crecer en suelo. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro*.

Amirato (1987), menciona que el desarrollo de los ápices de brotes puede ser afectado por cambios en la secuencia de la división, crecimiento y maduración celular. En la secuencia normal, un pequeño número de células llega a ser reconocible como el presunto ápice del brote, después de que el embrión ha iniciado el desarrollo en su fase cotiledonal. El ápice del brote es pequeño, estas células no se dividen y llegan a ser quiescentes durante la maduración. Durante la germinación, es renovada la actividad de la división celular en el ápice del brote y la formación de un meristemo activo, con un mayor número de células que el ápice embriogénico. La transición de ápice embriogénico a ápice de brote puede ocurrir directamente sin la intervención de una fase de quiescencia o dormancia. Como quiera, esta transición puede ocurrir mientras la fase cotiledonal es iniciada. Los incrementos en la división y crecimiento celular en este

tiempo pueden generar una región apical agrandada. Las células dentro del meristemo apical del brote pueden también vacuolarse en forma precoz. El ápice resultante puede entonces desarrollarse tan aberrantemente, que no puede crecer normalmente. Lo anterior pudo ocurrir en todos los tratamientos en donde los embriones solo fueron capaces de dar origen a raíces.

En cuanto al hecho de la obtención de plantas a partir de embriones somáticos por ambas vías, estas no pudieran sobrevivir por demasiado tiempo hasta ser transferidas a invernadero, puede deberse a que durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas. Todos estos cambios provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al transplante a las condiciones ambientales (Pérez Ponce, 1998). Aunque se logró la germinación y en algunos casos la conversión de los embriones de ambas variedades, las plantas que fueron transferidas a suelo sobrevivieron durante tres semanas solamente. Lo anterior indica que las plantas en el paso de las condiciones del cultivo *in vitro*, a las ambientales, no fueron capaces de adaptarse a las nuevas condiciones. Durante las primeras dos semanas después del transplante es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular en este período las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten, ya que este período es crítico en la propagación de plantas e incluso algunos autores mencionan que es donde ocurre el mayor porcentaje de pérdidas (Pérez Ponce, 1998).

El proceso de aclimatación debe realizarse teniendo la precaución de permitirles a las plantas *in vitro* habituarse de forma gradual a una humedad relativa más baja, ya que en las plantas procedentes de cultivo de tejidos, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conexión vascular; así las plantas producidas *in vitro* que han pasado a suelo, pueden sufrir estrés hídrico durante las primeras horas de aclimatación. Otro aspecto que puede estar afectando la sobrevivencia de las plantas es que las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan en forma adecuada *in vivo*, por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración; es de vital importancia entonces que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible, cuando pasan a condiciones *in vivo*. Una forma de realizar una aclimatación directamente, después de la fase *in vitro*, es manteniendo *in vivo* una humedad relativa alta y manteniendo una baja irradiación y temperatura (Pierik, 1990). Aunque no siempre da resultado como en el caso de los cultivares Fritolay-1867 y Atlantic, a pesar de mantener las condiciones arriba mencionadas para lograr la aclimatación, por lo que nos resta pensar que tal vez otros factores de resistencia intrínsecos a las variedades pueden estar en juego.

5.4. Contaminación

Los microorganismos pueden introducirse en el proceso de cultivo *in vitro* de plantas tanto con el explante inicial como en el laboratorio. De esta forma, se reportan contaminantes endógenos (también conocidos como latentes o subliminares) cuando

aparecen asociados al explante, y por otra parte se alude a aquellos microorganismos que se introducen en el laboratorio en cualquier momento del proceso (Pérez Ponce, 1998).

Cuando se reporta contaminación endógena se hace referencia a bacterias patógenas o no, que son consideradas como los contaminantes más comunes y las que ocasionan los problemas más serios. Así en la micropropagación de papa, cultivar Desireé, *Enterobacter agglomerans* fue hallada como contaminante de alta frecuencia de aparición en la fase de multiplicación. Esta bacteria se observó después de varios subcultivos donde no se había apreciado visualmente contaminación bacteriana (Pérez Ponce, 1998). Lo mismo ocurrió en el caso de *Cellulomonas* con el cultivar Fritolay-1867, ya que esta apareció después de muchos subcultivos sin apreciarse con anterioridad, lo que hace pensar que igualmente esta bacteria presenta un carácter endofítico. Es muy común para el caso de las bacterias la afirmación de que los cultivos están libres de contaminantes por apreciación visual, debida a la ausencia de crecimiento en el medio de cultivo hasta mucho tiempo después de que fueron introducidas.

Algunas plantas parecen tener mayor predisposición que otras para alojar bacterias entre sus tejidos. Esto es mucho más problemático cuando los medios utilizados en los cultivos *in vitro* (medio de Murashige y Skoog, por ejemplo) a veces son poco favorables para su desarrollo y no es posible detectar la contaminación hasta varios subcultivos después de haberse realizado la siembra (Vidalie, 1986).

Es importante tratar de esclarecer si la bacteria contaminante no fue introducida en el laboratorio debido a técnicas inadecuadas de trabajo, ya que se menciona que

generalmente estos microorganismos contaminantes son habitantes del suelo (saprófitos o patógenos) que se encuentran en el ambiente. Así que los microorganismos pueden entrar al proceso productivo por: ineficiente desinfección de los explantes primarios utilizados en la fase de establecimiento, por inadecuada manipulación del material vegetal, deficientes técnicas de asepsia, incompleta esterilización del medio de cultivo, por fallas en el funcionamiento de las cabinas de flujo laminar, o a través del ambiente de las cámaras de incubación y el laboratorio en general (Pérez Ponce, 1998). Sin embargo, existe una razón principal para descartar que la contaminación por *Cellulomonas* se deba a algún factor arriba mencionado, ya que siempre se manejaron en forma conjunta ambas variedades, desde el momento en que se desinfectaron las yemas para tener tejido de multiplicación hasta la obtención de los embriones somáticos por las dos vías; por lo que si la bacteria hubiera entrado en el proceso por un manejo inadecuado en cualquier fase, ambos cultivares hubieran sido contaminados y no solamente e cultivar Fritolay-1867.

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron embriones somáticos vía embriogénesis somática directa a partir de explantes de hojas de papa del cultivar Fritolay-1867, cuando en el medio básico se adicionó Thidiazuron a dosis de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y se incubaron durante ocho semanas en oscuridad, y posteriormente en fotoperíodos de 16 horas luz en un medio con ácido giberélico a $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.
2. Los embriones obtenidos *in vitro* tuvieron la capacidad de germinar y formar nuevas plantas de papa cultivar Fritolay-1867, Estas plántulas fueron transferidas a suelo, en donde permanecieron por tres semanas, pasado este tiempo las plántulas no sobrevivieron a la aclimatación.
3. En el cultivar Atlantic de papa fueron obtenidos embriones somáticos vía embriogénesis indirecta a partir de callos de explantes de hipocótilos, cuando en el medio base se adicionó 2,4-D a dosis de $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ incubándose durante ocho semanas en oscuridad, y posteriormente en fotoperíodos de 16 horas luz en un medio que contenía 2,4-D ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 21 días, y finalmente subcultivarlos en un nuevo medio con Kinetina a una concentración de $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por 12 semanas más.
4. Los embriones obtenidos por embriogénesis somática indirecta tuvieron la capacidad de germinar y formar nuevas plantas de papa cultivar Atlantic. Estas plántulas se sembraron en suelo donde duraron con vida solamente cinco semanas;

esto es dos semanas más que las plántulas obtenidas por embriogénesis somática indirecta con el cultivar Fritolay-1867.

5. Los explantes de hojas de papa del cultivar Atlantic, presentaron una respuesta negativa a la iniciación de la embriogénesis somática directa, al necrosarse a la tercera semana de incubación.
6. Del análisis de la varianza y los intervalos de confianza para las medias se determinó que existieron diferencias significativas entre el promedio de embriones obtenido en el cultivar Fritolay-1867, de la quinta a la novena semanas de incubación. Así, el número de embriones que se formaron durante la 5^a, 6^a y 7^a semanas fueron incrementando considerablemente, pero a partir de la octava semana los embriones iniciaron su proceso de maduración.
7. El cultivar Fritolay-1867, no fue capaz de formar embriones en forma indirecta a partir de explantes de hipocótilo, ya que se necrosaron durante la segunda semana de incubación.
8. Los callos con mejores características de textura, consistencia, coloración y mayor masa fresca se obtuvieron cuando se dejaron durante 21 días en el medio de cultivo con $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D, para posteriormente cultivarlos en el medio con Kinetina. Y el análisis de Correlación determinó que los callos con mayor peso fresco fueron aquellos que dieron origen a un mayor número de embriones, esto es que existe una correlación alta y positiva entre ambos factores.

9. La utilización de reguladores de crecimiento de bajo costo y fácil adquisición como son el 2,4-D, Thidiazuron, ABA, L-Glutamina y Kinetina, en las distintas fases de la embriogénesis somática de papa de los cultivares Atlantic y Fritolay-1867, fueron eficaces en la obtención de embriones somáticos de papa y redujeron los costos de implementación.
10. Concentraciones bajas de NO_3 fueron utilizadas para inducir la embriogénesis somática en el cultivar Atlantic, cuando se pasaron a un medio con bajas concentraciones de 2,4-D y en fotoperíodos de 16 horas luz y temperaturas altas (28°C).

VII. LITERATURA CITADA

Aitchison, P.A., M.M. Macleod and Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Street (de.), Plant tissue and cell cultures. Univ. of California. Press, Berkley. pp. 267-306.

Alcalá De M., D., Y. Rodríguez De E., A. Marcano J. y J. Pérez. 1990. Evaluación de las pérdidas totales ocurridas en tres sistemas de almacenamiento de semilla de papa (*Solanum tuberosum*). Agronomía Tropical 40(4-6)263-280.

Ammirato, V.P. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. Plant Tissue and Cell Culture. Alan R. Liss, Inc. pp. 57-81.

Anónimo a. s/a. Notes on poisoning: potato.
http://sis.agr.ca/pls/pp/ppack.info?p_null=Solanum+tuberosum&p_x=px&p_type=all&p_sci=comm.

Anónimo b. s/a. Papa: Frutos y Semillas.
http://www.puc.cl/sw_educ/cultivos/papa/papa.htm.

Anónimo c. s/a. Potato products international LTD.
<http://www.bejoseeds.com/potato/eshome.html>.

Anónimo d. 2000. Somatic embryogenesis of Soybean.
<http://mars.cropsoil.uga.edu/homesoybean/somprot.html>

Bapat, V.A. 2000. Synthetic seeds: a novel concept in seed biotechnology. Barc News Letter No. 200. Nuclear Agriculture and Biotechnology.
http://www.barc.ernet.in/webpages/letter/newsletter_year_2000/websep2000.htm.

Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. Plant tissue culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publ. B.V. Amsterdam. pp.71-112.

Box, J.M.M. y U.Terrón P. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 108-120 pp.

Cardenas D., L. M. 1989. Embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Maestro en Ciencias en Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México. 119 p.

Chen, Z. and W.R. Sharp. 1990. Potencial of biotechnology in perennial crop improvement. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol 6: Perennial Crops.(Z. Chen, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, M.R. Sondahl). McGraw-Hill Publishing Company. pp. 3-22.

Coleman, K.W. and E.S. Coleman. 2000. Modification of potato microtuber dormancy during induction and growth *in vitro* o *ex vitro*. American Journal of Potato Research. 77:103-110.

Coleman, K.W., J.D. Donnelly and E.S. Coleman. 2001. Potato microtubers as research tools: a review. American Journal of Potato Research. 78:47-55.

Cosgrove, R.D. 1999. Somatic embryogenesis. Crop Physiology Lab. Plant Science 435. <http://www.uwrf.edu/~dc01/somatlab.html>

De Amesti, E. 2000. Papas: cultivo con alto potencial de rendimientos. http://www.agrogestion.cl/ga_CultivoPapas.htm.

Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1984. Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press., N.Y. pp. 89-97.

Esna-Ashari, M. and T.A. Villiers. 1998. Plant regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP). Potato Research. 41(4):371-382.

Espinola F.,N. 2001. Glicoalcaloides: toxinas naturales de la papa. Boletín de la papa- Vol. 3, No.15. <http://redepapa.org/boletincuarentacinco.html>.

Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Bolivia, PROINPA-CID-CIP. 372 p.

Ezeta N., F. 1999. Producción de semilla de papa en América latina. Boletín de la papa Vol. 1, No. 5. <http://redepapa.org/boletincinco.html>

Fiebert, A.K., G. Mix-Wagner and K.D. Vorlop. 2000. Regeneration of *Solanum tuberosum* L. cv. Tomensa: induction of somatic embryogenesis in liquid culture for the production of "artificial seed". Landbauforschung Volkenrode 50(3-4):199-202.

Green, C.E., D.A. Somers, W.P. Hackett and D.D. Biesboer. 1987. Plant tissue and cell culture. Alan R. Liss, Inc. pp. 57-81.

Gómez G.,L., E. Jaramillo O., S. Jaramillo y R. Hoyos. 1997. Regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) a partir de tejido foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 6 p.

Hawkes, J.G. 1978 a. History of the potato. In: The Potato Crop (P.M. Harris, ed.) Halsted Press, New York. pp. 1-14.

Hawkes, J.G. 1978 b. Biosystematics of the potato. In. The Potato Crop (P.M. Harris, ed.) Halsted Press, New York. pp. 15-69.

Hernández M.,J., D. Ochoa M., y J.S. Sandoval I. 2001. Evento de aprobación en certificación fitosanitaria de papa. Tomo I "Base Técnica". Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 75 p.

Hidrobo L.,J.R. 2002. Caracterización morfo-histológica y bioquímica del proceso de embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.) utilización de biopreparados cubanos de producción comercial. Universidad Agraria de la Habana. Facultad de Agronomía. La Habana, Cuba. 99 p.

Jarret, R.L., S. Salazar y S. Fernandez R. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. Hort. Science 19(3):397-398. USA.

JayaSree, T., U. Pavan, M. Ramesh, A.V. Rao, K. Jagan Mohan Reddy and A. Sadanandam.2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64:13-17.

Jo Ann, A., D.S. Fujii and K. Redenbaugh. 1993. Planting artificial seeds and somatic embryos. In: Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop Improvement. Redenbaugh, K. CRC Press, Inc. pp.183-202.

Kepeczynski, J. s/a. Plant growth regulators and somatic embriogenesis.
http://www.biotech.univ.gda.pl/imprezy/IAPTC/sessions/sess_8.html

Lam, S.L. 1975. Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. *Am. Potato J.* 52:103-106.

Lewis, H. 1966. Speciation in flowering plants. *Science* 152:167-172.

Lister, C and J. Monro. 2000. La nada humilde papa. Commercial Grower.
Boletín de la Papa - Vol. 2, No. 23. <http://redepapa.org/boletinveintinueve.html>

Martínez R.,R. 1997. Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en Nim. *Azadirachia indica* A. Juss. (un árbol de uso múltiple). Tesis Maestría en Ciencias. Div. de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 98 p.

McKersie, D.B. 1996. Somatic embryogenesis.
<http://www.oac.uoguelph.ca/www/CRSC/embryo/synseeds.html>

Mckersie, D.B. and R.S. Bowley. 1998. Somatic Embryogenesis: Forage Improvement using Synthetic Seeds and Plant Transformation. In: *Molecular and Cellular Technologies for Forage Improvement*. Crop Sciencie of America. Special Publication 26:117-134.

Miller, S.A. and L. Lipschutz. 1984. Root and tuber crops. Potato. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 3: Crop Species. (P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, Y. Yamada). Macmillan, New York. pp. 291-326.

Moré H., O. Y E. González M. 2000. Empleo del oligopectato Pectimorf sobre el desarrollo de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum*, L.).
<http://redepapa.org/documentosred.html>

Moré H., O., M. Hernández M., M. Núñez, E. González M., y G. Verde. 2000. Formación de callos embriogénicos en papa con el empleo de análogos de brasinoesteroides. <http://redepapa.org/documentosred.html>

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

Núñez M. 1999. Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la Agricultura. Reseña bibliográfica. Cultivos Tropicales. Vol: 20 (3): 63-72.

Ortega M., D. 1993. Semillas artificiales. En: La Agricultura del Siglo XXI. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp. 173-188.

Payne, G.F., V. Bringi, C. Prince and M.L. Shuler. 1992. Plant cell and tissue culture in liquid systems. Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York, Barcelona. pp. 311-326.

Peña V., L.A. 2000. Fisiología y manejo de tubérculos-semilla de papa. Boletín de la papa Vol. 2, No. 2. <http://redepapa.org/boletincho.html>

Pérez Ponce J., N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. 390 p.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 209-226.

Plissey, E. 2000. El complejo proceso de almacenar la papa. * Traducción libre del artículo *Understanding the potato helps with storage management planning* (http://www.rrvpotatoes.org/VPGmag/Sep_plissey.pdf), publicado por el *Valley Potato Grower* en su edición de septiembre de 1999. Boletín de la Papa - Vol. 2, No. 20. <http://redepapa.org/boletinveintiseis.html>

Price, M. 2000. Del Banco de Semillas de ECHO: La semilla botánica de papa tiene muchas ventajas. http://www.echonet.org/tropicalag/ednissues/text_span/edn67.spatext.html

Redenbaugh, K. 2000. Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement. CRC Press, Inc. 255 pp.

Rousselle, P., Y. Robert and J.C. Crosnier. 1999. La patata. Producción, mejora, plagas y enfermedades, utilización. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. 607 p.

Seabrook, J.E.A. and L.K. Douglass. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Reports* 20(3):175-182.

Seabrook, J.E.A., L.K. Douglass and C.C.G. Tai. 2001. Segregation for somatic embryogenesis on stem-internode explants from potato seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:69-73.

Soon, K.H., J.J. Heung, C.K. Hwa, J.Y. Hee and H. Joung. 1999. Effects of rindite on breaking dormancy of potato microtubers. *American Journal of Potato Research*. 76:5-8.

Toshihiro, K., H. Katsumi and K. Hiroshi. 1997. Effects of cell density on carrot somatic embryogenesis. *Plant Biology*.
<http://www.rycomusa.com/aspp1997/47/0963.shtml>

Vidalie, H. 1986. Cultivo *in vitro*. Edición Científica, S.A. de C.V. México, D.F. pp. 141-162.

VonAderkas, P. and M.J. Bonga. 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20,921-928. Heron Publishing, Victoria, Canada.
<http://www.heronpublishing.com/tree/files/domain/data/contents/freetext/vonaderk.html>

VIII. ANEXO

Anexo 1. Análisis de la Varianza para Número de Embriones

Source	DF	SS	MS	F	P
Semana	4	1991.4	497.9	32.20	0.000
Explante	4	3136.2	784.1	50.72	0.000
Error	16	247.4	15.5		
Total	24	5375.0			

Anexo 2. Intervalos de Confianza al 95% para la medias basados en la Desviación Estandar ponderada para Número de Embriones

<u>Nivel</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>DevSt</u>	
5	5	12.80	6.98	(-----*-----)
6	5	23.80	13.77	(-----*-----)
7	5	30.00	13.55	(-----*-----)
8	5	33.00	13.77	(-----*-----)
9	5	39.00	15.31	(-----*-----)
DevSt Ponderada = 13.01				-----+-----+-----+-----
				15 30 45

Anexo 3. Análisis de la Varianza para masa fresca de callos en las tres diferentes fechas.

Resultados para: Presencia de Embrión 0, Color C, Día 8

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Analisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.010591	0.010591	21.27	0.000
Error	26	0.012944	0.000498		
Total	27	0.023536			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	18	0.04225	0.01270	(---*---)
1	10	0.08284	0.03367	(---*---)
Pooled StDev = 0.02231				0.040 0.060 0.080 0.100

Resultados para: Presencia de Embrión 0, Color C, Día 15

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Analisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.00836	0.00836	1.00	0.325
Error	32	0.26839	0.00839		
Total	33	0.27675			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	18	0.07695	0.12290	(-----*-----)
1	16	0.04553	0.02784	(-----*-----)
Pooled StDev = 0.09158				0.000 0.035 0.070 0.105

Resultados para: Presencia de Embrión 0, Color C, Día 21

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Analisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.009371	0.009371	11.06	0.003
Error	23	0.019493	0.000848		
Total	24	0.028864			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	11	0.04965	0.01091	(-----*-----)
1	14	0.08866	0.03752	(-----*-----)
Pooled StDev = 0.02911				0.040 0.060 0.080 0.100

Resultados para: Presencia de Embrión 1, Color C, Día 8

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Análisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.00852	0.00852	1.65	0.228
Error	10	0.05160	0.00516		
Total	11	0.06012			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	2	0.06315	0.01464	(-----+-----+-----+-----+)
1	10	0.13464	0.07556	(-----+-----+-----+-----+)
Pooled StDev = 0.07183				0.000 0.070 0.140

Resultados para: Presencia de Embrión 1, Color C, Día 15

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Análisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.00066	0.00066	0.54	0.488
Error	6	0.00729	0.00121		
Total	7	0.00795			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	5	0.08122	0.04144	(-----+-----+-----+-----+)
1	3	0.10000	0.01445	(-----+-----+-----+-----+)
Pooled StDev = 0.03485				0.060 0.090 0.120 0.150

Resultados para: Presencia de Embrión 1, Color C, Día 21

One-way ANOVA: Peso versus 24D

Análisis de Varianza para Peso

Source	DF	SS	MS	F	P
24D	1	0.01311	0.01311	3.94	0.075
Error	10	0.03327	0.00333		
Total	11	0.04639			

Individual 95% CIs For Mean
Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	
0	5	0.06676	0.01582	(-----*-----)
1	7	0.13381	0.07334	(-----*-----)
Pooled StDev = 0.05768				0.050 0.100 0.150