



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

*"Enseñar la Explotación de la
Tierra, no la del Hombre"*

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Respuestas embriogénicas en papa (*Solanum tuberosum*
L.) empleando diferentes explantes cultivados *in vitro***

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**



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

PRESENTA:

PEDRO HUMBERTO MARTÍNEZ ROJO

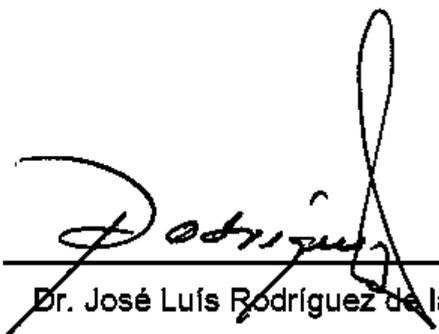
Chapingo, Edo. de México, Marzo de 2014.



Instituto de Horticultura

La presente tesis titulada: “Respuestas embriogénicas en papa (*Solanum tuberosum* L.) empleando diferentes explantes cultivados *in vitro*.”, tesis realizada por el Ing. Pedro Humberto Martínez Rojo bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

DIRECTOR: 
Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: 
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR: 
Dr. Juan Martínez Solís

DEDICATORIA

A DIOS que me dio salud y fortaleza para realizar estos estudios de posgrado.

A mi madre **Blanca Esthela Rojo Acosta** por siempre estar para apoyarme e impulsarme a cumplir todos mis objetivos, motivarme cada día para seguir adelante, por ser mi pilar más fuerte y sabia consejera todo el tiempo

A padre **Celso Martinez Hernández** que donde quiere que este sé que me cuida y está orgulloso de mí por haber realizado mis estudios de maestría, por haber sido pieza fundamental para realizar estos estudios y motivarme hasta el último minuto a salir adelante.

A mi mamá **Claudia Berenice Martinez Rojo** por alentarme a cumplir mis objetivos y apoyarme a continuar mis estudios y estar presente a pesar de estar lejos.

A **Rogelio Galindo Armenta** por ser un gran apoyo y alentarme a seguir adelante.

A mis tías **Blanca Zulema Martinez Rojo** y **Xóchitl Eréndira Martinez Rojo** por ser parte importante de mi vida y jugar un papel importante durante mi formación de niño, por brindarme ese cariño tan grande. A mi tío **Joecepascual Martinez Rojo** por motivarme a continuar con mis estudios y ser un gran ejemplo a seguir. Más que mis tíos los considero mis hermanos por la relación que hemos tenido a lo largo de nuestras vidas.

A mis sobrinos **Alonso, Cesar, José Pablo, Santiago, Luis Alfonso** y hermanos **Christopher, Jocelyn, Jackelyn, Jennifer, Joshua, Kimberly, Rogelio, Daniel, Gabriel †** por ser motivo de inspiración, por brindarle alegría a mi vida y motivarme para ser un buen ejemplo para ustedes.

A mis amigos y compañeros **Arturo** y **Gustavo** por haberme permitido formar parte de sus vidas a lo largo de nuestros estudios de maestría, por todas las alegrías y disgustos que vivimos a lo largo de estos dos años, espero contar siempre con su amistad. También a Jefferson, Daniel, Víctor, Rocio, Carmen, Alma, Alfredo, Toño, Magaly, y Estela, Gracias por su amistad.

A mi novia **Karen Ireyda Velázquez Lugo**, por permitirme formar parte de su vida, por siempre apoyarme a tomar decisiones difíciles, por siempre estar ahí cuando la necesitaba, por ser mi amiga y mi confidente, por brindarme su apoyo a lo largo de todos este tiempo, por tener siempre un buen consejo y representar todo eso que la familia no puede. Sin ti nada de esto sería posible. Espero seguir compartiendo nuestros logros y objetivos cumplidos.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por brindarme el apoyo económico a lo largo de este tiempo para realizar mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por convertirse en mi casa de estudios a lo largo de este periodo y brindarme el conocimiento que necesitaba para obtener este grado.

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O** por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este gran equipo de trabajo, que me permitió ampliar mi conocimiento y también convertirse en un amigo. Doc lo admiro mucho y gracias por el apoyo.

Al **Dr. José Oscar Mascorro Gallardo** por brindarme su conocimiento y cuestionamiento para un mejor desarrollo de esta investigación, muchas gracias por el apoyo brindado.

Al **Dr. Juan Martínez Solís** por haberme motivado a conseguir mis objetivos profesionales y motivarme a culminar en tiempo mis estudios de posgrado, gracias por el apoyo.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Cultivo de Tejidos por brindarme su apoyo a lo largo de este tiempo.

A la parte administrativa de la coordinación de posgrado del departamento de fitotecnia por facilitarme cualquier trámite lo largo de todo este tiempo.

A mis maestros **Dr. Legarías, Dra. Gisela, Dra. Rosario, Dr. Mascorro, Dr. José Luis, Dr. Enrique** por transmitir ese conocimiento hacia nosotros en cada uno de sus cursos, me llevo muy buena impresión del nivel de cada uno de ustedes. Los admiro.

Muchas gracias a todos ya que todos formaron parte importante para mi desarrollo académico en este tiempo y el desarrollo de esta investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

Pedro Humberto Martínez Rojo nació el 29 de noviembre de 1989 en la ciudad de Guasave, Sinaloa. Realizó sus estudios de licenciatura (2007-2011) en el Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora para obtener el título de Ingeniero en Biosistemas con la tesis: “Comportamiento de siete tipos de calabacita de especialidad (*Cucúrbita pepo*), por medio de su rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades, como una alternativa de producción en el valle del yaqui”

En enero de 2012 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola en la especialidad de Ingeniería Genética de Plantas en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo

Respuestas embriogénicas en papa (*Solanum tuberosum* L.) empleando diferentes explantes cultivados *in vitro*

Embryogenic response of potato (*Solanum tuberosum* L.) implemented different types of explants in tissue culture

Martínez-Rojo Pedro Humberto¹ y Rodríguez de la O José Luis²

RESUMEN

Se evaluaron 24 métodos de siembra de mesófilo hoja bajo cultivo *in vitro* para la formación de callos embriogénicos, también se promovió la respuesta embriogénica mediante el cultivo de células en suspensión y tejido derivado del tubérculo. Se utilizó como medio base las sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962), suplementado con tiamina (0.4 mg·L⁻¹), myo-inositol (100 mg·L⁻¹), ácido nicotínico (50 mg·L⁻¹), L-cisteína (25 mg·L⁻¹), sacarosa (30 g·L⁻¹) y agar (8 g·L⁻¹) ajustando a un pH de 5.7. Con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como 2,4-D y BA formando 4 tratamientos diferentes. La mejor respuesta para la obtención de callos embriogénicos utilizando el mesófilo de la hoja fue combinando el 2,4-D (1 - 10 mg·L⁻¹) y BA (0.1 - 0.5 mg·L⁻¹), posteriormente se evaluaron seis métodos de siembra (ET1, HI2, HT2, ET2, EI2, EI3) los cuales formaron embriones, en combinando GA₃ y Zeatina (1.0 mg·L⁻¹). Los callos presentaron incrementos de hasta 1.2 gramos en 4 semanas desarrollando estructuras globulares. La variedad FIANA mostro mejor respuesta embriogénica.

Palabras Clave: *Solanum tuberosum* L., *in vitro*, callos embriogénicos, estructuras globulares.

ABSTRACT

24 methods planting methods of the mesophyll were evaluated of the leaf in tissue culture, to the formation of embryogenic callus. Also were promoted embryogenic response by culturing cells in suspension and tuber tissue derived. Was used as base culture medium the inorganic salts of Murashige y Skoog (1962). Supplemented with thiamine (0.4 mg·L⁻¹), myo-inositol (100 mg·L⁻¹), nicotinic acid (50 mg·L⁻¹), L-cysteine (25 mg·L⁻¹), sucrose (30 g·L⁻¹) y agar (8 g·L⁻¹) adjusting the pH to 5.7, with different concentrations of growth regulators as 2,4-D and BA getting 4 treatments. The best response to the obtaining of embryogenic callus using mesophyll of the leaf was the combination of 2,4-D (1 - 10 mg·L⁻¹) and BA (0.1 - 0.5 mg·L⁻¹), after this were evaluate six planting methods, which formed embryos together with AG₃ and zeatina (1.0 mg·L⁻¹). The callus showed increase until 1.2 grams in 4 weeks developed globular structures, the variety FIANA showed the best embryogenic response.

Key words: *Solanum tuberosum* L., tissue culture, Embryogenic callus, globular structures.

1. Tesista
2. Directo

Índice

I.	Introducción	1
1.1.	Antecedentes.....	3
1.2.	Justificación.....	4
1.3.	Objetivos.....	5
1.3.1.	General.....	5
1.3.2.	Específicos.....	5
1.4.	Hipótesis.....	6
II.	Revisión de literatura.....	7
2.1.	Origen.....	7
2.2.	Producción.....	8
2.3.	La papa en México	8
2.4.	Taxonomía	9
2.5.	Características de la planta.....	10
2.6.	Propagación	10
2.7.	Variedades	11
2.8.	Semilla.....	12
2.9.	Fisiología del tubérculo.....	13
2.9.1.	Estado de reposo	13
2.9.2.	Estado de brotación apical.....	13
2.9.3.	Estado de brotación múltiple.....	14
2.9.4.	Estado de envejecimiento.....	14
2.10.	Cultivo <i>in vitro</i>	14
2.10.1.	Historia.....	14
2.10.2.	Etapas de cultivo <i>in vitro</i>	16
2.10.3.	Manejo <i>in vitro</i> de papa.....	18
2.11.	Organogénesis.....	19
2.12.	Embriogénesis.....	19
2.12.1.	Embriogénesis cigótica.....	20
2.12.2.	Maduración del embrión seguido de la germinación.....	21
2.12.3.	Embriogénesis somática.....	21
2.13.	Cultivo de células en suspensión.....	26
2.14.	Producción de callo a partir de tubérculo.....	26
III.	Materiales y Métodos.....	27

3.1. Ubicación del sitio de investigación	27
3.2. Obtención de embriones somáticos	27
3.2.1. Material vegetal	27
3.2.2. Explantes	27
3.2.3. Medio de cultivo	28
3.2.4. Siembra de mesófilo de la hoja	28
3.2.5. Métodos de siembra	30
3.2.6. Reguladores de crecimiento	31
3.3. Identificación de embriones somáticos	32
3.3.1. Medio de cultivo para la evaluación de embriones	32
3.3.2. Variables a evaluar	33
3.3.3. Análisis estadístico	34
3.4. Obtención de callo embriogénico a partir de tubérculo	34
3.4.1. Medio de cultivo	34
3.4.2. Obtención de explantes	35
3.4.3. Evaluación de la respuesta	35
3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de células en suspensión	36
3.5.1. Medio de cultivo	36
3.5.2. Obtención de explantes	36
3.5.3. Evaluación de crecimiento	36
3.6. Formación de callo a partir de brotes de tubérculo	36
3.6.1. Medio de cultivo	36
3.6.2. Obtención de explantes	37
III. Resultados y discusión	38
4.1. Cultivos embriogénicos	38
4.1.1. Respuesta método directo	38
4.1.2. Respuestas método indirecto	38
4.2. Obtención de callo a partir de discos de tubérculo	73
4.2.1. Contaminación	75
4.2.2. Oxidación	75
4.3. Cultivo de células en suspensión	76
4.3.1. Identificación de crecimiento	76
4.4. Formación de callo a partir de brotes de tubérculo	77
IV. CONCLUSIONES	79

V. Bibliografía.....	81
-----------------------------	-----------

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE CULTIVADA DE PAPA.....	10
CUADRO 2. DIFERENTES MÉTODOS DE SIEMBRA PARA LAS VARIEDADES A EVALUAR.	30
CUADRO 3. REGULADORES DE CRECIMIENTO USADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE CALLO. TRATAMIENTO INDIRECTO DE PRODUCCIÓN (TIP).....	31
CUADRO 4. REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS PARA LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS, TRATAMIENTO INDIRECTO DE FORMACIÓN (TIF).	31
CUADRO 5. REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE MANERA DIRECTA, TRATAMIENTO DIRECTO (TD).....	32
CUADRO 6. REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADO PARA INDUCIR BROTAÇÃO.....	32
CUADRO 7. REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA EVALUAR EMBRIONES.....	33
CUADRO 8. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE DISCOS DE TUBÉRCULO.....	34
CUADRO 9. CONCENTRACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE CALLO A PARTIR DE DISCOS DE TUBÉRCULO.	34
CUADRO 10. EFECTO DEL MÉTODO DE SIEMBRA SOBRE LA GANANCIA DE PESO, VAR. FIANA TRATAMIENTO 3.....	42
CUADRO 11. EFECTO DE LOS MÉTODOS DE SIEMBRA SOBRE LA GANANCIA DE PESO EN VAR. FIANA TRATAMIENTO 4.....	43
CUADRO 12. EFECTO DEL MÉTODO DE SIEMBRA SOBRE LA GANANCIA DE PESO DE LA VAR. NAU-6 TRATAMIENTO 3.....	44
CUADRO 13. EFECTO DE LOS MÉTODOS DE SIEMBRA EN LA GANANCIA DE PESO SOBRE LA GANANCIA DE PESO DE LA VAR. NAU-6 TRATAMIENTO 4.....	45
CUADRO 14. RELACIÓN ENTRE MEJORES MÉTODOS DE SIEMBRA.....	52
CUADRO 15. EFECTO DEL TRATAMIENTO 3 (TIP) SOBRE LA GANANCIA DE PESO DE LOS CALLOS....	55
CUADRO 16. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA LOS 6 MÉTODOS EVALUADOS EN TRATAMIENTO 4 (TIP).....	56
CUADRO 17. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS (TIF) SOBRE EL INCREMENTO DE PESO, PROVENIENTE DEL TRATAMIENTO 3.....	59
CUADRO 18. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS (TIF) SOBRE EL INCREMENTO DE PESO, PROVENIENTES DE TRATAMIENTO 4.....	60
CUADRO 19. COMPARACIÓN DEL INCREMENTO LOS TRATAMIENTOS INDIRECTOS DE FORMACIÓN DE EMBRIONES.....	61
CUADRO 20. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE NIVELES DE RESPUESTA DE CALLOS A PARTIR DE DISCOS DE TUBÉRCULO.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 PRODUCCIÓN DE PAPA A NIVEL LATINOAMÉRICA. (FUENTE: FAOSTAT, 2009)	9
FIGURA 2. ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE EXPLANTES.....	28
FIGURA 3. POSICIÓN DE EXTRACCIÓN DE EXPLANTES CON RESPECTO A LA HOJA.....	29
FIGURA 4. SIEMBRA DEL MESÓFILO DE LA HOJA EN FRASCOS TIPO GERBER.....	29
FIGURA 5. RESPUESTA DE CALLOS OBTENIDOS A PARTIR DE MESÓFILO DE LA HOJA CULTIVADO EN MEDIO MS CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$), INCUBADOS EN OBSCURIDAD DURANTE 6 SEMANAS.	40
FIGURA 6. PESO PROMEDIO DE LOS EXPLANTES CON RESPECTO A LA POSICIÓN DE LA HOJA, EL MEDIO UTILIZADO FUE MS CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO, INCUBADO UN PERIODO DE 6 SEMANAS EN OBSCURIDAD.....	47
FIGURA 7. PROMEDIO DE LOS EXPLANTES CON RESPECTO A LAS REGIONES INTERMEDIAS Y TERMINALES EN MEDIO MS, SUPLEMENTADO CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$), INCUBADO UN PERIODO DE 6 SEMANAS EN COMPLETA OBSCURIDAD.	48
FIGURA 8. PESO PROMEDIO DE LOS EXPLANTES OBTENIDOS DE LAS DIFERENTES POSICIONES DE LA LÁMINA FOLIAR, CULTIVADO EN MEDIO MS CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO.	49
FIGURA 9. PROMEDIO DEL EFECTO DE LA NERVADURA CON EXPLANTES CULTIVADOS EN MEDIO MS CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) EN COMPLETA OBSCURIDAD DURANTE 6 SEMANAS.	50
FIGURA 10. PROMEDIO DE LOS 6 MÉTODOS DE SIEMBRA SELECCIONADOS COMO LOS MEJORES, CULTIVADOS EN MEDIO MS CON 2,4-D ($10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) Y BA ($0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$) COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO.	53
FIGURA 11. EFICIENCIA EN LA RESPUESTA EN CUANTO AL INCREMENTO DE PESO DE EXPLANTES DE MESÓFILO DE LA HOJA, EN MEDIO MS, UTILIZANDO DE LOS EXPLANTES SEMBRADOS. UTILIZANDO $10 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$ DE 2,4-D Y $0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$ DE BA. LA EFICIENCIA FUE OBTENIDA POR MEDIO DE LA RELACIÓN DE LOS EXPLANTES SEMBRADOS Y LOS EXPLANTES CON RESPUESTA.	57
FIGURA 12. RELACIÓN DEL PESO INICIAL Y EL INCREMENTO DE PESO DE EXPLANTES DE MESÓFILO DE LA HOJA CULTIVADO EN MEDIO MS, CON REGULADORES DE CRECIMIENTO BA Y 2,4-D PARA OBTENER EL PESO INICIAL Y TRANSFERIDOS A MEDIO CON GA3 Y ZEATINA COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO PARA OBTENER EL INCREMENTO.	62
FIGURA 13. CALLOS EMBRIOGÉNICOS PRESENCIA Y AUSENCIA DE LUZ. A) CALLO CULTIVADO EN AUSENCIA DE LUZ CON BA Y 2,4-D COMO REGULADORES Y B) CALLO CULTIVADO EN PRESENCIA DE LUZ CON GA3 Y ZEATINA COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO.	64
FIGURA 14. IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS. A) ESTRUCTURA EN FASE GLOBULAR, B) ESTRUCTURA EN FASE TORPEDO, C) ESTRUCTURA EN FASE CORAZÓN, D) ESTRUCTURA EMBRIOGÉNICA AVANZADA. CULTIVADAS EN MEDIO MS CON GA3 Y ZEATINA COMO REGULADORES. OBTENIDOS DESPUÉS DE 8 SEMANAS DE INCUBACIÓN.	65
FIGURA 15. FORMACIÓN DE EMBRIONES A PARTIR DE CALLOS, EMBRIÓN CULTIVADO EN MEDIO MS SUPLEMENTADO CON GA3 Y ZEATINA COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO, EXPLANTE OBTENIDO DE MESÓFILO DE LA HOJA.	65
FIGURA 16. CALLOS CON ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS AVANZADAS, OBTENIDOS A PARTIR DE MESÓFILO DE LA HOJA, CON $0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$ DE GA3 Y $0.5 \text{ MG}\cdot\text{L}^{-1}$ DE ZEATINA, COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO, INCUBADO EN OBSCURIDAD Y LUZ POR 8 SEMANAS.....	67
FIGURA 17. DESARROLLO DE RAÍCES Y TALLOS DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE EXPLANTES OBTENIDOS DE MESÓFILO DE LA HOJA. EN MEDIO MS SUPLEMENTADO CON ANA Y GA3 COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO.	68
FIGURA 18. PLANTAS GERMINADAS A PARTIR DE EMBRIONES SOMÁTICOS BAJO CULTIVO IN VITRO EN MEDIO MS ANA Y GA3 COMO REGULADORES DE CRECIMIENTO. EN UN PERIODO DE 8 SEMANAS	69

FIGURA 19. EMBRIONES SOMÁTICOS ENCAPSULADOS EN UNA MATRIZ DE ALGINATO DE SODIO, A) EMBRIÓN EN ESTADO GLOBULAR, B) EMBRIÓN EN FASE TORPEDO, C) EMBRIÓN ENCAPSULADO EN FASE TORPEDO. D) EMBRIÓN ENCAPSULADO CON PRESENCIA DE COTILEDONES	70
FIGURA 20. EMBRIÓN ENCAPSULADO Y EMBRIÓN DESARROLLADO. CULTIVADOS EN MEDIO MS. A) EMBRIÓN ENCAPSULADO B) PLÁNTULA A PARTIR DE EMBRIÓN SOMÁTICO.	71
FIGURA 21. ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE PAPA BAJO CULTIVO IN VITRO, PARTIENDO DE EXPLANTES DE HOJA.	72
FIGURA 22. TIPOS DE RESPUESTA EN DISCOS DE TUBÉRCULO.	74
FIGURA 23. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.	76
FIGURA 24. RESPUESTA DE BROTES DE TUBÉRCULO.	77

I. Introducción

La papa es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial, su producción aproximada es de 320 millones de toneladas al año, superado solamente por el arroz, el maíz y el trigo. La producción de estos tres cultivos ha venido decreciendo en los últimos años y la demanda particularmente de la papa se ha incrementado en un 12 % del año 2000 al 2012, de aquí la importancia de esta hortaliza (Borba, 2008).

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los pocos cultivos que por sus características se puede desarrollar en la mayor parte del territorio nacional, siendo cultivado en 23 estados del país. Datos reportados por SAGARPA en 2011 señalan que cerca de 54 mil hectáreas de papa fueron cosechadas en 2011 con una producción total de 1.43 millones de toneladas, el rendimiento promedio fue de 26.2 ton ha⁻¹. Los principales estados productores, en ese año, fueron Sinaloa 19 %, Sonora 18 %, Nuevo León 9 % y el Estado de México 7 %. Del total de la producción de papa a nivel nacional 50 % está destinado al consumo en fresco, 25 % a la industria y 17 % a la siembra. En México se tiene un consumo per cápita de 17.2 kg por año.

Es importante señalar que la papa es un cultivo que se propaga de manera asexual, es decir se utiliza el tubérculo como semilla, es por esto que la variabilidad genética es limitada. También la siembra del tubérculo puede acarrear ciertos problemas fitosanitarios, ya que si se presenta alguna plaga como la polilla de la papa y el tizón tardío es probable que la semilla sea un vector para trasladar esta plaga de un ciclo a otro (Castro y Contreras, 2011)

La aplicación de la biotecnología a la agricultura es una herramienta muy importante para la producción de alimentos, la semilla sintética es una técnica que puede ser empleada para la propagación de plantas que no producen semilla, o bien, reproducción de especies vegetales con problemas de propagación. Desde los años de 1980 se ha venido utilizando la técnica de encapsulación de embriones para la producción de semilla sintética, sin embargo no se han explorado otro tipo de cubiertas que no sean el polioxietileno y el alginato de sodio (Redenbaugh, 1993). Es por esto que el objetivo del presente trabajo es evaluar diferentes explantes de papa sometidos a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento bajo condiciones *in vitro*, para la obtención de embriones somáticos.

1.1. Antecedentes.

La papa (*Solanum tuberosum*) fue domesticada hace 8,000 años, en las montañas de los andes, de donde se llevó a Europa por los españoles, este se adaptó rápidamente a las condiciones climáticas y se convirtió en un cultivo básico (FAO, 2008). Existen más de 4,000 variedades de papa, lo que demuestra una gran diversidad genética, producto de las prácticas de los agricultores de la región andina, es por esto que este cultivo se adapta fácilmente a las diferentes condiciones de temperatura, suelo y altitud (Borba, 2008).

En las zonas rurales y urbanas para las personas de bajos recursos la papa se considerada como un tesoro enterrado. Algunas ventajas de este cultivo son: la poca demanda de insumos, crecimiento rápido y alta producción, por lo que es ideal para lugares con poca disponibilidad de tierra y mucha mano de obra. Además, la papa tiene un gran potencial que aún no se desarrolla de producción y productividad, especialmente en algunas tierras marginadas e inadecuadas para otros cultivos (FAO, 2009).

La utilización del tubérculo como semilla para la producción de papa trae consigo una serie de problemas fitosanitarios que representan una pérdida económica para el productor. No obstante las grandes extensiones de tierra que se utilizan para la producción de semilla no garantizan la calidad de la misma (Cárdenas, 1989, citado por Sánchez *et al.*, 2005). Es por esto que es importante la implementación de la biotecnología para la propagación de plantas de papa y satisfacer las necesidades de los productores y evitar con esta la pérdida por factores fitosanitarios o económicos.

1.2. Justificación.

Debido a que la papa es un cultivo que se produce de manera vegetativa se tienen una serie de problemas como: mala calidad, plagas, enfermedades y poca variación genética en las variedades cultivadas. De las 26.2 ton h⁻¹ que se producen en promedio de papa, 1.5 ton son destinadas como semilla para los siguientes ciclos, de aquí se derivan problemas como condiciones sanitarias, físicas y fisiológicas inadecuadas para la utilización del tubérculo para la siembra, es por esto que se requiere de la aplicación de la biotecnología para la producción de embriones somáticos de papa, una vez encapsulado y como semilla sintética, que garantice la calidad fitosanitaria para los productores. Con los resultados que se obtengan se pretende proponer una solución a los problemas que acarrea sembrar el tubérculo.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Evaluar diferentes explantes de papa (*Solanum tuberosum* L.) sometidos a diferentes medios y concentraciones de reguladores de crecimiento bajo condiciones *in vitro*, que estimulen la producción de embriones somáticos.

1.3.2. Específicos.

Identificar el medio, la concentración y mejor combinación de reguladores de crecimiento para la producción de embriones somáticos de calidad.

Evaluar las etapas y desarrollo de los embriones somáticos desarrollados de diferentes explantes cultivados *in vivo*.

Establecer un protocolo para la producción de embriones somáticos y su posterior encapsulación para establecer un protocolo de producción de semilla sintética.

1.4. Hipótesis

La identificación de los medios, reguladores y explantes permitirá promover la mejor respuesta embriogénica, así como a los mejores embriones somáticos para generar semilla artificial.

II. Revisión de literatura

2.1. Origen

Estudios de diversidad genética realizados por investigadores de la Universidad de Wisconsin, Estados Unidos, demostraron que todas las variedades cultivadas eran originarias del sur de Perú y oeste de Bolivia, debido a esto se estima que existen más de 3 mil variedades de papas nativas de este país (Luque, 2009). Este cultivo ha sido fundamental durante milenios en la alimentación de las antiguas poblaciones andinas. Datos arqueológicos revelan que la papa se cultivaba en los Andes por lo menos hace 8000 años, investigaciones recientes indican que el centro específico de origen de esta planta es la región que ahora es el Perú, este país también es el principal productor a nivel Latinoamérica y se ha estimado el consumo anual per cápita de 80 kilogramos. La producción esta principalmente en manos de los pequeños campesinos, a una altura de 2500 y 4500 metros sobre el nivel del mar. Por otro lado la presencia de papas silvestres en México indica que este país se encuentra en el ámbito de diversificación de este tubérculo. Sin embargo las variedades cultivadas probablemente fueron introducidas por los colonizadores españoles en el siglo XVI (FAO, 2009).

En el siglo XX la ciencia y la tecnología se encuentran en un desarrollo de la genética y biotecnología vegetal esto da como resultado la aparición de estas dos herramientas que han obtenido logros extraordinarios en varios sectores productivos, donde los seres vivos constituyen la base de aplicaciones tan diversas como lo son la generación variedades vegetales más productivas (Muñoz, 2004).

2.2. Producción

La papa constituye el cuarto alimento más sembrado a nivel mundial, por ser una fuente de alimento importante para la sociedad por su alto valor nutritivo. En los países europeos y Estados Unidos se registran altos niveles de consumo per cápita de esta hortaliza, entre 87,8 y 60 kg por persona respectivamente. En México a pesar de que se produce en gran parte de territorio nacional (24 estados) el consumo apenas llega a 20,7 kg por persona. Diversas investigaciones indican que el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es originario de la cordillera andina, pero se han encontrado rastros de domesticación en Chile y Bolivia, por otro lado se ha demostrado que algunas variedades silvestres son originarias de México (Luque, 2009).

2.3. La papa en México

Como se muestra en siguiente figura número 1 México se encuentra en el lugar 5 en cuanto a producción de papa a nivel Latinoamérica y podemos observar que el número 1 es Perú debido a que es centro de origen de esta especie.



Figura 1 Producción de papa a nivel Latinoamérica. (Fuente: FAOSTAT, 2009)

2.4. Taxonomía

Existe una controversia en la clasificación debido a que diferentes investigadores reportan desde una hasta 20 especies diferentes, pero todas provenientes de un mismo pool genético. La taxonomía de las especies cultivadas y silvestres de papa continua siendo compleja ya que muchas especies de papa son iguales aun teniendo apariencia diferente (Rodríguez, 2009).

Actualmente la papa cultivada se conoce como *Solanum tuberosum* L. y posee un rico pool de genes constituido por 190 especies silvestres que forman tubérculos, la papa es el único grupo que posee poliploidies, aproximadamente 70 % de las especies son diploides, la mayoría de las restantes son tetraploides ($2n=6x=72$), con un número reducido de triploides y pentaploides representan una reserva de germoplasma amplia y única, parcialmente explorada y poco usada en el mejoramiento genético (Rodríguez, 2009).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la especie cultivada de papa

Clasificación taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. tuberosum</i>

2.5. Características de la planta

La papa es una planta herbácea de 0.5 a 1.0 m de altura las hojas son alternadas e irregularmente compuestas, la inflorescencia consiste de varias flores, los frutos son bayas ausentes en varios cultivares, los tubérculos se forman de rizomas bajo el suelo de los que se desarrollan raíces adventicias para formar una masa fibrosa. La papa es una planta alógama, de polinización libre, existen especies diploides cultivadas que son autoincompatibles. Sin embargo la papa cultivada (tetraploide) es autocompatible con un promedio de cruce natural de 40 %.

2.6. Propagación

Para poder llevar a cabo un cultivo de papa, un factor muy importante, es necesario contar con semilla que haya desarrollado brotes múltiples y vigorosos, es por esto que se plantea en algunos lugares establecer lotes exclusivos para la producción de semilla, utilizando la densidad adecuada y una semilla con los brotes necesarios se puede lograr una buena producción

de consta de unas 20 ton h⁻¹ con una tasa de extracción del 65 a 70 %. La semilla se clasifica dependiendo del peso y el tamaño, este último parámetro es importante para garantizar la uniformidad del futuro cultivo (Montesdeoca, 2005).

2.7. Variedades

Las variedades cultivadas para consumo humano pueden ser clasificadas en tres grupos, tomando en cuenta sus características de color y tipo de cascara.

Color rosado. Este grupo se produce en México comúnmente en las zonas de temporal, que comprende la región de Puebla, Estado de México, Hidalgo, Veracruz y Tlaxcala.

Cascara lisa, de color blanco o amarillo. Este grupo se siembra con más frecuencia en las distintas regiones del país y se destina a los diferentes mercados tanto a consumo fresco como a uso industrial. Los estados productores de este tipo son Sinaloa, Nuevo León, Sonora, Guanajuato, Coahuila, entre otros.

Color rojo. Este grupo aún no se siembra en nuestro país, sin embargo en Estados Unidos se han reportado buenos rendimientos que comúnmente son destinadas al mercado industrial.

En México, las principales variedades que se utilizan para el consumo en fresco son: Alpha, Atlantic, FL 1867, Fianna, entre otras, cabe destacar que todas pertenecen a la clasificación de cascara lisa y de color blanco o amarillo,

por otra parte tenemos a la variedades de uso industrial, dentro de estas destacan: Atlantic, FL 1867, Fianna y Lady (Luque, 2009).

2.8. Semilla

En la República Mexicana el cultivo de papa se da a lo largo de todo el año en ambos ciclos (otoño-invierno y primavera-verano), sin embargo en algunos estados solo se lleva a cabo el ciclo otoño-invierno por las condiciones climáticas. Para lograr que el cultivo se desarrolle adecuadamente es necesario detener el fenómeno de brotación desde la cosecha, a este fenómeno fisiológico se le conoce como latencia, letargo o reposo, que comprende desde la cosecha hasta que es sembrada de nuevo. Para activar la brotación se pueden implementar el regulador de crecimiento conocido como ácido giberélico o tratamiento con disulfuro de carbono (CS₂) (Luque, 2009).

La forma más común de la reproducción de la planta de papa es por medio de la siembra del tubérculo, se puede sembrar entero o en trozos, y se llega a desarrollar plantas con las mismas características genéticas que la planta madre. Se ha hecho investigación relacionada con la producción de semilla botánica, pero se tiene la desventaja de la variabilidad genética, es por esto que el 100 % de la semilla comercial proviene de tubérculo y la semilla botánica se utiliza únicamente para cuestiones de mejoramiento. Por ello se tiene precaución en la selección de la semilla, y en el mejor de los caso utilizar semilla certificada. Por otro lado, se tienen otras desventajas como lo son los problemas de plagas y enfermedades, ya que los problemas más severos son transmitidos a través de la semilla (Theodoracopoulos *et al.*, 2008).

En el caso de la papa, el uso de la semilla de buena calidad es importante, ya que se emplea la propagación vegetativa. Una semilla que no esté en condiciones sanitarias, físicas y fisiológicas adecuadas, producirá bajo rendimientos, plantas poco uniformes, pobre desarrollo de planta y se corre el riesgo de diseminar, de manera inconsciente, plagas y enfermedades (Montesdeoca, 2005).

2.9. Fisiología del tubérculo

Es importante conocer la fisiología del tubérculo de papa, para conocer cuándo debe de ser depositada en suelo y producir plantas nuevas con características idénticas a la planta de la cual procede, en esta etapa se pueden identificar los siguientes estados.

2.9.1. Estado de reposo

Es el lapso que dura de la fecha de corte y clasificación al inicio del periodo de brotación para utilizarlo como semilla, esta etapa puede durar de 7 a 120 días, dependiendo de la variedad, estado en que fue cosechada y condiciones de almacenamiento.

2.9.2. Estado de brotación apical

En esta etapa el tubérculo presenta un único brote o brote apical, en este estado no es recomendable sembrarla debido a que va a generar un solo brote o tallo por lo que la producción sería baja. Es recomendable eliminar el brote apical para permitir la brotación múltiple.

2.9.3. Estado de brotación múltiple

Este es el estado ideal para sembrar el tubérculo y depende de la variedad, condiciones de madurez de los tubérculos y ambiente de almacenamiento. En este estado se puede observar brotaciones múltiples del tubérculo, lo ideal sería encontrar de 3 a 4 brotes por tubérculo.

2.9.4. Estado de envejecimiento

Este estado representa un estado tardío de la semilla, tiene una apariencia flácida y arrugada por la pérdida de agua y nutrientes.

Es necesario tener en cuenta las etapas por las que puede pasar la semilla para realizar la siembra de manera oportuna y así garantizar la germinación y vigor de las plantas (Montesdeoca, 2005).

2.10. Cultivo *in vitro*

2.10.1. Historia

La primera vez que se desarrolló el cultivo de tejido con éxito fue en los años 20's por Gottlieb Heberlandt que realizó cultivo de mesófilo de hoja, esta técnica avanzó rápidamente para los años 30's con el descubrimiento de que la vitamina B y las auxinas naturales eran necesarias para el crecimiento de los tejidos aislados. Para los años 70's ya se habían reconocido e investigado las clases de reguladores de crecimiento, estas clases son auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido Abscísico. El campo de cultivo de tejidos está basado en la premisa de que las plantas pueden separarse en sus

componentes (órganos, tejidos y células) que pueden ser manipulados *in vitro* y luego volver a crecer hasta formar una planta completa (James *et al.*, 2004).

El cultivo *in vitro* ha venido tomando cierta importancia a lo largo de la historia, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado ampliamente, esta técnica consiste en cultivar en un medio nutritivos adecuados y de forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo, hoja y algunas veces ovarios, anteras y polen (Webb y Street, 1977).

Sacks en 1860 y Knops en 1861 fueron los primeros en desarrollar esta técnica, ellos observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva que los contenía, la cual ha sido ampliamente utilizada desde entonces. Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido de tejido de tabaco. En la actualidad las sales inorgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en la mayoría de las especies (Hurtado y Merino, 1987).

La técnica de cultivo de tejidos se remonta a 1902 con los intentos de Haberlandt para cultivar células aisladas de plantas; él postuló el principio de la totipotencia celular, base en la que se sustentan todas las técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo, en condiciones asépticas, de órganos, tejidos, células y protoplastos, empleando medios nutritivos artificiales. Esta

técnica constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado (Jiménez, 1998).

2.10.2. Etapas de cultivo *in vitro*

Dentro del cultivo *in vitro* podemos encontrar una serie de etapas o pasos a seguir para cumplir nuestro objetivos, diversos autores pueden agregar o quitar algún paso, en este caso se explican los 5 paso más representativos.

2.10.2.1. Etapa 0. Selección de la planta madre o preparación del material vegetal

En esta etapa se selecciona y acondicionan las plantas donantes de los explantes a considerar. Se pueden tomar explantes de plantas cultivadas en invernadero o bien de su habitat silvestre. Los principales factores que influyen sobre la calidad del explante son:

1. El tipo de órgano que servirá como explante.
2. La edad ontogénica o fisiológica del explante, se dice que los órganos jóvenes son los que tienen una mejor respuesta que los obtenidos de materiales adultos.
3. La época del año en la que se recolecta el material.
4. El tamaño de los explantes.
5. El estado sanitario general de la planta donante.

2.10.2.2. Etapa 1. Establecimiento del cultivo

En esta etapa se realiza la selección de los explantes así como también el proceso de asepsia para posteriormente sembrarlos en el medio de cultivo.

Para hacer la selección del explante, por lo general, se seleccionan los más jóvenes de la planta debido a que tienen mejor respuesta. También en esta etapa es cuando se realizan análisis de sanidad para los explantes a considerar.

2.10.2.3. Etapa 2. Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para el nuevo ciclo de multiplicación y poder destinar parte de ellos a una nueva etapa de producción. En esta etapa se recomienda evitar la formación de callos para evitar variación somaclonal. En esta etapa los reguladores de crecimiento juegan un papel importante, existen tres vías de multiplicación: la organogénesis, embriogénesis somática y multiplicación por yemas, ápices o meristemos.

2.10.2.4. Etapa 3. Enraizamiento

En esta etapa se lleva a cabo la formación de raíces, en algunas especies se dificulta más debido a su pobre capacidad rizogénica. Este proceso puede realizarse *in vitro* o *ex vitro*.

Bajo condiciones *in vitro* es necesario colocar los explantes en un medio de cultivo para la diferenciación de la raíz y la parte aérea, por otro lado *ex vitro* se realiza con un sustrato y permite el enraizamiento y la aclimatación al mismo tiempo. El enraizamiento se conoce como la formación y elongación del sistema radical para hacer más viable la adaptación al ambiente externo.

2.10.2.5. Etapa 4. Aclimatación

El proceso de aclimatación es probablemente el paso más crítico durante el proceso de cultivo *in vitro* debido a que es donde la planta se someterá a su ambiente natural para evaluar su comportamiento. Consiste en transferir las plantas a un ambiente donde no se tienen las condiciones ambientales totalmente controladas, en esta etapa la planta puede presentar varios tipos de estrés como hídrico, mecánico, entre otros (Pérez, 2009).

2.10.3. Manejo *in vitro* de papa

El manejo *in vitro* es una simulación artificial de un ambiente apto para el desarrollo de tejido vegetal, que tiene como objetivo específico explotar la totipotencia de las células, es decir, expresar la capacidad que tiene las células vegetales de formar plantas completas a partir de células aisladas. Todos estos cultivos se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta (George *et al.*, 2008).

La papa ha demostrado una gran diversidad para su desarrollo haciendo posible la regeneración de plantas enteras a partir de diferentes fuentes de explantes como discos de tubérculo (Hagen *et al.*, 1990) y raíces (Doods, 1984) y actualmente de manera más rutinaria a partir de hojas, esta última se considera una estrategia conveniente para ciertos tipos de estudio, la primera etapa de respuesta que se presenta es la proliferación de pequeños nódulos de callos en el borde de los cortes del tejido. Después de unas pocas semanas los estímulos son apropiados para la generación de plántulas (Doods, 1984).

2.11. Organogénesis

La organogénesis es la capacidad de formar nuevos órganos vegetales a partir de explantes como yemas o raíces, esta puede ser de dos tipos: organogénesis directa y organogénesis indirecta. La organogénesis directa consiste en formar plantas nuevas a partir de los explantes directamente, en la organogénesis indirecta se origina primeramente tejido calloso para posteriormente diferenciar la parte aérea del tejido radicular (Pérez, 2009).

2.12. Embriogénesis

En plantas el embrión se desarrolla a partir del ovulo, ya sea por embriogénesis cigóticos, partenogénesis o por medio de la apomixis de células presentes en el gametofito femenino o alrededor del tejido esporofítico del saco embrionario, salvo algunas excepciones, como *Bryophyllum calycinum* y *Malaxis paludosa*, no se han encontrado desarrollo de embriones *ex ovulo*, lo que indica que solo el saco embrionario puede proporcionar las condiciones adecuadas para el crecimiento y desarrollo de un embrión (Raemakers *et al.*, 1995).

A lo largo de la evolución muchas plantas han evolucionado en diferentes métodos para producir embriones de manera asexual, incluyendo la embriogénesis somática, que es un proceso por el cual las células somáticas se diferencian en embriones somáticos, estos embriones son muy parecidos a los embriones cigóticos pero se desarrollan de una manera diferente. Este fenómeno ocurre en un grado limitado en la naturaleza a partir de óvulos y raramente de hojas. Desde la primera observación de la formación de

embriones somáticos por *Dacus carota* en células en suspensión se ha observado que este fenómeno tiene grandes características para el cultivo de tejido de plantas. Durante los últimos 40 años la embriogénesis se ha descrito en un amplio número de especies vegetales, ya que este método puede aplicarse para diversas especies con las condiciones ambientales y de medio de cultivo adecuadas. También es importante resaltar que la embriogénesis somática es un modelo importante para los estudios de embriogénesis (George *et al.*, 2008).

El proceso de embriogénesis se puede dividir en dos grandes grupos, dependiendo del tipo de plantas de las que se esté hablando (angiospermas o gimnospermas).

2.12.1. Embriogénesis cigótica

Empieza con un cigoto y finaliza con la formación de los cotiledones. El desarrollo del embrión pasa por una fase de globular corazón, torpedo y el estado de la formación de cotiledones, esto se representa por tres estados exclusivos de angiospermas:

- I. División asimétrica del cigoto, que promueve el crecimiento de un pequeño número de células apicales y grandes células basales.
- II. Formación de un patrón específico que toma lugar en el embrión globular.
- III. Transición al estado cotiledonar que coincide con la formación de la raíz en dicotiledóneas y del primordio foliar.

2.12.2. Maduración del embrión seguido de la germinación

Al igual que en la anterior esta se puede dividir en tres fases y es exclusiva de las gimnospermas:

- I. Pro-embriionario. Todas las etapas antes de la elongación.
- II. Embriogénesis temprana. Todas las etapas después de la elongación de la parte superior y antes del establecimiento del meristemo radical.
- III. Embriogénesis tardía. Divisiones celulares intensas incluyendo el establecimiento del meristemo radical y meristemo apical.

2.12.3. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso análogo a la embriogénesis cigótica, donde una célula o un pequeño grupo de células somáticas son precursoras de la embriogénesis somática. También se dice que es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tiserat *et al.*, 1979. citado por Gómez, 1998). La característica más destacada de la embriogénesis somática es que se producen estructuras bipolares capaces de formar raíz y brote, estos a su vez pueden llegar a formar plantas completas. Este tipo de técnica se puede dividir en dos métodos o manera de obtener embriones somáticos directa e indirecta, la primera se caracteriza por obtener embriones sin la necesidad de pasar por la etapa de callo a partir de un conjunto de células aisladas. Para el caso de la producción indirecta es necesario pasar por una etapa de callo, a su vez ésta se divide en embriogénesis somática de alta frecuencia y de baja frecuencia, estas se

diferencian en cuanto al tiempo que se tarda para la formación de embriones. Las fases de la formación de embriones somáticos son cuatro, durante la fase 0 la célula aislada forma los agregados celulares embriogénicos; en la fase 1 la proliferación de los agregados es relativamente lenta y aparentemente sin diferencia al ser transferida a un medio libre de auxinas; después de la fase 1 ocurre una rápida división en cierta parte del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en estado globular, esta fase es designada fase 2; en la fase 3 continúa el continuo desarrollo del embrión al estado corazón y torpedo (Gómez, 1998).

Gómez y colaboradores en 1997 exploraron la posibilidad de producir embriogénesis u organogénesis a partir de tejido foliar de dos variedades de papa diferentes, específicamente explantes de hoja, esto da pie para la producción de embriones somáticos *in vitro* y posteriormente producir semilla sintética.

El factor más importante para la regeneración de plantas *in vitro* es el balance de reguladores de crecimiento que pudieran estar involucrados en lo que se está buscando, para el caso de la embriogénesis somática se ha demostrado que las concentraciones de auxinas (como el ácido indolacético) y citocininas (como la bencil aminopurina) son la base para el desarrollo de este tipo de embriones; por otro lado la embriogénesis se puede ver favorecida por la adición de otro tipo de citocininas como lo es el ribósido de zeatina (Gómez et al., 1997).

Según Redengaught en 1993 los mayores avances que se tienen sobre la semilla sintética se encuentran en alfalfa (*Medicago sativa* L.), debido a que

en esta especie y en otras pocas se ha alcanzado la calidad de los embriones necesaria para poder llevarlas a condiciones de campo.

La embriogénesis somática puede ser de dos maneras diferentes directa, donde no pasa por ninguna fase de callo, o bien indirecta donde se requiere pasar por una fase de callo para formar embriones (William y Maheswaram, 1986, Citado por George, 2008). La regeneración de plantas vía embriogénesis somática consta de cinco pasos:

1. Inicio del cultivo embriogénico cultivando el explante en medio suplementado con reguladores de crecimiento en su mayoría auxinas pero también citocininas. Las células somáticas tienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa. Esta fase consiste en desprogramar la expresión de ciertos genes de las células y reemplazarlos por la expresión de genes embriogénicos.
2. Proliferación del cultivo embriogénico en un medio semisólido o líquido suplementado con reguladores de crecimiento en condiciones similares al inicio. El grado de diferenciación de las células somáticas está determinado por la presencia de auxinas aunque puede variar dependiendo de la especie con la que se trabaje.
3. Pre-maduración de los embriones somáticos en medios sin reguladores de crecimiento. esto inhibe la proliferación y estimula la formación de embriones somáticos y desarrollo temprano.
4. Maduración de embriones somáticos en un cultivo suplementado con ABA y/o reduciendo el potencial osmótico. Durante la etapa de maduración van a sufrir cambios tanto morfológicos como bioquímicos,

comienzan a almacenar productos de reserva como si fueran embriones cigóticos.

5. Regeneración de plantas en medio sin reguladores de crecimiento. La regeneración de planta es para obtener el producto final y la sobrevivencia y crecimiento de las plantas va a depender de las condiciones de etapas anteriores.

2.12.3.1. Producción de semilla sintética o artificial

Dentro de las diferentes técnicas de cultivo de tejidos se ubica la producción de semilla sintética impulsada para su producción en gran escala Toshio Murashige, presenta formalmente la idea de la producción de semilla sintética, entendiendo como tal un simple embrión somático encapsulado. A lo largo de la historia de la producción de semilla sintética se han desarrollado cinco métodos diferentes para su obtención de los cuales el más utilizado es la semilla sintética con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora; para poder lograr esto es importante contar con un sistema eficiente de inducción de embriones somáticos, esta técnica puede llegar a ser en un futuro cercano el principal método de propagación de plantas (Hebe *et al.*, 2010).

El paso más crítico en la tecnología de la producción de semilla sintética es la producción de plantas a partir de embriones o brotes encapsulados bajo condiciones no estériles, la germinación de las semillas se puede llevar a cabo en cámaras incubadoras, o bien, bajo condiciones de invernaderos, umbrales o en campo. Uno de los retos es que la semilla germine rápidamente y emita raíces, tallos y hojas para formar una planta completa, sin embargo pocos

investigadores reportan esta habilidad en las semillas para la conversión en condiciones *ex vivo* (Jiménez y Quiala., 1998).

En teoría, un sistema de propagación por semilla artificial debe ser capaz de producir en volumen elevado propágulos, éstos a su vez debe ser lo suficientemente baratos como para competir con la semilla sexual, dando pie a superar la barrera que limita la propagación de plantas *in vitro*, ya que se ha restringido a la producción de aquellas especies donde el precio por unidad sea tan alto que justifique el empleo de esta técnica. Según Vilariño *et al.* (1996) se obtuvo un 98 % de conversión *in vitro* y 83.4 % *in vivo* en yemas encapsuladas de papa, de lo cual se puede inferir sobre la capacidad que tiene la papa para este tipo de tecnologías (Jiménez, 1998).

Para obtener una tasa de germinación elevada cuando se produce semilla sintética es necesario tener en cuenta tres aspectos principales que son: la temperatura, el tiempo de almacenamiento y las concentraciones de alginato de sodio y BAP (bencil aminopurina). Estudios han demostrado que conforme aumenta la concentración de BAP en la capsula se obtiene un mayor porcentaje de germinación sin importar la concentración de alginato de sodio, sin embargo el papel del alginato de sodio es de suma importancia ya que es el encargado de darle forma a la cápsula, con esto se reportó una concentración óptima para obtener el 100 % de germinación en *Laelia aceps* que es de 2.0 mg/L de BAP y 2 o 3 % de alginato de sodio (Lee *et al.*, 2009).

2.13. Cultivo de células en suspensión

Consiste en un conjunto de células aisladas, así como de pequeños racimos celulares, distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. Esta técnica fue ideada con base en métodos microbiológicos, esta técnica es ampliamente utilizada para llevar a cabo estudios de embriogénesis, crecimiento, diferenciación, organogénesis, genética, así como también la obtención de diversos productos secundarios. Los cultivos de células en suspensión son generalmente heterogéneos, con células aisladas y pequeños agregados celulares. En la mayoría de los casos el 60 % de las células pueden estar aisladas o formar racimos de dos células; es muy común encontrar racimos celulares de más de 2 mm de diámetro (Hurtado y Merino, 1987).

2.14. Producción de callo a partir de tubérculo

La obtención de callos a partir de diferentes tejidos de las plantas ha sido ampliamente estudiada incluso se ha visto la posibilidad de obtener callos a partir de tubérculo de papa, Lam en 1975 dijo que desde hace tiempo se sabe la existencia de células en el tubérculo que pueden ser cultivadas *in vitro* sin embargo no existe un método que permita obtener yemas y brotes de este tipo de explantes. Para obtener respuestas a partir de este tipo de tejidos es necesario realizar modificaciones al medio ordinario M.S. (Lam, 1975).

III. Materiales y Métodos

3.1. Ubicación del sitio de investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales, del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Estado de México.

3.2. Obtención de embriones somáticos

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal se obtuvo a partir de tres variedades de importancia comercial (Fiana, Alpha y NAU-6) los explantes obtenidos de las tres variedades fueron sometidos a los diferentes métodos de siembra y reguladores de crecimiento (Tratamientos).

3.2.2. Explantes

Se sembraron tubérculos en macetas para obtener plantas, una vez que las plantas tenían alrededor de cinco semanas se tomaron los explantes. Los explantes se tomaron de la parte media y de la parte terminal de la planta. Como se muestra en la figura 2 el mesófilo de la hoja se sometió a una desinfestación, que consiste en un triple lavado con agua, detergente y Tween 20, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 10 % durante 15 min. Por último, se introdujeron en un recipiente con alcohol al 95 % por 3 minutos para después ya en la campana realizar un triple lavado con agua destilada-estéril. Una vez que los explantes se cortaban de la hoja se sumergían en agua destilada-estéril para evitar la deshidratación.

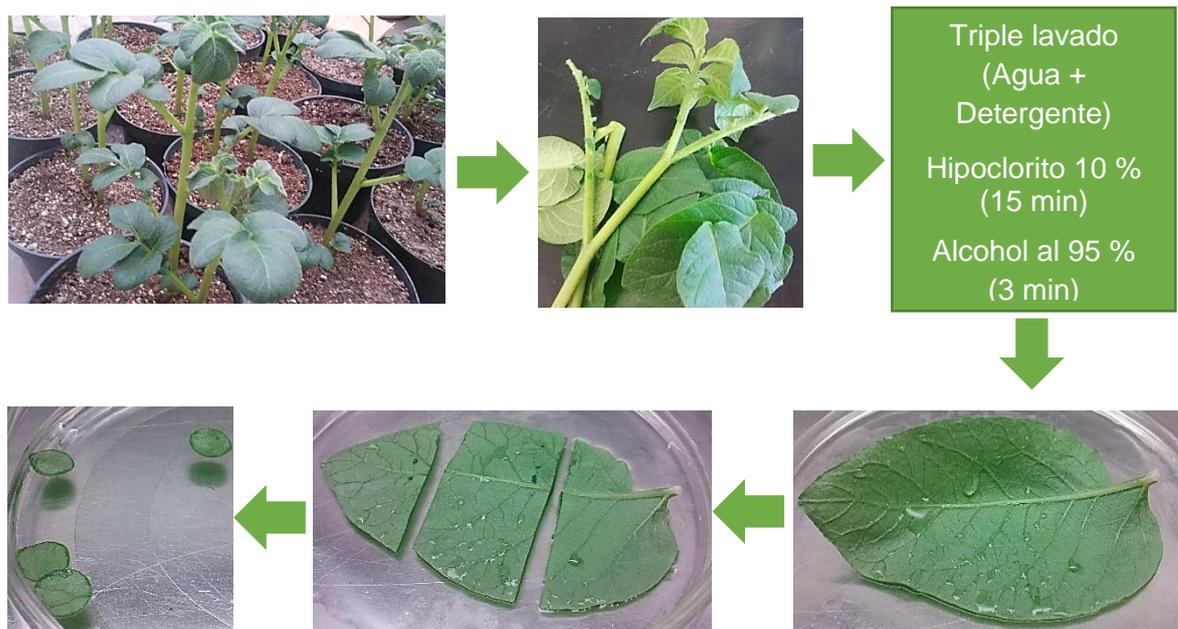


Figura 2. Esquema de obtención de explantes.

3.2.3. Medio de cultivo

Para evaluar ambos métodos de producción de embriones somáticos, se utilizó un medio base que contiene las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), complementadas con tiamina ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), myo-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido nicotínico ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), piridoxina ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) L-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 agregó los diferentes reguladores de crecimiento necesarios para inducir la formación de embriones somáticos en cada uno de los tratamientos. El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 .

3.2.4. Siembra de mesófilo de la hoja

Los segmentos de hoja se sembraron en frascos tipo Gerber, 4 explantes por cada frasco con 20 ml de medio. Se evaluaron método de obtención de embriones (directo e indirecto), la colocación de mesófilo (haz y envés), nervadura (presencia y ausencia), ubicación de los explantes (hojas terminales e intermedias). En la figura 3 se ilustra la posición de la que fueron

tomados los explantes con respecto a la hoja o bien como se dividieron las regiones de la hoja.

Figura 3. Posición de extracción de explantes con respecto a la hoja.



Posteriormente se procedió a cortar los explantes con un horador de 1 cm para garantizar la homogeneidad de los explantes, posteriormente se procedió a realizar la siembra en el medio de cultivo.

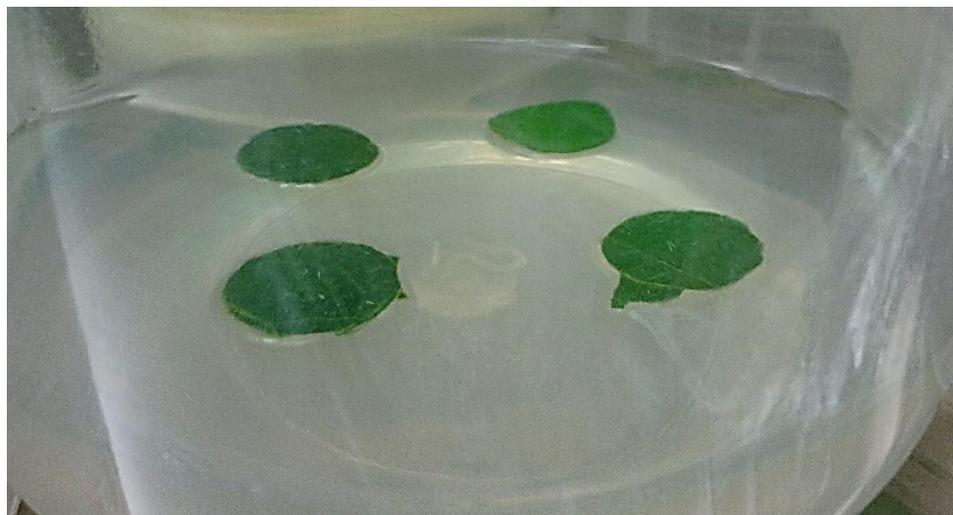


Figura 4. Siembra del mesófilo de la hoja en frascos tipo Gerber.

3.2.5. Métodos de siembra

Se planteó realizar 24 métodos de siembra diferentes debido a que se contaba con diferentes factores como la posición de la hoja, la presencia de nervadura y región de la hoja. En el cuadro 2 se muestran los códigos establecidos para cada uno de los métodos, dónde la primer letra representa a la parte de la hoja (haz o envés) que no quedo en contacto con el medio o que queda hacia arriba (H o E); la segunda letra representa a la posición de la hoja en la planta intermedia o terminal (I o T); la tercer letra representa la presencia o ausencia de nervadura (C o S); por último el numero representa de que región de la hoja fue tomada (la región 1 es la más cercana al peciolo de la hoja, la 2 representa a la región media o limbo y la región 3 representa la región cercana al ápice de la hoja)

Cuadro 2. Diferentes métodos de siembra para las variedades a evaluar.

Diferentes métodos de siembra	
HIS1	HTS1
EIS1	ETS1
HIC1	HTC1
EIC1	ETC1
HIS2	HTS2
EIS2	ETS2
HIC2	HTC2
EIC2	ETC2
HIS3	HTS3
EIS3	ETS3
HIC3	HTC3
EIC3	ETC3

Posteriormente se procedió a la selección de los mejores métodos de siembra según análisis estadísticos con una comparación de medias, para realizar nuevamente la siembra y llevar los callos producidos a etapas avanzadas de producción de callos embriogénicos.

3.2.6. Reguladores de crecimiento

En los siguientes cuadros se representan los diferentes reguladores de crecimiento utilizados para la formación de embriones somáticos de manera indirecta así como también los códigos utilizados para representar cada uno de los tratamientos.

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento usados para la producción de callo. Tratamiento Indirecto de Producción (TIP).

Tratamiento	2,4- D (mg L ⁻¹) Acido 2,4-Diclorofenoxiacético	BA (mg L ⁻¹) Benciladenina
TIP1	0.0	0.0
TIP2	1.0	0.12
TIP3	3.0	0.25
TIP4	10.0	0.5

Los explantes fueron pesados mientras eran transferidos a un medio nuevo y obtener el incremento de peso y estos datos ser analizados estadísticamente.

Cuadro 4. Reguladores de crecimiento utilizados para la formación de embriones somáticos, Tratamiento Indirecto de Formación (TIF).

Tratamiento	GA3 (mg L ⁻¹) Ácido Giberélico	Zeatina(mg L ⁻¹)
TIF1	0.05	0.025
TIF2	0.1	0.05
TIF3	0.5	0.5
TIF4	1.0	1.0

En los siguientes cuadros se representan los reguladores de crecimiento utilizados para la fase de formación de embriones somáticos de manera directa, así como también los códigos utilizados para representar a cada uno de los tratamientos.

Cuadro 5. Reguladores de crecimiento utilizados para la producción de embriones de manera directa, Tratamiento Directo (TD).

Tratamiento	Thidiazuron (mg L ⁻¹)
TD1	0.1
TD2	1.0
TD3	3.0

Cuadro 6. Reguladores de crecimiento empleado para inducir brotación.

Tratamiento	AG3 (mg L ⁻¹) Ácido Giberélico
TD1	0.1
TD2	0.3
TD3	1.0

3.3. Identificación de embriones somáticos.

Los embriones somáticos fueron identificados con el estereoscopio para posteriormente realizar un medio de cultivo y sembrarlos de manera individual para su evaluación.

3.3.1. Medio de cultivo para la evaluación de embriones

El medio utilizado para la evaluación de los embriones contenía los siguientes componentes Sales M.S. (50 %), Sorbitol (50 g L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), Agar (6 g L⁻¹), Sacarosa (30 g L⁻¹). Posteriormente se estableció un diseño

experimental con cuatro reguladores de crecimiento (GA₃, BA, ANA y ABA), independientemente de que el ABA no favorece el desarrollo de embriones se estableció el siguiente diseño.

Cuadro 7. Reguladores de crecimiento para evaluar embriones.

Tratamiento	Ácido Giberélico (GA ₃)	Benciladenina (BA)	Ácido Naftalenacético (ANA)	Ácido Abscisico (ABA)
T1	0.5 mg L ⁻¹	0.1 mg L ⁻¹	-----	0.5 mg L ⁻¹
T2	0.5 mg L ⁻¹	0.1 mg L ⁻¹	-----	-----
T3	0.5 mg L ⁻¹	-----	0.07 mg L ⁻¹	0.5 mg L ⁻¹
T4	0.5 mg L ⁻¹	-----	0.07 mg L ⁻¹	-----

En este punto se evaluó la presencia o ausencia de raíces así como la presencia de brotes.

3.3.2. Variables a evaluar

Se realizaron tomas de fotografías para identificar las estructuras embrionarias que estaban presentando los callos, las fotografías fueron tomadas con un estereoscopio de la marca LEICA® modelo EZ4 así como también se realizaron evaluaciones de carácter cualitativo y cuantitativo.

Cuantitativas.- Número de embriones e incremento de peso fresco

Cualitativas.- Presencia de callo, nivel de necrosamiento, tejido con respuesta, tejido sin respuesta, color por medio de una escala visual.

3.3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del paquete estadístico SAS en su versión 9.0 en el idioma inglés. Se realizó análisis de comparación de medias y análisis de varianza.

3.4. Obtención de callo embriogénico a partir de tubérculo

3.4.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para esta técnica fue preparado con agua destilada y el pH fue ajustado a 5.7 con HCl 0.1 N para posteriormente esterilizarlo por 20 min.

Cuadro 8. Componentes del medio de cultivo para obtención de callos a partir de discos de tubérculo

Componente	Concentración
Sales M.S.	100 %
Nitsch y Nitsch orgánico adenda	100 %
Caseína hidrolizada	1000 mg L ⁻¹
Sacarosa	20 g L ⁻¹
Agar	9 g L ⁻¹

Se estableció un diseño experimental para la obtención de callo a partir de discos de tubérculo con tres reguladores de crecimiento Acido Indol Acético, Acido Giberélico y Cinetina.

Cuadro 9. Concentración de reguladores de crecimiento para obtención de callo a partir de discos de tubérculo.

Regulador de crecimiento	T1 (Control)	T2	T3
Ácido indol Acético (AIA)	0.4 mg L ⁻¹	0.8 mg L ⁻¹	0.2 mg L ⁻¹
Ácido Giberélico	0.4 mg L ⁻¹	0.8 mg L ⁻¹	0.2 mg L ⁻¹
Cinetina	0.8 mg L ⁻¹	1.0 mg L ⁻¹	0.4 mg L ⁻¹

El medio se vació en frascos tipo Gerber con 20 ml de medio cada uno y se colocaron 4 explantes por frasco para las 3 variedades estudiadas.

Posteriormente los explantes con respuesta favorable fueron transferidos a un medio de cultivo que contenía la concentración de reguladores del TIF antes mencionado.

3.4.2. Obtención de explantes

Los tubérculos se lavaron con una solución al 10 % de Cloralex (5.23 % de hipoclorito de sodio) por 15 min. Después se removió piel el tubérculo para posteriormente cortarlo con un horador de 1 cm de diámetro e inmediatamente lavado varias veces con agua destilada y secarlos con papel filtro para remover el exceso de agua. Posteriormente se procedió a realizar la siembra en los frascos tipo Gerber solo poniendo en contacto el disco de tubérculo con el medio sin sumergirlo.

El cultivo se mantuvo en obscuridad los dos días posteriores a la siembra, para después transferirlo a un periodo de 16 hrs luz con una intensidad de 8000 lux a una temperatura de 26°C.

3.4.3. Evaluación de la respuesta

La respuesta se midió en escalas visuales de presencia o ausencia, se evaluó tejido con respuesta, tejido oxidado y contaminación de los discos de tubérculos. Se sembraron un total de 20 repeticiones por cada tratamiento por cada variedad para su evaluación. Donde cada repetición era representado por un explante.

3.5. Cultivo *in vitro* de células en suspensión

3.5.1. Medio de cultivo

El medio utilizado para esta técnica contiene básicamente los mismos componentes que el antes mencionado, incluyendo los reguladores de crecimiento del tratamiento indirecto de producción de embriones (TIP) son los mismos la única diferencia es que no contenía agar para evitar la gelificación.

3.5.2. Obtención de explantes

Los explantes se obtuvieron de hojas jóvenes de plantas de papa y se dejaron sumergidos en el medio bajo agitación constante durante un periodo de 45 días. Se procedió a colocar de 3 a 4 explantes por frasco.

3.5.3. Evaluación de crecimiento

Para realizar la evaluación se procedió a tomar muestras con una micropipeta del líquido en suspensión y colocarlas en un portaobjetos para observar en el microscopio la presencia o ausencia de crecimiento y la densidad del mismo. Se colocaron explantes de la región intermedia y terminal de la planta y de las tres regiones de la hoja.

3.6. Formación de callo a partir de brotes de tubérculo

3.6.1. Medio de cultivo

Para esta etapa del proyecto se utilizó un medio base que contenía sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), complementadas con tiamina (0.4

mg·L⁻¹), myo-inositol (100 mg·L⁻¹), ácido nicotínico (50 mg·L⁻¹), piridoxina (50 mg·L⁻¹) L-cisteína (25 mg·L⁻¹), sacarosa (30 g·L⁻¹) y agar (8 g·L⁻¹). Adicionado con reguladores de crecimiento como 2,4-D (10 mg·L⁻¹) y BA (0.5 mg·L⁻¹) para fomentar el desarrollo del callo.

3.6.2. Obtención de explantes.

Se fomentó el desarrollo de brotes a partir de tubérculos para obtener los explantes, esto se hizo sometiendo las papas a completa oscuridad y con un periodo de 1 semana a temperatura de 4°C para fomentar la brotación.

Una vez obtenidos los brotes se sometieron al proceso de desinfestación antes mencionado, para después tomar pequeños segmentos internodales para proceder a realizar la siembra. Los explantes fueron sembrados en frascos tipo Gerber con 20 ml de medio y se sembraron un total de 4 explantes por frasco.

III. Resultados y Discusión

4.1. Cultivos embriogénicos

4.1.1. Respuesta método directo

Las respuestas obtenidas con el método directo no fueron favorables para este proyecto, sin embargo Sánchez en 2005 reportó que este método y las concentraciones usadas son viables para la producción de embriones somáticos en papa en las variedades Atlantic y Fitrolay-1867, la diferencia radica en las variedades utilizadas, es por esto que probablemente al no haber trabajado los mismos materiales pueden llegar a comportarse de una manera diferente a pesar de pertenecer a la misma especie por lo que no fue posible obtener embriones por un método directo con las variedades utilizadas en este trabajo.

4.1.2. Respuestas método indirecto

Las respuestas obtenidas por este método fueron favorables y se logró obtener callos embriogénicos y la identificación de embriones somáticos. En primera instancia se evaluaron los 24 métodos de siembra para las variedades Fiana y NAU-6, posteriormente se seleccionaron 6 como los mejores métodos de siembra y sobre estos se siguió trabajando para llevar los callos a una etapa avanzada de callos embriogénicos.

4.1.2.1. Incremento de peso fresco

Para la recolección de estos datos se permitió el crecimiento máximo en un mismo medio de cultivo de los explantes (segmentos de hoja), para posteriormente tomar el peso de cada uno de ellos y poder así comparar los 24 métodos de siembra que se plantearon en un principio. Los explantes obtenidos a partir de mesófilo de hoja tenían un peso inicial promedio de 0.02 gramos por explante. Por lo que a las pocas semanas se podía notar la ganancia de peso de esos explantes.

4.1.2.2. Niveles de respuesta

Para analizar el nivel de respuesta de los explantes se estableció una escala visual que varía de 0 a 3 dependiendo del grado en que se presentaban los diferentes aspectos (oxidación, contaminación y nivel de respuesta), siendo 0 la ausencia de la característica y 3 el nivel más alto.

En los tratamientos 1 y 2 los explantes presentaron altos niveles de necrosamiento y baja respuesta, a pesar de esto no se presentó nivel de contaminación de gran importancia.

Por otro lado el tratamiento 3 mostró necrosamiento de tipo 2 en algunos explantes y se presentaban entre 4 y 5 explantes viables de un total de 5 repeticiones, en cuanto al nivel de respuesta los tejidos cultivados presentaban respuestas de 1 y 2 conforme a la escala visual establecida. Por lo que los niveles de respuesta eran aceptables.

Los tejidos o explantes cultivados en el tratamiento 4 no presentaron necrosamiento, en cuanto a la viabilidad se observó 5 explantes con respuesta de cada 5 repeticiones, en el aspecto del nivel de respuesta se presentaron respuestas de nivel 3, sin embargo las respuestas de tipo 2 fueron las que predominaron.

Los callos obtenidos en esta etapa presentaban un color café claro debido a que se colocaron bajo condiciones de completa oscuridad para fomentar la formación de callos, inmediatamente después de que se sembraban los segmentos de hoja perdían su coloración verde y se tornaban de un color blanco para posteriormente en los bordes de los explantes formar pequeños agregados celulares que pasarían a ser los callos embriogénicos.



Figura 5. Respuesta de callos obtenidos a partir de mesófilo de la hoja cultivado en medio MS con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), incubados en oscuridad durante 6 semanas.

En la figura anterior se puede observar el color que tomaban los callos obtenidos *in vitro* así como también la formación de los mismos en el borde

del explante de mesófilo de la hoja, cabe mencionar que este tipo de callos fueron obtenidos después de 6 semanas de incubación en completa oscuridad.

4.1.2.3. Análisis de varianza de Ganancia máxima

En el análisis de varianza los datos nos arrojaron que existe una diferencia estadística entre los diferentes métodos de siembra. Para hacer el análisis se seleccionaron los datos de los tratamientos 3 y 4 de las variedades FIANA y NAU-6 debido a que los resultados arrojados por el tratamiento 1 y 2 no presentaron una respuesta que pudiera ser analizada estadísticamente.

En el caso de los tratamiento 1 y 2 podemos decir que la respuesta no es la apropiada para la producción de callos potencialmente embriogénicos, el tratamiento 1 representaba el control (sin reguladores de crecimiento) y en el tratamiento 2 la concentración no era lo suficientemente alta para promover la formación de callos que posteriormente pudieran formar embriones.

Los resultados del análisis demostraron que existe un efecto estadístico significativo en la ganancia de peso con respecto a los métodos de siembra en los tratamientos con reguladores en mayor concentración (3 y 4). También se realizó el análisis de varianza entre tratamiento sin embargo los resultados obtenidos muestran que no existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos analizados (3 y 4)

4.1.2.4. Comparación de medias de incremento de peso fresco

4.1.2.4.1. Variedad FIANA

Se realizaron dos pruebas estadísticas de comparación de medias, Diferencia Mínima Significativa Honesta (DMSH) y comparación de medias de Tukey, en ambas pruebas se pueden distinguir grupos, por lo que dependiendo de lo que se buscaba se realizaba la selección del tipo de análisis utilizado.

Como se muestra en el cuadro 10 en la comparación de medias del tratamiento 3 de la variedad Fiana, se agrupan con medias más altas los métodos de siembra EIC2, HTS2 y EIC1, por lo que se considera que estos tres métodos son los mejores ya que lo que se busca en esta etapa el incremento de peso en los callos para posteriormente formar embriones.

Cuadro 10. Efecto del método de siembra sobre la ganancia de peso, Var. FIANA tratamiento 3

Método de siembra	Media (gramos)
HTS2	0.2915 ± 0.056 a
EIC2	0.2905 ± 0.042 a
EIC1	0.2470 ± 0.072 ab
ETS3	0.1989 ± 0.071 bc
HTS3	0.1415 ± 0.019 bc

Se presenta la comparación de medias de Tukey con su desviación estándar de los métodos de siembra con $p \leq 0.05$. Letras diferentes significa diferencia estadística.

Por otro lado para el tratamiento 4 de la misma variedad (FIANA) se obtuvo que los tratamientos con la media más alta fueron ETS1, EIS2, HTS2, HTC2 HIS2 EIC3 y HIC1, el análisis se representa en el cuadro 11.

Cuadro 11. Efecto de los métodos de siembra sobre la ganancia de peso en Var. FIANA tratamiento 4.

Método de siembra	Media (gramos)
EIS2	0.2297 ± 0.054 a
HTS2	0.1923 ± 0.053 ab
ETS1	0.1869 ± 0.044 ab
HIS2	0.1780 ± 0.073 ab
HIC1	0.1672 ± 0.045 ab
EIC3	0.1638 ± 0.054 ab
HTC2	0.1607 ± 0.057 ab
HIS1	0.1586 ± 0.020 b
HIC2	0.1373 ± 0.025 bc
HTS3	0.0792 ± 0.013 c

Se presentan las medias con su desviación, de la ganancia de peso de los métodos de siembra con $p \leq 0.05$, misma letra significa igualdad en los resultados.

4.1.2.4.2. Variedad NAU-6

Del mismo modo que para la variedad Fiana se realizaron ambos análisis de comparación de medias, sin embargo se decidió seleccionar el método de DMSH debido a que los grupos se diferenciaban de una mejor manera. En el cuadro 12 se puede observar que para esta variedad los métodos de siembra que sobresalieron en el tratamiento 3 fueron: HTC2, ETC3, ETC1, HTS2, ETS2.

Cuadro 12. Efecto del método de siembra sobre la ganancia de peso de la Var. NAU-6 tratamiento 3.

Método de siembra	Media (Gramos)
HTS2	0.1733 ± 0.075 a
HTC2	0.1610 ± 0.063 ab
ETC1	0.1278 ± 0.016 abc
ETS2	0.1189 ± 0.0167 abc
ETC3	0.1164 ± 0.006 abc
EIC1	0.1028 ± 0.017 bc
HTC3	0.1019 ± 0.014 bc
HTS3	0.0991 ± 0.016 bc
ETS3	0.0971 ± 0.009 bc
HIS3	0.0937 ± 0.020 bc
HTC1	0.0925 ± 0.028 bc
ETS1	0.0890 ± 0.012 c
EIS1	0.0877 ± 0.014 c
HIS1	0.0822 ± 0.028 c
HIS2	0.0815 ± 0.020 c
ETC2	0.0707 ± 0.019 c

Se presentan las medias con su desviación de la ganancia de peso de los métodos de siembra, letras diferentes significa desigualdad en los resultados (Tukey, $p \leq 0.05$)

En el análisis de comparación de medias para la variedad NAU-6 en el tratamiento 4 están representados en el cuadro 13, donde los métodos con las medias más altas fueron: HIC2, EIS3, EIS2, ETS2. Es importante destacar que en este tratamiento y esta variedad se presentó la mayor cantidad de grupos formados, con esto nos podemos observar la gran variación de los

datos entre los métodos de siembra ya que podemos encontrar medias desde 0.07 hasta 0.173 mg.

Cuadro 13. Efecto de los métodos de siembra en la ganancia de peso sobre la ganancia de peso de la Var. NAU-6 tratamiento 4.

Método de siembra	Media (Gramos)
ETS2	1.0454 ± 0.21 a
HIC2	0.8344 ± 0.16 ab
EIS2	0.8318 ± 0.19 ab
EIS3	0.8064 ± 0.12 ab
HTS3	0.7589 ± 0.079 bc
ETC3	0.7144 ± 0.022 bc
HIS2	0.6891 ± 0.034 bc
ETS1	0.6522 ± 0.021 bcd
ETC2	0.6121 ± 0.123 bcde
HTC2	0.5461 ± 0.089 cdef
ETC3	0.4270 ± 0.024 defg
HTS2	0.4101 ± 0.046 defg
HIS3	0.3708 ± 0.079 efgh
ETS3	0.3285 ± 0.012 fgh
HTC3	0.3270 ± 0.011 fgh
HTS1	0.2265 ± 0.05 gh
HTC1	0.1819 ± 0.040 h
HTC1	0.1705 ± 0.041 h

Se presenta la comparación de medias con su desviación estándar de los métodos de siembra. Letras diferentes significa diferencia estadística. (Tukey, $p \leq 0.05$)

4.1.2.5. Identificación de un método único de siembra

Posterior a esto se procedió a realizar un análisis de comparación de medias para cada uno de los parámetros evaluados; colocación del mesófilo, presencia o ausencia de nervadura, ubicación en la planta y ubicación en la hoja. Esto con el propósito de saber si tenían algún efecto sobre la ganancia de peso o no eran de relevancia.

4.1.2.5.1. Efecto de la colocación del mesófilo

Debido a los resultados obtenidos y a una comparación estadística de medias del incremento de peso fresco con respecto a la posición del mesófilo encontramos que este aspecto juega un papel importante, ya que la comparación de medias indica que existe una diferencia estadística significativa. En la figura 6 se puede observar la diferencia entre los explantes sembrados sobre el haz y sobre el envés. Cabe destacar que si se hace referencia al haz el explante se encuentra en una posición invertida y si se hace referencia al envés significa que la hoja se encontraba en posición normal.

Se puede observar la diferencia que existe entre las medias de los explantes que se sembraron con el haz en contacto con el medio y los sembrado con el envés en contacto con el medio, el análisis nos indica que en cuanto a ganancia de peso es de mayor relevancia colocar el haz en contacto con el medio, por lo que se puede decir que es mejor.

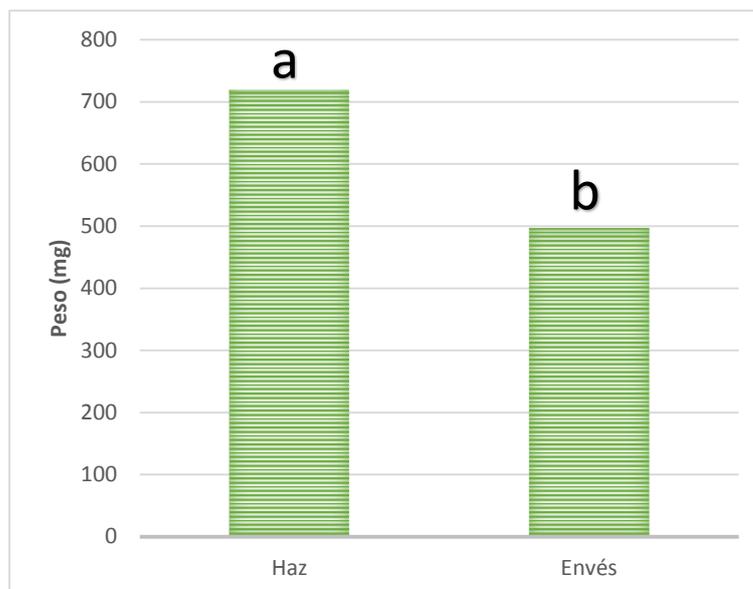


Figura 6. Peso promedio de los explantes con respecto a la posición de la hoja, el medio utilizado fue MS con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como reguladores de crecimiento, incubado un periodo de 6 semanas en obscuridad.

Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por JayaSree *et al.*, en 2001 debido a que utilizar la parte adaxial en contacto con el medio para obtener callos embriogénicos, por lo que en conjunto con los resultado de este estudio podemos decir que es mejor utilizar la siembra de los explantes por la parte adaxial o en posición invertida cómo se maneja en esta investigación.

4.1.2.5.2. Obtención de callos en hojas tomadas de regiones intermedias y terminales

En este caso se tienen dos posibles tipos de explante, los obtenidos de la región intermedia del tallo y de la región terminal o apical de la planta, esto se realizó con el propósito de ver el efecto que tenían la región de la planta. Al hacer el análisis de comparación se obtuvo como resultado que existe una diferencia significativa para el caso de estas dos variables. En la figura 7 se

puede observar el grafico que nos demuestra que existe una diferencia estadística significativa.

Podemos decir que los explantes obtenidos de las hojas que se encuentran en la parte intermedia de la planta logran un mayor incremento de peso, los resultados muestran que estos dos parámetros se posicionan en dos grupos diferentes por lo que se puede decir que existe una diferencia estadística significativa.

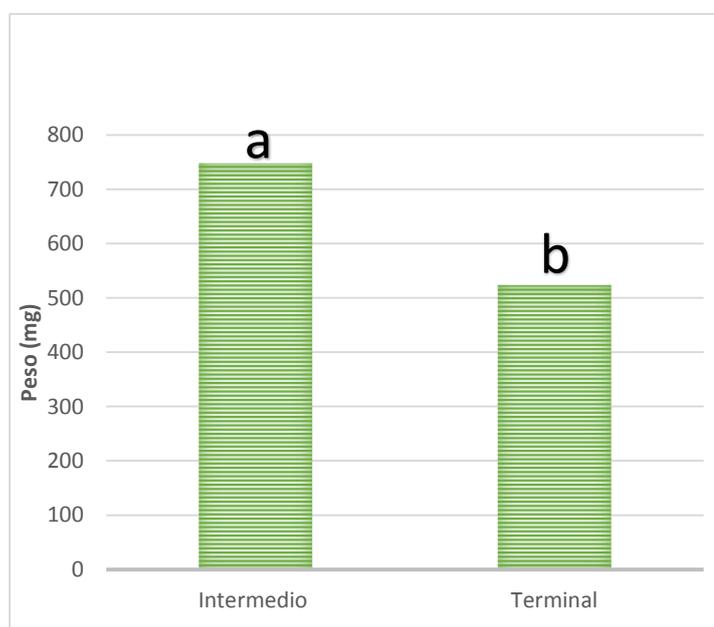


Figura 7. Promedio de los explantes con respecto a las regiones intermedias y terminales en medio MS, suplementado con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), incubado un periodo de 6 semanas en completa oscuridad.

4.1.2.5.3. Efecto de la región de la lámina foliar

En este caso la hoja se segmentó en regiones contando como región 1 a la región donde se encuentra el peciolo, la región 2 pertenecía a la región intermedia de la hoja o limbo y la región 3 a la región del ápice de la hoja. El análisis estadístico demostró que existe una diferencia entre estos tres tipos de explantes.

Como se muestra en la figura 8 los explantes que presentaron incremento de peso de hasta 700 mg fueron los obtenidos a partir de la región 2 de la hoja. Por encima de los obtenidos de la región 1 y 3 que apenas alcanzaron los 500 mg y se posicionaron en un mismo grupo por lo que son estadísticamente iguales y a su vez estadísticamente diferentes a los explantes de la región 2.

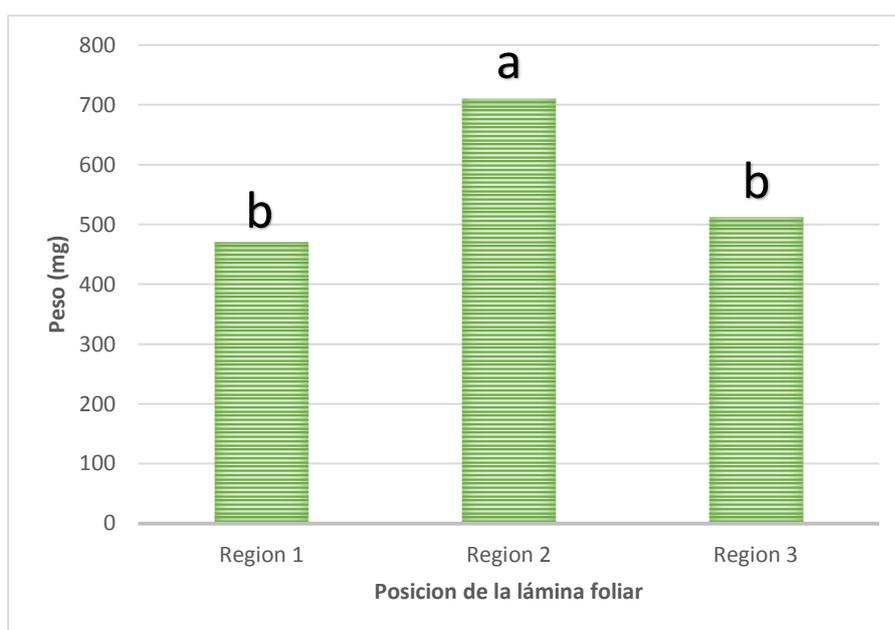


Figura 8. Peso promedio de los explantes obtenidos de las diferentes posiciones de la lámina foliar, cultivado en medio MS con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como reguladores de crecimiento.

JayaSree *et al.*, en 2001 reportar la eliminación de la parte apical y la parte del peciolo de la hoja para realizar la siembra de los explantes y obtener embriones somáticos, podemos relacionar estos resultados debido a que en esta investigación la región 2, que presenta mejor respuesta, representa la parte de la hoja utilizada en estudios anteriores para obtener callos embriogénicos.

4.1.2.5.4. Efecto de la presencia o ausencia de la nervadura en el cultivo *in vitro* del mesofilo de la hoja.

En esta evaluación se analizó el efecto que tiene la nervadura sobre la ganancia de peso de los callos. En la figura 9 se muestra la comparación de medias para la presencia o ausencia de nervadura.

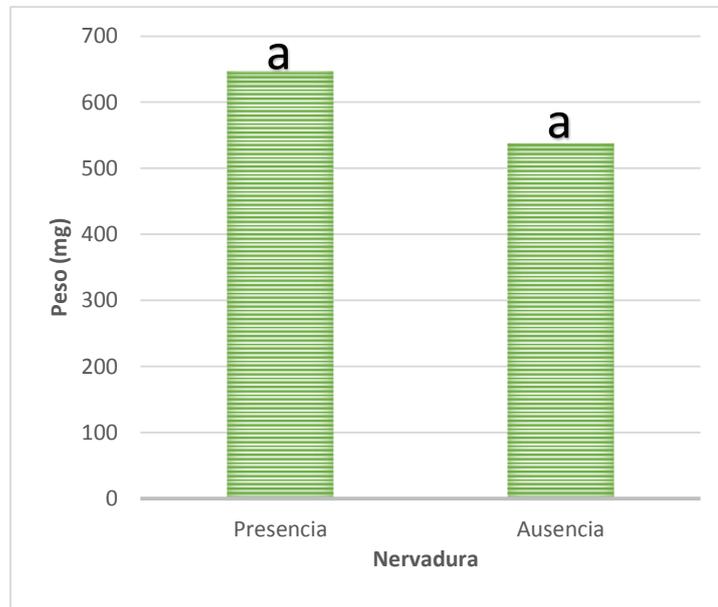


Figura 9. Promedio del efecto de la nervadura con explantes cultivados en medio MS con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en completa obscuridad durante 6 semanas.

Con este análisis podemos observar que la nervadura no juega un papel importante para la formación de callo debido a que no se presentó diferencia estadística significativa, sin embargo la nervadura puede ser un factor importante a considerar para la diferenciación de otro tipo de tejidos bajo cultivo *in vitro* en procesos como la organogénesis.

4.1.2.5.5. Mejor método de siembra

Con base en los resultados mostrados anteriormente podemos establecer un único y mejor método de siembra, tomando como referencia la diferencia estadística presente o no en cada uno de los parámetros evaluados. Para el caso de la posición del explante podemos seleccionar la posición que

proporcione un mayor incremento de peso que fue con el haz en contacto con el medio o bien en posición invertida; los explantes obtenidos de la región intermedia de la planta mostraron estar por arriba del promedio de los explantes de la parte terminal, con base en la diferencia estadística podemos decir que la mejor parte para obtener explantes es la parte intermedia de la planta; Para seleccionar la región de la hoja tomamos como referencia que existe un agrupamiento de la región 1 y 3, la región 2 quedo por arriba de estas dos y presento una diferencia estadística significativa por lo que se seleccionó la región 2 como la mejor. Por último la presencia o la ausencia de nervadura no presento una diferencia estadística significativa por lo que se determinó que no tiene un efecto directo sobre la ganancia de peso para la producción de callos embriogénicos al menos en explantes de papa.

Con este análisis de los resultados obtenidos podríamos establecer un único método de siembra, podemos decir que el mejor método de siembra para la ganancia de peso para la producción de callo embriogénico seria sembrar con el haz en contacto con el medio (envés hacia arriba), tomar los explantes de la región intermedia de la planta y usar los explantes de la región 2 de la hoja (EI2 = Envés, Intermedio, Región 2). Aquí excluimos la presencia o ausencia de nervadura debido a que el análisis no muestra una diferencia si se siembra en presencia o ausencia de nervadura.

Se decidió seleccionar únicamente 6 métodos de los 24 evaluados en un principio. A pesar de que se logró delimitar el mejor se decidió tomar 6 para tener un factor de comparación en futuros estudios sobre embriogénesis.

4.1.2.7. Selección de los mejores métodos de siembra.

Una vez obtenidos los resultados de los análisis de comparación de medias para ambas variedades (FIANA y NAU-6) en los dos tratamientos (3 y 4) se seleccionaron los mejores métodos obtenidos o los que presentaban una ganancia de peso mayor, esto para establecer una relación e identificar con cuales se seguiría trabajando.

Para realizar la selección de los 6 mejores métodos de siembra se tomaron los valores agrupados más altos de medias para cada uno de las variedades y de los tratamientos. En el cuadro 14 se muestran los métodos de siembra que presentaron las mayores medias y quedaron en el mismo grupo en el análisis de comparación de medias, para hacer la agrupación se descartó la presencia o ausencia de nevadura y se seleccionaron los grupos que se repetían por lo menos en dos tratamientos.

Cuadro 14. Relación entre mejores métodos de siembra.

TIP 3 Fiana	TIP 4 Fiana	TIP 3 NAU-6	TIP 4 NAU-6
<u>EIC2</u>	<u>ETS1</u>	<u>HTC2</u>	<u>HIC2</u>
<u>HTS2</u>	<u>EIS2</u>	ETC3	<u>EIS3</u>
EIC1	<u>HTS2</u>	<u>ETC1</u>	<u>EIS2</u>
	<u>HTC2</u>	<u>HTS2</u>	<u>ETS2</u>
	<u>HIS2</u>	<u>ETS2</u>	
	<u>EIC3</u>		
	HIC1		

Se presenta los mejores métodos para cada uno de las variedades y tratamientos analizados.

En el cuadro anterior se presenta la selección de los 6 mejores métodos de siembra, la línea que presentan indica que se repite al menos una vez en diferente tratamiento o variedad, por lo que fueron seleccionados ET1, EI2, HT2, HI2, EI3 y ET2. Es importante destacar que dentro de los 6 mejores métodos seleccionados se encuentra en método predicho anteriormente (EI2). En la figura 10 se presenta el gráfico con los promedios de los 6 mejores métodos de siembra, es importante destacar que a pesar de que se observa una gran diferencia, el promedio de estos métodos está por arriba de los 18 restantes.

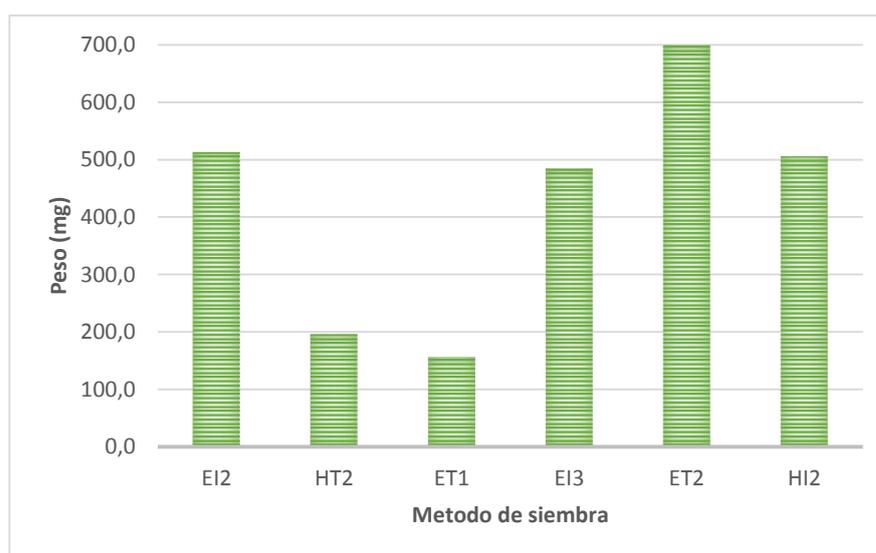


Figura 10. Promedio de los 6 métodos de siembra seleccionados como los mejores, cultivados en medio MS con 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como reguladores de crecimiento.

En la figura anterior podemos observar el incremento de peso fresco en los diferentes métodos de siembra seleccionados para continuar con el proyecto, los callos que se obtuvieron de estos 6 métodos presentaban características físicas similares, el color que se observó era café claro, con una textura compacta y el tipo de crecimiento se presentaba principalmente al borde de la hoja. Fuentes *et al.*, en 2005 reportan que el regulador de crecimiento 2,4-D

promueve la formación de callos con aspecto físico compacto en combinación con BA, esto coincide con lo obtenido en este trabajo debido a que utilizaron estos reguladores de crecimiento.

Una vez seleccionados los 6 mejores métodos de siembra se procedió a evaluarlos con los mismos reguladores de crecimiento y llevarlos a una fase más avanzada de producción de embriones.

JayaSree *et al.*, en 2001 Obtuvieron embriones somáticos de papa utilizando como reguladores de crecimiento 2,4-D y BA, obteniendo callos que pueden ser estimulados con los reguladores como BA y Zeatina para obtener embriones somáticos. Por lo que hasta este punto de la presente investigación utilizaron estos reguladores de crecimiento y en etapas posteriores se procedió a utilizar GA₃ en combinación con Zeatina.

4.1.2.8. Evaluación de obtención de callos embriogénicos

4.1.2.8.1. Incremento de peso fresco de callos

Para realizar la evaluación de los métodos seleccionados y llevarlos a una etapa avanzada de embriogénesis se sometieron a concentración de reguladores de crecimiento del tratamiento indirecto de producción de callo (TIP). Se utilizaron concentración de reguladores de crecimiento que van de 0.0 a 10 mg·L⁻¹ de 2,4-D y de 0.0 a 0.5 mg·L⁻¹ de BA

Del mismo modo que en el estudio anterior se encontró que el tratamiento 1 (control) no tenía una respuesta favorable y no se logró identificar el desarrollo

de callos. Para el tratamiento 2 se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias, donde se obtuvo como resultado que no existe una diferencia estadística significativa entre los métodos de siembra. Con estos resultados podemos decir que bajo las condiciones del tratamiento 2 los diferentes métodos de siembra no tienen un efecto sobre el incremento del peso fresco.

También se analizaron por medio de una comparación de medias de Tukey los datos individuales para el tratamiento 3 y se encontró que la comparación se formaron dos, sin embargo los tratamiento con las medias más altas fueron HI2, ET1, HT2, ET2. Sin embargo los últimos dos pertenecen al segundo grupo, son estadísticamente iguales a los que presentan un menor promedio, es por esto que se puede decir que para la ganancia de peso en el tratamiento 3 los dos mejores métodos de siembra serían HI2 y ET1.

Cuadro 15. Efecto del tratamiento 3 (TIP) sobre la ganancia de peso de los callos.

Método de siembra	Media (mg)
HI2	301.8 ± 101.5 a
ET1	300.5 ± 156.4 a
HT2	211.8 ± 151.0 ab
ET2	168.5 ± 38.6 ab
EI2	146.5 ± 26.8 b
EI3	130.5 ± 37.1 b

Se presenta el promedio ± la desviación estándar de cada uno de las medias analizadas y en análisis de comparación de medias de Tukey

Posteriormente se analizaron los datos de los 6 mejores métodos para el tratamiento 4 (TIP) con respecto al incremento de peso una vez trasladados de una fase a otra y transferidos a condiciones de luz se encontró que existe

una diferencia significativa y se observa que se forman dos grupos, sin embargo 5 métodos pertenecen al mismo grupo solo queda por fuera el método de siembra ET2, por lo que podemos decir que este método no responde de una manera adecuada para este tratamiento y es estadísticamente diferente al resto, como se puede observar en el cuadro 16.

Cuadro 16. Comparación de medias para los 6 métodos evaluados en tratamiento 4 (TIP)

Método de siembra	Media (mg)
HT2	243.9 ± 130.5 a
EI3	198.3 ± 69.8 a
EI2	195.9 ± 105.6 a
HI2	175.5 ± 55.83 ab
ET1	134.8 ± 9.20 ab
ET2	57.3 ± 7.02 b

Se presenta el promedio ± la desviación estándar de cada uno de las medias analizadas y el análisis de comparación de medias de Tukey. Letras similares representa igualdad

Con estos resultados podemos observar que es mayor el incremento de peso en el tratamiento 3 que en el tratamiento 4, sin embargo la homogeneidad de los datos está más marcada en el tratamiento 4 ya que no existe tanta variación entre las repeticiones pero el incremento de peso es menor.

4.1.2.8.2. Comparación entre tratamientos

En esta parte se compararon los métodos de siembra en los diferentes tratamientos, por lo que se analizó el comportamiento de cada uno de ellos en los 4 tratamientos que contenían 2,4-D y BA. Como resultado obtuvimos que no existe una diferencia estadística significativa entre el tratamiento 1 y 2, ni tampoco en el tratamiento 3 y 4, sin embargo si existe una diferencia estadística entre los tratamientos 1-2 y 3-4, este comportamiento se siguió en

los 6 métodos de siembra utilizados en esta parte del proyecto. Los tratamientos 1 y 2 presentaban concentraciones de reguladores de crecimiento bajas y los tratamientos 3 y 4 presentaban concentraciones más elevadas que podían llegar hasta $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA

4.1.2.8.3. Eficiencia en la respuesta.

La eficiencia en la respuesta fue evaluada estableciendo una relación entre el número de explantes sometidos al medio de cultivo y los explantes que presentaron una respuesta favorable.

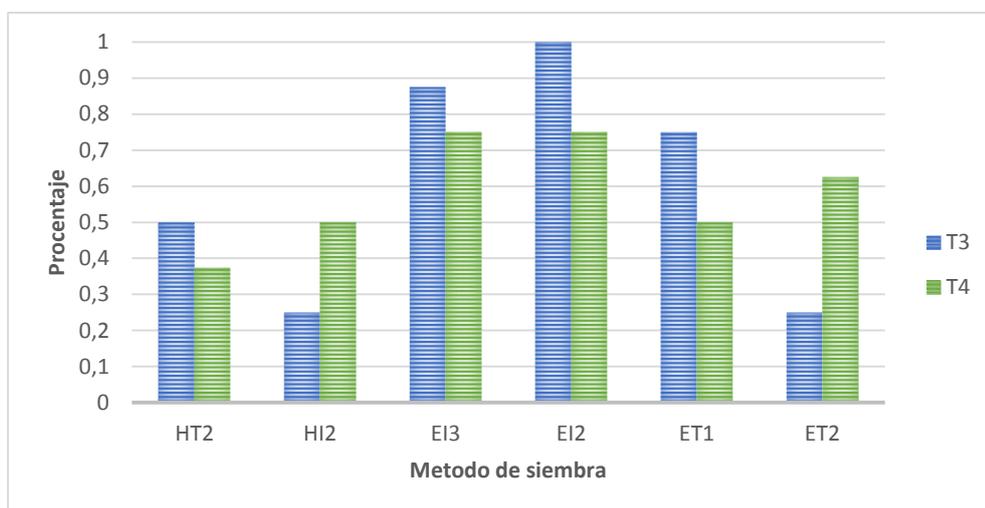


Figura 11. Eficiencia en la respuesta en cuanto al incremento de peso de explantes de mesófilo de la hoja, en medio MS, utilizando de los explantes sembrados. Utilizando $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA. La eficiencia fue obtenida por medio de la relación de los explantes sembrados y los explantes con respuesta.

En la figura 11 se muestra la eficiencia en la respuesta de los explantes de mesófilo de la hoja, se sembraron un total de 8 repeticiones y con base en el número de explantes que presentaron respuesta se obtuvo la eficiencia de cada uno de los métodos de siembra. Lo que nos dice que el método de siembra más eficiente en la respuesta fue el EI2 que en el tratamiento 3 obtuvo un 100 % de eficiencia. A pesar de esto también hubo tratamientos que presentaron una eficiencia baja de hasta 25 %. Lo que indica que existe

mucha variación en lo que respecta a la eficiencia entre los diferentes métodos de siembra.

4.1.2.8.4. Relación del Incremento de peso del callo y la eficiencia de respuesta

Se realizó una comparación entre el incremento de peso de callo y la eficiencia de la respuesta obtenida, donde podemos decir que en el tratamiento 3 los mejores resultados en cuanto al incremento de peso se obtuvieron en los métodos HI2 y ET1 pero como podemos observar en la figura 10 no son los que obtuvieron mejor eficiencia, los más eficientes en el tratamiento 3 fueron EI2 y EI3 por lo que podemos decir que la eficiencia y el incremento de peso no están relacionados.

En caso de que se requiera mayor eficiencia en la respuesta sería conveniente utilizar los métodos de siembra EI2 y EI3, pero si lo que se busca es el incremento de peso es mejor utilizar HI2 y ET1. Esto debido a que algunos métodos de siembra obtienen mayor incremento de peso y otros tienen una mejor eficiencia.

Es importante destacar que el método seleccionado anteriormente como el mejor método de siembra (EI2) fue el que presentó una eficiencia mayor en la respuesta de los explantes, ya que en el T3, que contenía $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, y en el T4 con $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, presentaron 100 % y 75 % de eficiencia respectivamente.

4.1.2.8.5. Evaluación del incremento de peso

Posteriormente los explantes obtenidos bajo los tratamientos indirecto de producción de callos (TIP) fueron trasladados a los medios del Tratamiento

Indirecto de Formación de embriones (TIF), que contenían como reguladores de crecimiento GA3 y Zeatina en concentraciones que van de 0.025 a 1.0 mg·L⁻¹ . Solo los tratamientos 3 y 4 que presentaban las concentraciones más altas de GA3 y Zeatina, arrojaron datos suficientes para poder realizar un análisis de este tipo ya que los tratamiento 1 y 2 no tenían suficiente nivel de respuesta para tomar los pesos, debido a que presentaban altos niveles de necrosamiento y baja tasa de respuesta.

En el cuadro 17 se muestran las medias de cada uno de los TIF y podemos observar que se tiene un incremento mayor cuando se somete al tratamiento 4 (1.0 mg·L⁻¹ de GA3 y 1.0 mg·L⁻¹ de Zeatina) de formación de embriones procedente del tratamiento 3 (TIP) (3.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0.25 mg·L⁻¹ de BA), por lo que podemos decir que el mejor tratamiento para el incremento de peso es por mucho el tratamiento 4, ya que existe una diferencia estadística significativa y la diferencia es notable.

Cuadro 17. Efecto de los tratamientos (TIF) sobre el incremento de peso, proveniente del tratamiento 3.

Tratamiento	Media (mg)
13	135 b
23	230 b
33	397.2 b
43	897.6 a

Se presenta el promedio de cada uno de los tratamiento analizados, letras iguales no existe diferencia.

Del mismo modo se realizó un análisis de comparación de medias con respecto al incremento de peso para de los explantes provenientes del tratamiento 4 donde el primer número significa el tratamiento TIF (Tratamiento

Indirecto de Formación de embriones) y el segundo número representa al tratamiento de procedencia.

Cuadro 18. Efecto de los tratamientos (TIF) sobre el incremento de peso, provenientes de tratamiento 4

Tratamiento	Media (mg)
14	280.8 b
24	308.2 b
34	916.1 a
44	1298.3 a

Se presenta el promedio de cada uno de los tratamiento analizados, letras iguales no existe diferencia estadística significativa.

En el cuadro 18 se muestran las medias obtenidas en el incremento de los callos provenientes del tratamiento 4 (10.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg·L⁻¹ de BA) (TIP), donde podemos observar que los tratamiento 3 y 4 (TIF) presentan un incremento mayor que los tratamiento 2 y 3, por lo que podríamos decir que los mejores tratamiento para el incremento de peso de callos procedentes del tratamiento 4 son el tratamiento 3 (0.5 mg·L⁻¹ de GA3 y 0.5 mg·L⁻¹ de Zeatina) y el tratamiento 4 (1.0 mg·L⁻¹ de GA3 y 1.0 mg·L⁻¹ de Zeatina) debido a que en el análisis estadístico forman parte de un mismo grupo y existe una diferencia estadística significativa con respecto a los otro dos tratamientos analizados.

4.1.2.8.6. Comparación del incremento.

Se realizó una comparación entre los tratamientos 3 y 4 con respecto al incremento del callo en la etapa de formación de embriones, el análisis de varianza nos arrojó que existe una diferencia estadística entre estos, por lo

que se procedió a analizar todos los tratamientos utilizados. En el cuadro 19 podemos observar los grupos que se formar, y con base en esto podemos decir que en el incremento de peso, independientemente del tratamiento de procedencia, el tratamiento 3 presenta una mejor respuesta.

Cuadro 19. Comparación del incremento los tratamientos indirectos de formación de embriones

Tratamiento	Media (Incremento)
43	6.92 ± 0.56 a
44	5.78 ± 1.65 ab
41	4.21 ± 0.45 bc
42	4.05 ± 1.86 bc
34	3.69 ± 0.59 bc
33	3.18 ± 0.56 bc
32	2.78 ± 0.95 bc
31	2.66 ± 0.58 bc

Se presentan las medias del incremento para cada uno de los tratamientos utilizados, letras diferentes significa diferencia estadística. El valor representa el número de veces que se incrementó el peso en comparación con el peso original

Con los resultados obtenidos en este análisis podemos decir que el incremento de peso en el tratamiento 43 es casi 7 veces más que el peso original del callo, por lo que esta combinación sería la mejor para el incremento de peso, callos que procedan del tratamiento 3 (TIP) y sembrarlos en el tratamiento 4 (TIF). En la figura 12 podemos observar el grafico que representa a los promedio del incremento en los diferentes tratamientos donde el tratamiento 44 aparentemente presenta el incremento más grande, seguido del tratamiento 43, esta grafica nos da una idea del papel que juegan

los reguladores de crecimiento en la ganancia de peso debido a que es notable que conforme aumenta la concentración aumenta la ganancia de peso. También es importante destacar que independientemente del tratamiento que se emplee va a existir un incremento en el peso por lo menos del doble en 4 semanas de incubación.

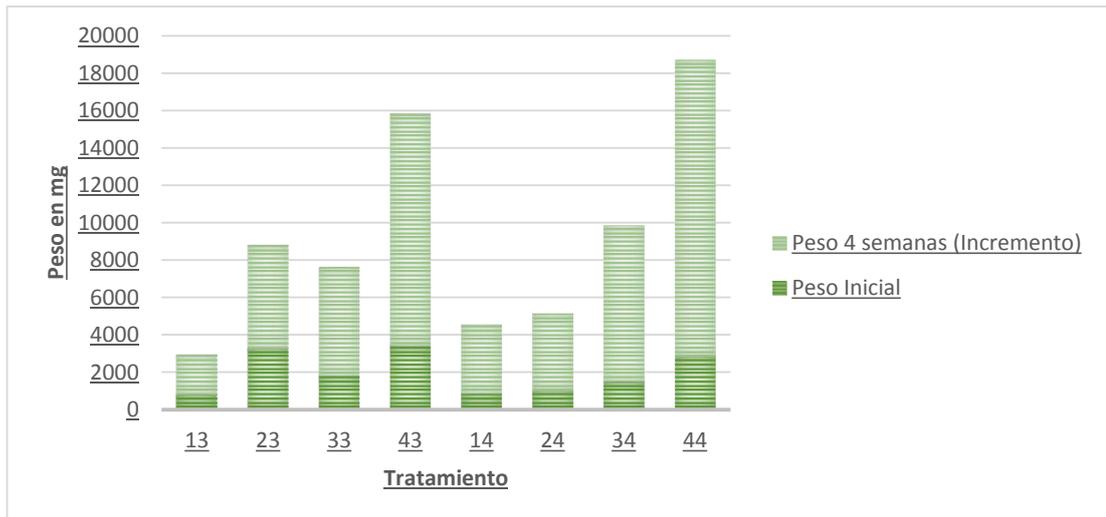


Figura 12. Relación del peso inicial y el incremento de peso de explantes de mesófilo de la hoja cultivado en medio MS, con reguladores de crecimiento BA y 2,4-D para obtener el peso inicial y transferidos a medio con GA3 y Zeatina como reguladores de crecimiento para obtener el incremento.

Con los resultados anteriores podemos decir que conforme aumenta la concentración de reguladores de crecimiento el incremento de peso de los explantes es mayor debido, sin embargo a pesar de que la concentración sea baja se logra un incremento significativo. También es importante destacar que a pesar de que se tiene un incremento importante con altas concentraciones no quiere decir que la calidad y cantidad de embriones sea la que se busca.

Szabados *et al.*, en 1991 reportaron callos frescos en alfalfa brasileña (*Stylosanthes guianensis*) con un peso de 0.6 gramos, implementando diferentes agentes gelificantes, por otro lado en este experimento se obtuvieron pesos en callo fresco mayor a los reportados por estos autores.

Daquinta *et al.*, en 1994 reportó callos con pesos de hasta 1.1 gramos, utilizando Dicamba, Zeatina y BAP en concentraciones que van desde 0.5 hasta 2.5 en el cultivo de piña (*Ananas comosus*). Con estos resultados podemos observar que coinciden con los obtenidos en este trabajo debido a que en algunos casos se logró obtener callos que pesaban hasta 1.2 gramos, obtenidos de un explante de 1 cm de diámetro.

4.1.2.8.7. Identificación de callos embriogénicos

En un inicio se incubaron los explantes en completa oscuridad, sin embargo cuando eran trasladados a un medio de cultivo de inducción de embriones somáticos se sometieron los embriones a condiciones de luz para su desarrollo, después de una semana la estructura callosa paso de ser café claro a verde claro, y con el paso del tiempo se tornaron verde intenso. Después de que las estructuras cambiaron de color se comenzaron a observar a simple vista, pequeñas estructuras globulares, lo que nos indicaba que efectivamente eran callos embriogénicos, para posteriormente tomar fotografías y sustentar lo observado.

En la figura 13 se presentan dos imágenes, la imagen A representa a un callo crecido en completa oscuridad después de 6 semanas y la imagen B representa a un callo obtenido después de ser transferido a la luz, donde claramente se puede observar el cambio de coloración de café claro a verde intenso por la presencia de luz. Los callos obtenidos hasta etapa fueron pesados y analizados por lo que nos dimos cuenta que la ganancia de peso puede llegar a ser de hasta 1.4 gramos por explante como se muestra en la figura.

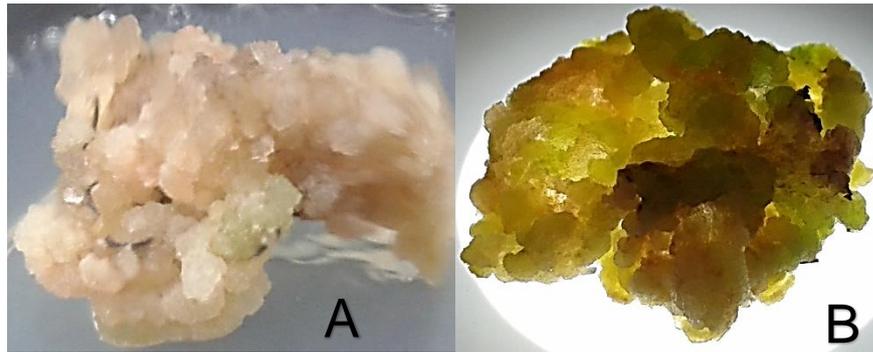


Figura 13. Callos embriogénicos presencia y ausencia de luz. A) Callo cultivado en ausencia de luz con BA y 2,4-D como reguladores y B) callo cultivado en presencia de luz con GA3 y Zeatina como reguladores de crecimiento.

Con ayuda del estereoscopio fue posible identificar las diferentes etapas embriogénicas. Así como también se logró observar la presencia de embriones maduros. Dentro de la figura 14 se puede observar los diferentes tipos de estructuras obtenidas bajo cultivo *in vitro*, en la imagen A podemos apreciar una estructura globular, en la imagen B una estructura en estado torpedo y por último en la imagen C una estructura en el estado corazón, adicional a esto se puede apreciar en la imagen D una estructura con características embriogénicas avanzadas. Con observaciones visuales y con ayuda del estereoscopio se pudo observar el desarrollo de embriones hasta la formación de platas, con esto nos podemos dar cuenta de que los callos embriogénicos tienen la capacidad de producir embriones que pueden llegar a formar plantas completas.

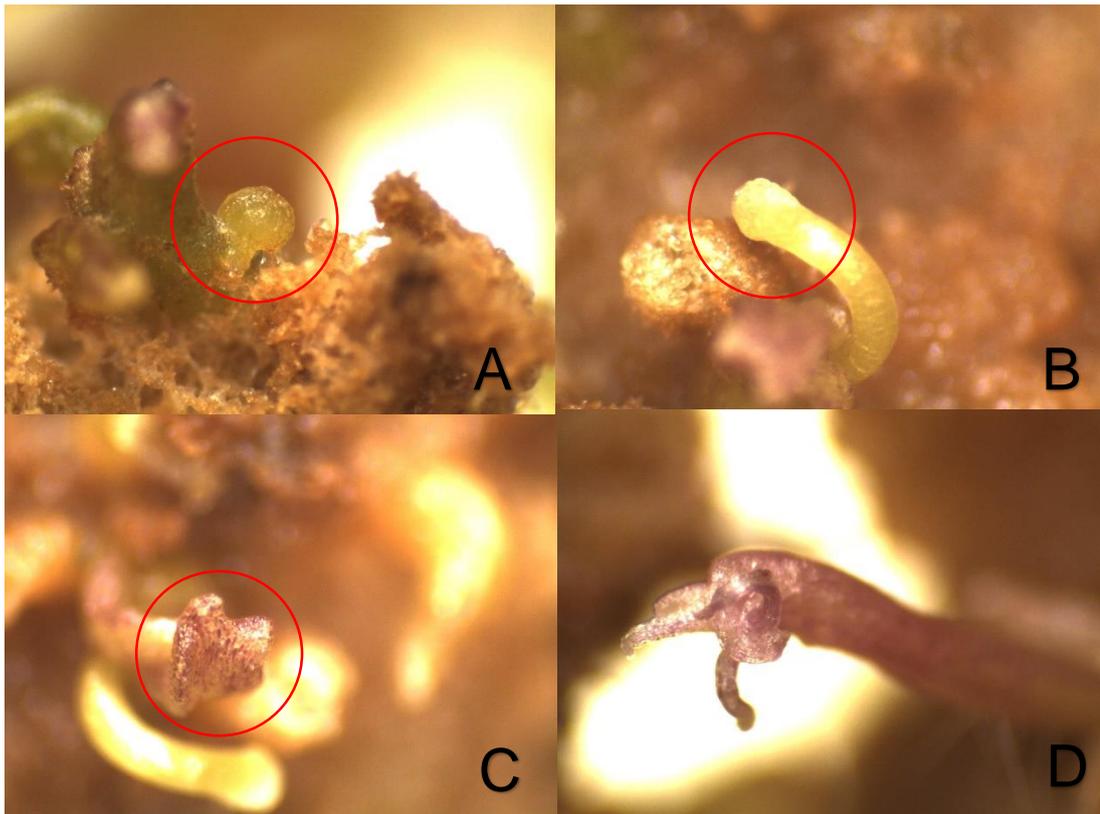


Figura 14. Identificación de estructuras embriónicas. A) Estructura en fase globular, B) Estructura en fase torpedo, C) Estructura en fase corazón, D) Estructura embriónica avanzada. Cultivadas en medio MS con GA3 y Zeatina como reguladores. Obtenidos después de 8 semanas de incubación.



Figura 15. Formación de embriones a partir de callos, embrión cultivado en medio MS suplementado con GA3 y Zeatina como reguladores de crecimiento, explante obtenido de mesófilo de la hoja.

En la figura anterior podemos observar cómo es posible la obtención de embriones a partir de callos, se puede ver como a partir de una estructura callos brota una estructura embriónica que es potencialmente viable para

la formación de una planta completa. Sharma y Millan, en 2004 reporta la obtención de embriones somáticos a partir de explantes obtenidos de segmentos internodales utilizando como reguladores de crecimiento 2,4-D (5 μ M), lograron realizar el aislamiento de los embriones y obtener plantas completas con raíces y hojas, así como también obtener gran cantidad de embriones a partir de un solo explante, de igual manera en este trabajo se logró identificar las diferentes etapas embriogénicas y se logró obtener plantas completas a partir de embriones somáticos.

Los tratamientos que presentaron embriones después de todo el proceso fueron 31, 32 y 34 así como también 42, 43 y 44. Por lo que podemos decir que para la producción de embriones es necesario implementar los tratamientos indirectos de producción (TIF) 3 y 4 y colocarlos en medios de cultivo de cualquiera de los 4 tratamientos de formación de embriones (TIF), la diferencia radica en el tamaño del callo que se forma ya que los tratamientos con mayor concentración de reguladores de crecimiento forman callos más grandes y puede llegar a ser mayor su multiplicación, como se mostró en estudios anteriores.

Debido a los resultados observados en los explantes no fue posible el aislamiento de embriones en etapas maduras, sin embargo se tomaron embriones en etapas globulares para realizar una evaluación de la viabilidad de estos, sometiéndolos a condiciones *in vitro*.

4.1.2.8.8. Aislamiento de embriones

Fueron aislados embriones en estado globular para evaluar su comportamiento bajo condiciones *in vitro*, se obtuvieron de dos maneras una solamente tomando la parte globular que formaba el embrión y la segunda tomando un segmento pequeño de callo.

Como resultados en esta fase se observó que los que se tomaron con una pequeña parte de callo lograron desarrollar raíz y hojas en la parte aérea, con esto podemos decir que si los embriones aún no se han desarrollado hasta etapas avanzadas de embriogénesis es necesario colocar un parte de callo para que forman raíz y parta aérea, del otro modo si solo se selecciona la parte globular del embrión se comienza a formar callos nuevamente.



Figura 16. Callos con estructuras embriogénicas avanzadas, obtenidos a partir de mesófilo de la hoja, con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de GA3 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zeatina, como reguladores de crecimiento, incubado en oscuridad y luz por 8 semanas

En la figura anterior se puede observar callos que lograron desarrollar estructuras embriogénicas avanzadas, incluso hasta la formación de cotiledones. Se puede decir que se lograron observar de 8 a 12 estructuras embriogénicas por explante. También se logró hacer el aislamiento de

embriones maduros donde las plantas se lograron desarrollar correctamente presentando raíz y un buen desarrollo en la parte aérea.

En la evaluación de los tratamientos implementados para la evaluación de los embriones no pudimos dar cuenta que los medios que contenían ABA (2 y 4) no presentaban una respuesta favorable, estudios realizados por Raemakers *et al.*, 1995. Demostraron que la presencia de ABA no favorece la maduración de embriones somáticos por lo que podemos decir que nuestros resultados se apegan a estudios previos.



Figura 17. Desarrollo de raíces y tallos de embriones somáticos de explantes obtenidos de mesófilo de la hoja. En medio MS suplementado con ANA y GA3 como reguladores de crecimiento.

En la figura anterior se muestran raíces y brotes obtenidos a partir de embriones somáticos cultivados *in vitro* con esto podemos observar que se puede formar plantas completas a partir de embriones somáticos, en la imagen de a la esquina inferior izquierda se puede observar la abundancia de pelos radicales en la estructura radicular desarrollada por la planta.

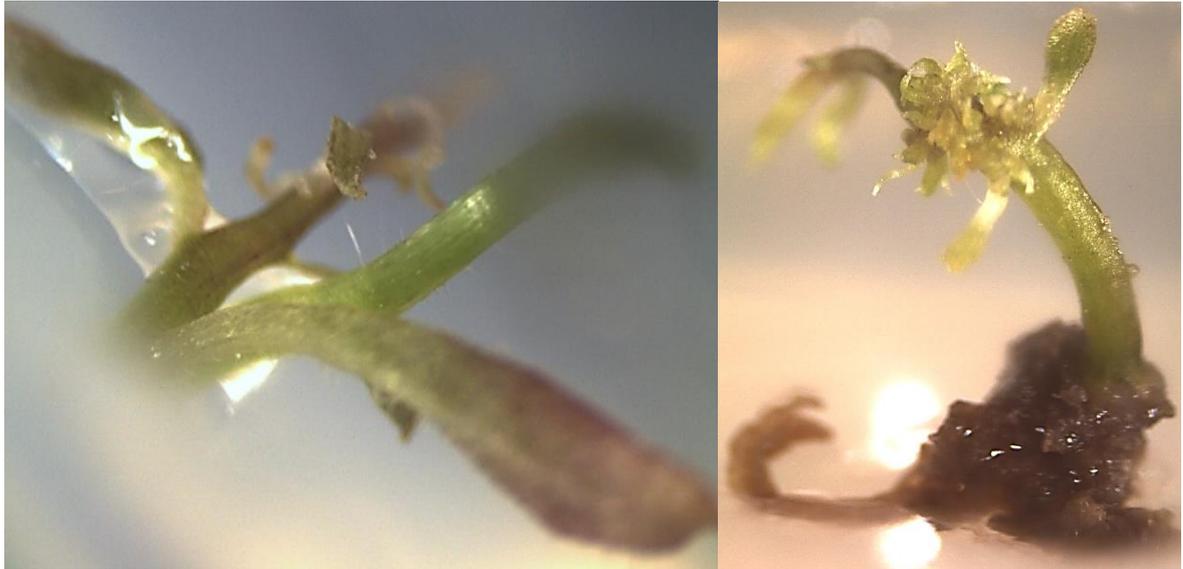


Figura 18. Plantas germinadas a partir de embriones somáticos bajo cultivo *in vitro* en medio MS ANA y GA3 como reguladores de crecimiento. En un periodo de 8 semanas

En la figura 18 podemos observar una planta proveniente de embriones somáticos y podemos ver que puede llegar a formar una planta completa si se le da el debido seguimiento y una buena fase de aclimatación. En la figura del lado derecho podemos observar cómo se forma la parte de la raíz que juega un papel importante en el periodo de aclimatación.

Debido a los intereses del proyecto es importante destacar que con la producción de embriones somáticos de papa bajo cultivo *in vitro* se puede dar solución a un problema importante en la industria agrícola, ya que es posible la encapsulación de estos embriones y por consiguiente utilizarlos como semilla sintética, por este motivo se llegó a la conclusión que es posible la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos, que a su vez pueden ser encapsulados y utilizados como semilla sintética debido a que los embriones son capaces de formar plantas completas y que quizá lleguen a etapas avanzadas de producción en campo.

Los embriones encapsulados con alginato tienen la capacidad de romper la cubierta y germinar, el embrión sometido a estas condiciones puede llegar a romper la estructura de alginato que lo envuelve y tener una buena germinación. Lee *et al.*, en 2009 reportaron hasta un 90 % de germinación en semillas sintéticas de *Laelia anceps* spp *dawsonii*. Con este tipo de estudios nos podemos dar cuenta que pueden obtenerse altos porcentajes de germinación en colaboración con reguladores de crecimiento como BA.

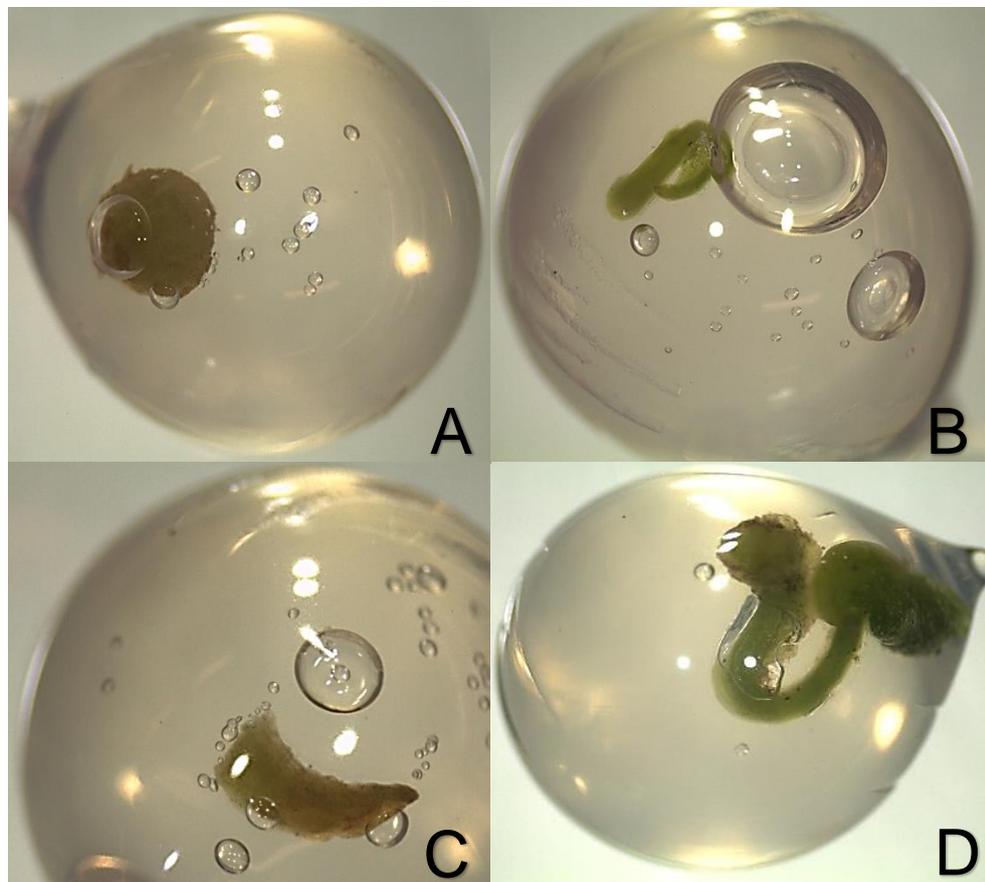


Figura 19. Embriones somáticos encapsulados en una matriz de alginato de sodio, A) embrión en estado globular, B) embrión en fase torpedo, C) Embrión encapsulado en fase torpedo. D) Embrión encapsulado con presencia de cotiledones

En las figuras anteriores podemos observar embriones en diferentes etapas encapsulados para la producción de semilla sintética, es importante destacar que dependiendo de la etapa del embrión es el comportamiento a la hora de

la germinación que se va a obtener, ya que los embriones en estado globular o corazón no van a germinar de la misma manera que los embriones que se encuentren en estado torpedo y embriones maduros.

También es importante considerar la cubierta que se le aplique al embrión encapsulado así como la concentración, ya que Lee *et al.*, en 2009 reportaron que concentraciones entre 3 y 4 % de alginato de sodio impiden la germinación temprana de la semilla sintética, demorando hasta 35 días en germinar.

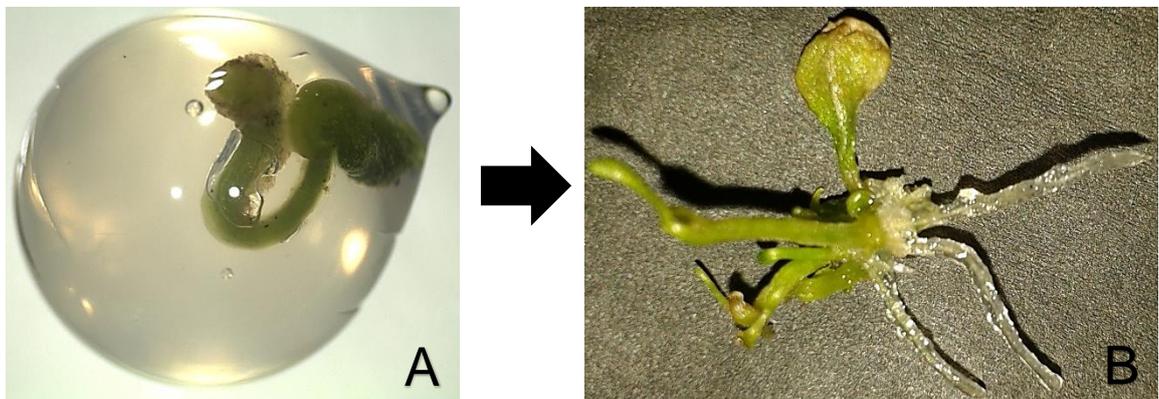


Figura 20. Embrión encapsulado y embrión desarrollado. Cultivados en medio MS. A) Embrión encapsulado B) plántula a partir de embrión somático.

En la figura anterior podemos observar la proyección que se tiene sobre la semilla sintética, una vez encapsulado el embrión se somete a condiciones de campo para posteriormente germinar y formar plantas completas como la de la imagen B que contengan raíces y hojas. Nyende *et al.*, en 2003 reportar la encapsulación de meristemas de papa y realiza una prueba de germinación donde los mejores porcentajes se obtuvieron utilizando un fungicida (carbendazim) y dos semanas de precultivo en medio MS sólido fueron los que arrojaron mejor resultado.

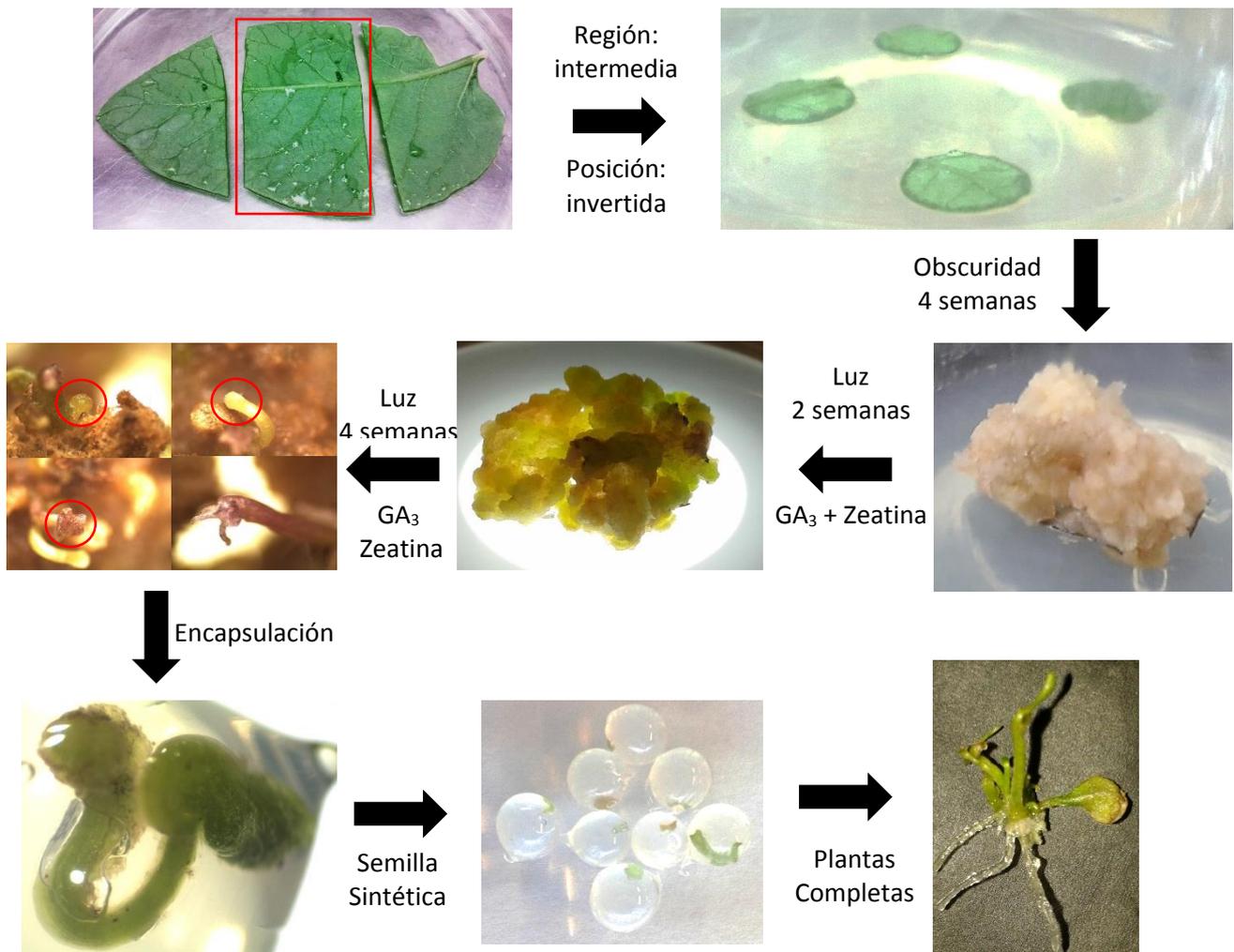


Figura 21. Esquema de la producción de embriones somáticos de papa bajo cultivo *in vitro*, partiendo de explantes de hoja.

En la figura anterior se propone un esquema general para obtener embriones somáticos de papa, se plantea que los explantes se obtengan de la región intermedia de la planta, y se tomen de la región media la hoja, eliminando la parte apical y la parte del peciolo; también se propone que se coloque en posición invertida a la hora de la siembra, este medio debe de contener 2,4-D ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como reguladores de crecimiento.

Colocar los explantes en completa oscuridad durante 4 semanas donde tomaran un color café claro y se notara un crecimiento en la periferia del explante; transferir estos explantes a un medio con ($0.5\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de GA₃ y $0.5\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zeatina) y transferir los explantes a la luz, a las 2 semanas

se puede observar una coloración verde brillante, en esta etapa es posible observar estructuras globulares, alrededor de las 6 semanas en condiciones de luz se pueden observar estructuras en diferentes etapas embriogénicas, es aquí donde se puede realizar la encapsulación de los embriones somáticos para la producción de semilla sintética y la obtención de plantas completas.

4.2. Obtención de callo a partir de discos de tubérculo

Al igual que los explantes obtenidos a partir del mesófilo de los discos de tubérculo fueron obtenidos con un horador metálico para que tuvieran el mismo tamaño. Se planteó un total de 20 repeticiones por tratamiento, y se realizó la siembra de las tres variedades en estudio FIANA (F), Alfa (A) y NAU-6 (N) la primera letra representa a la variedad de donde se tomó el explante, en el cuadro siguiente se muestra el número de explantes con respuesta en 3 tiempos diferentes, donde podemos observar que la variedad FIANA fue superior en cuanto a niveles de respuesta con respecto a ALFA y NAU-6, por otro lado el tratamiento 2 y 3 fueron los que presentaron un mayor nivel de respuesta con respecto al control o tratamiento 1 establecido por Lam en 1975. Por lo que podemos decir que los tratamientos establecidos tienen una mejor respuesta en la formación de callos que los reportados en la literatura.

Cuadro 20. Efecto de los tratamientos sobre niveles de respuesta de callos a partir de discos de tubérculo

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3
F1	6	7	9
F2	11	14	17
F3	13	18	19

A1	10	7	4
A2	0	0	0
A3	6	5	3
N1	0	1	4
N2	6	6	7
N3	4	8	6

Se presenta la respuesta obtenida de un total de 20 repeticiones de cada uno de los tratamientos planteados.

En la siguiente figura se presentan las diferentes respuestas obtenidas a partir de discos de tuberculos. Podemos observar que en las tres se forman pequeños agregados celulares en forma de callo, pero se alcanza a apreciar que están un poco más diferenciados en el tratamiento dos, debido al tipo de tejido que se logró obtener y el tipo de explante no fue posible continuar con una etapa de producción de embriones ya que no presentaron una respuesta con las concentraciones de TIF, probablemente implementando otras concentraciones de reguladores de crecimiento se puede lograr obtener embriones a partir de este tipo de explantes.



Figura 22. Tipos de respuesta en discos de tubérculo.

En la figura 21 podemos ver tres imágenes que representan a la variedad con mayor respuesta (FIANA) ordenadas por tratamiento sometido, la letra A representa al tratamiento 1, la letra B representa al tratamiento 2 y la letra C

representa' al tratamiento 3, a simple vista las respuestas pudieran parecer iguales pero los tratamiento 2 y 3 fueron los que presentaron mayor número de explantes con respuesta.

Datos reportados por Lam en 1975 indican que es posible que se presenten brotes en este tipo de explantes, así como también el cambio de color crema a verde con la presencia de la luz, resultados que pueden ser contrastados con los obtenidos en esta investigación debido a que solo se obtuvo crecimiento de células amorfas (callos) en los discos de tubérculo.

4.2.1. Contaminación

Se llegó a presentar contención en los explantes debido a que no era posible limpiarlos por completo, sin embargo no fue representativa y los explantes contaminados se tomaron como explantes sin respuesta.

4.2.2. Oxidación

De antemano se sabía que la oxidación en este tipo de explantes se haría presente por lo que se intentó contrarrestar con la presencia de antioxidantes en el medio así como también sumergir los explantes en una solución con agua estéril y antioxidantes, sin embargo no fue posible controlarla por completo.

Los explantes oxidados fueron tomados como explantes sin respuesta que representaron un alto número en algunos tratamientos, para el caso del tratamiento 2 en la variedad alfa fue un total de 20 explantes. Por otro lado la variedad FIANA fue la que presentó menor nivel de oxidación seguido a la

variedad NAU-6 y por último la variedad Alfa con mayor nivel de oxidación. Todos estos datos fueron tomados en un total de 3 semanas después de la siembra.

4.3. Cultivo de células en suspensión

Para esta evaluación se utilizó el mismo medio de cultivo utilizado para promover el crecimiento de callos solo que no se incorporó agar para evitar la gelificación del medio y poder así someter las células en suspensión. En este caso únicamente se evaluó la presencia de crecimiento debido a que por cuestiones de tiempo no se logró dar seguimiento a esta evaluación.

4.3.1. Identificación de crecimiento

Para la identificación se utilizó un microscopio con una cámara profesional incorporada, donde pudimos observar la presencia de ciertos agregados celulares que nos demuestra que efectivamente se lograron desarrollar células en suspensión a partir de explantes obtenidos de discos de tubérculo.

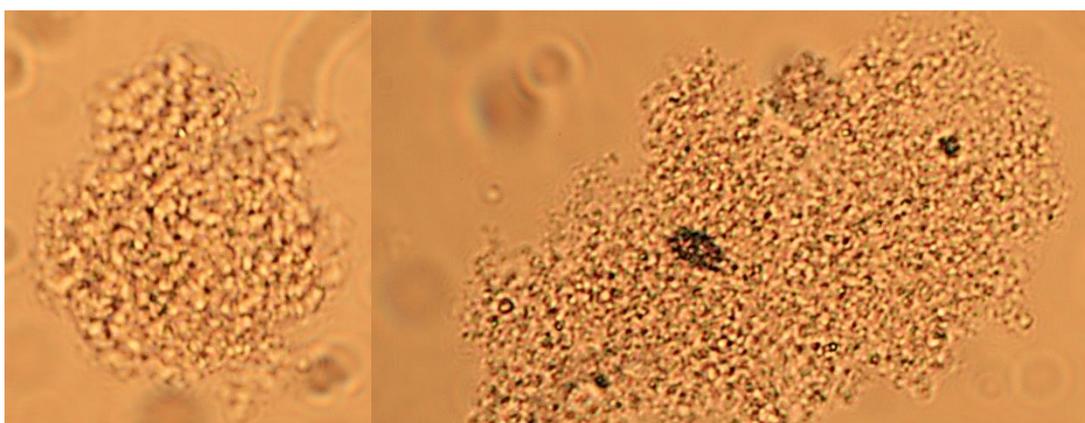


Figura 23. Identificación de células en suspensión.

En la figura 22 se puede observar la presencia de complejos celulares, donde uno presenta un mayor tamaño que corresponde a los tratamientos con concentraciones de reguladores de crecimiento más altos (3 y 4) al igual que

en la formación de callo los tratamientos más bajos no presentaron una buena respuesta.

4.4. Formación de callo a partir de brotes de tubérculo

Se logró obtener la formación de callos a partir de este tipo de explantes así como también la formación de raíces que ayudaban a los explantes a anclarse al medio de cultivo, debido a las características fisiológicas del explante se formaron gran cantidad de raíces, por otro lado también se logró identificar la presencia de callo alrededor de los explantes. Estos callos fueron trasladados posteriormente a un medio de cultivo con un tratamiento para intentar fomentar el desarrollo de embriones solo que no fue posible.

En la siguiente figura podemos observar la gran cantidad de raíces obtenidas a partir de estos explantes, lo que nos indica que se podrían llegar a formar plantas completas tomando como base los brotes de tubérculos.

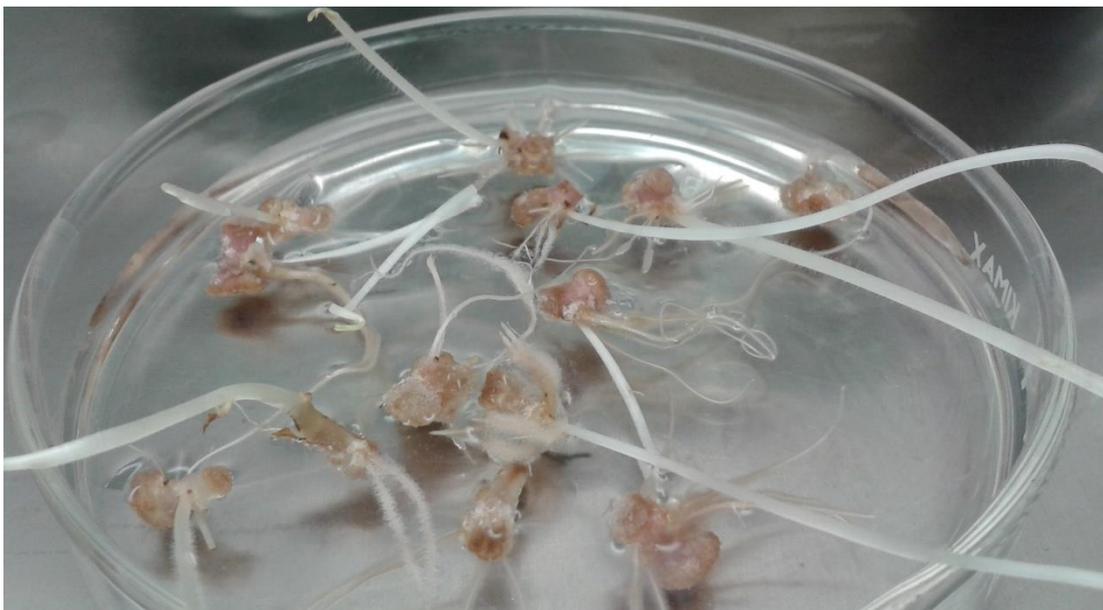


Figura 24. Respuesta de brotes de tubérculo.

Los tratamientos utilizados en esta fase del proyecto respondieron de manera adecuada con la formación de grandes masas de callos y largas raíces, lo que se buscaba en un principio era la formación de embriones sin embargo no se lograron obtener debido a que una vez que se transferían a un tratamiento para la producción de embriones los callos perdían su nivel de respuesta.

IV. CONCLUSIONES

En los métodos evaluados para la obtención de callos embriogénicos la mejor alternativa fue obtener los callos y por consiguiente embriones de explantes a partir de mesófilo de la hoja, debido a que presentaron una buena respuesta en cuanto a generación de callos y tiempo de obtención de los mismos.

Con respecto a la evaluación de los 24 métodos de siembra diferentes podemos decir que fue posible hacer más eficiente y acotar las opciones de siembra a un total de 6 métodos que presentaron el mejor comportamiento en cuanto a la ganancia de peso se refiere. También fue posible la identificación de un método único de siembra para delimitar las características que debe tener un explante de mesófilo de la hoja para generar callos de buena calidad.

Se logró identificar estructuras embrionarias en los callos, debido a que se podían observar estructuras globulares, así como también se logró observar embriones somáticos en sus diferentes etapas de desarrollo (globular, corazón, torpedo y embriones maduros), también se observó el desarrollo de un embrión maduro, la generación de raíces y la formación de tallos y hojas.

Se realizó la encapsulación de embriones, en una matriz de alginato de sodio, en diferentes etapas de desarrollo, que pudieran llegar a desarrollarse de una manera satisfactoria y formar plantas completas que puedan llegar a producción.

Se realizó una evaluación de la producción de callos por medio de discos de tubérculo y nos dimos cuenta que no es posible bajo esas condiciones obtener

estructuras embrionarias, probablemente si se utilizan otras concentraciones de reguladores de crecimiento para estimular la formación de callo a partir de este tipo de tejidos.

Se logró obtener material para el futuro estudios moleculares de genes que pudieran estar relacionados con embriogénesis somática, y que con técnicas de ingeniería genética pudieran representar un avance en la producción de embriones somáticos de calidad.

Es posible la generación de callos embriogénicos a partir de segmentos de hoja y a su vez la obtención de embriones somáticos que llegan a formar plantas completas y dichos embriones ser encapsulados para formar semilla sintética, que con el mejoramiento de la técnica pudieran llegar a tener una buena germinación y regeneración de plantas.

V. Bibliografía

Borba, N. 2008. La papa un alimento básico: posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica. Red de acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina, Uruguay.

Casto-Urrutia, I; Contreras-Méndez, A. 2011. Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de papa. Imprenta Austral, Valdivia Chile. 72 p

Comité Nacional Sistema Producto papa. 2009. Ficha técnica del sistema producto papa. Recuperado <http://www.conpapa.org.mx/Ficha.html>. Consultado en: septiembre de 2013

Daquinta, M.A; Cisneros, A; Rodriguez, Y; Escalona, M; Pérez, M.C; Luna, I; Borroto, C.G; 1992. Embriogénesis somática en piña (*Ananas comosus* L.) Merr.). Centro de Bioplasmas, Instituto Superior Agrícola de Ciego de Avila. Acta horticultuae 425. Avila, Cuba.

Doods, J.H. 1988. Tissue culture propagation of potatoes: Advantages and disadvantages. Innovative methods for propagating potatoes. Report of the XXXVIII Planning conference. Lima, Perú. pp 295-303

FAO. 2009. FAOSTAT. El mundo de la papa <http://www.fao.org/potato-2008/es/mundo/index.html>. Consultado en diciembre de 2013

FAO, 2013. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/S> consultado en enero de 2014.

Fuentes, L.A. Mesa, L.M. Ruíz, M.I. Peláez, M.F. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 Pastos y Forrajes, Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Cuba. 3(28): 199-208

George, E.F; Hall, M.A; De Klerk, G.J, 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Tercera edición. Ed: Springer. Holanda.

Gomez, G. L; Jaramillo, O.E; Jaramillo,O.S; Hoyos, R; 1998. Regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de tejido foliar en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa. Universidad Nacional de Colombia. Medellin, Colombia.17:4-6

Gómez, R. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Embriogénesis somática, Villa clara, Cuba. pp 57-77.

Hagen-Steven, R; LeTourneau, D; Muneta, P. Brown, J. 1990. Initiation and culture of potato tuber callus tissue with picloram. Food Research Center. Universidad de Idaho, Moscow. 9(4): 341-345

Hebe, Y; Rey y Luis A. Mroginski 2010. Semilla sintética. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Argenbio, INTA. pp 70-84.

Hurtado, D.V; Merino M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Primera edición. Ed: Trillas. Mexico

James, D.C; Dennis, J.G; Robert, N.T. 2004. Plant Development and Biotechnology. CRC Press. 232 p.

JayaSree, T; Pavan, U; Ramesh, M; Rao, A.V; Mohan, K.J; Sadanandam, A. 2001. Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. Plant cell, tissue and organ culture. 64: 13-17.

Jiménez, E. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Generalidades de cultivo *in vitro*, En: Pérez Ponce, JN. Villa clara, Cuba. pp 14-22

Jiménez, E; Quiala, E. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Semilla artificial, Villa clara, Cuba. pp. 225-238.

Lam-Shue, L. 1975. Shoot formation in potato tuber discs in tissue culture. American Potato Journal. 52: 103-106

Lee-Espinosa, H.E; Munguia-Gonzalez, J; Laguna-Cerda, A; García-Rosas, B; Gámez-Pastrana, M; Galindo-Tovar, M; Landero-Torres, I; Iglesias-Andreu, L; Santana-Buzzy, N. 2009. Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps spp. dawsonii* para la producción de semilla sintética. Revista Chapingo Serie Horticultura. 15(2): 33-40.

Luque-Sainz, E. 2009. Nuevas variedades de papa, Centro de validación y transferencia de tecnología de Sinaloa, Fundación produce 15 p

Montesdeoca, M.F. 2005. Guía para la producción, comercialización y uso de semilla de papa de calidad. PNTR-INIAP-Proyecto Fortipapa, 40 p

Muñoz, A. 2004. Biotecnología. Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.

Nyende-Aggrey, B; Schittenhelm, S; Mix-Wagner, G; Greef-Jorg, M. 2003. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. Revista *in vitro* cell. 39:540-544.

Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación 2006. Tesoro enterrado: la papa. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0611sp1.htm>. Consultado en septiembre de 2013

Pérez, E. 2009. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185 p.

Raemakers, C.J; Jacobsen, E; Visser, R.G.F; 1995 Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93–107

Redenbaugh, K. 1993. Synseeds: application of synthetic seeds to crop improvement. Primera ed. CRC Press, Inc. (Ed). Corportate Blvd., Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de Norteamérica. 129 p.

Rodríguez, L.E. 2009. Teoría sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). Una revisión. Revista agronomía colombiana. Colombia. 27(3): 305-312

Sánchez-Enciso, M.C; Rodríguez de la O, J.L; Zarate de Lara, G.P; López-Herrera, A; Barrales-Domínguez, S; González de la Cruz, G; 2005. “Embriogénesis somática en papa scv. atlantic y fitrolay-1867” Revista Chapingo Serie Horticultura 11(2): 219-224.

Sharma-Sanjeev, K; Millan, S. 2004. Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Revista Plant Cell* 23: 115-119

Seabrook, J. E; Douglass, L.K. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissue from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant cell report*. 20:175-182

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2011 Sistema de Información Agrícola y Pecuaria (SIAP). <http://www.siap.gob.mx/> consultado en noviembre de 2013

Theodoracopoulos, M; Arias, S; Ávila, H. 2008. Manual de Producción: Producción de papa. Entrenamiento y desarrollo agrícola, Cortes, Honduras.

Weeb, K; Street, E. 1997, Morphogenesis in vitro of *Pinus* and *Picea*. *Acta Horticultura*. 78:259–269