UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

TRABAJO DE GRADUACION
RESPUESTA DE CUATRO GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) A LA PROPAGACIÓN MASIVA *in vitro*, Y APOYO TECNICO Y SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS DE VEGETALES, DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

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

POR

WALTER ADOLFO ROLDAN MANSILLA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÒNOMO

EN

SISTEMA DE PRODUCCION AGRÌCOLA

EN EL GRADO ACADÈMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, MAYO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

RECTOR MAGNÍFICO

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL I	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL II	Ing. Agr. Msc. Marino Barrientos García
VOCAL III	Ing. Agr. MSc. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL IV	P. Forestal Axel Esaú Cuma
VOCAL V	P. Contador Carlos Alberto Monterroso González
SECRETARIO	Ing. Agr. MSc. Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, mayo de de 2011

Guatemala, mayo de 2011

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros

De conformidad con la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de graduación titulado, "**Respuesta de cuatro genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) a la propagación masiva *in vitro*, y apoyo técnico y servicios realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Vegetales, de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala "** como requisito previo a optar al titulo de Ingeniero Agrónomo en Sistema de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el presente trabajo de graduación llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Walter Adolfo Roldan Mansilla

ACTO QUE DEDICO

A

MI DIOS	Porque tú eres el creador de todas las cosas, y Digno eres tú, Dios, nuestro Dios mismo , de recibir la gloria y la honra, porque tú nos impartes la sabiduría y el poder que necesitamos par alcanzar nuestras metas.
MIS PADRES	Gabriel Roldán Lima (QEPD) y Rosalina Beatriz Mansilla de Roldán; por su amor, cariño y apoyo dado a lo largo de mi vida y que gracias a su esfuerzo alcancé ésta meta, a quienes especialmente dedico éste acto.
MIS HERMANOS	Clancy Beatriz, Karin Gabriela, Vidal Alfredo, con cariño fraternal.
MIS ABUELOS	Alfredo Roldán (QEPD), Victoria Lima (QEPD), Vidal Mansilla (QEPD), Dolores García Reyes (QEPD).
DE MAS FAMILIA	A todos en general, por el ánimo que constantemente recibí de todos ustedes, con amor sincero.
ALEJANDRA LORINI	Por el estímulo que me diste durante esta etapa final y realización de mi tesis, por los agradables momentos y la alegría que le diste a mi vida desde que la complementaste con tu amor.

AGRADECIMIENTO

A

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	La tricentenaria casa de estudios, que me dio la oportunidad de formarme como profesional, Brindándome los conocimientos y principios necesarios para desempeñarme como tal.
MIS SUPERVISORES	(QED) Ing. Agr. Domingo Amador é Ing. Agr. Hermogenes Castillo, por su orientación y comprensión durante el transcurso del EPS y aportes que Alimentaron el presente documento.
MI ASESOR	Ing. Agr. Mack Milan Cruz, por el aporte de conocimientos, consejos, apoyo y colaboración en la realización de esta investigación.
FACULTAD DE AGRONOMIA	Por la formación académica profesional que me dio y los conocimientos adquiridos, los cuales pude integrar y aplicar para la realización de este documento.
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS, FACULTAD DE AGRONOMIA	Porque ahí complemente mis conocimientos adquiridos en la facultad y logre realizar este documento, el cual se hizo con el fin de colaborar con el crecimiento y desarrollo del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetal, de la Facultad de Agronomía.

MIS AMIGOS

Lic. Walter Ovalle, Angel Hernández, Carlos García, Hugo Pineda, Luis Barahona, Carlos Sicán, Oscar Marroquín, Nelson Aurelio Diaz, Juan Carlos Cabrera, Carlos José Morán Ucelo (QEPD); Ing. Agr. Sergio Sánchez, Ing. Agr. Domingo Amador (QEPD), Kelder Ortiz, Roni Mijangos, Ing. Agr. Rodrigo Gonzales, Ing. Agr. Walfer Ramos, Ing. Agr. Acxel de Leon, Ing. Mack Milan Cruz, Ing. Agr. Jesús Sánchez y otros más que en estos momentos escapan de mi mente; Por haber estado conmigo incondicionalmente en todos los momentos difíciles y agradables, brindándome su apoyo a lo largo de todos estos años de la carrera.

INDICE GENERAL

Contenido **Página**

INDICE DE FIGURAS……viii

INDICE DE CUADROS……..vii

CAPITULO I DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, FACULTAD DE AGRONOMIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA……1

1.1 INTRODUCCION……2

1.2 MARCO REFERENTIAL……3

1.2.1Características del laboratorio……3

1.2.2 Personal……3

1.2.3 Materiales y equipo……3

1.2.4 Docencia e investigación……3

1.3 OBJETIVOS……4

General……4

Específicos……4

1.4 METODOLOGIA……..5

1.4.1 FASE DE GABINETE……...5

1.4.2 FASE DE CAMPO……5

1.4.3 FASE FINAL DE GABINETE……..5

1.5 RESULTADOS……6

1.5.1 IDENTIFICACION DE LA PROBLEMÁTICA……6

1.5.2 BASE DE DATOS NO CONOCIDA……6

1.5.3 BAJO PRESUPUESTOS……..6

1.5.4 POCA INFRAESTRUCTURA……...6

1.5.5 RELACIONESENTRE ESTUDIANTES Y LABORATORIO……..6

1.5.6 BAJADISPONIBILIDAD DE MANO DE OBRA……..6

1.5.7 SINTESIS DE DIAGNOSTICO……7

1.6 CONCLUSIONES……..10

1.7 RECOMENDACIONES……11

1.8 BIBLIOGRAFIA……..12

1.9 ANEXOS……13

CAPITULO II RESPUESTA DE CUATRO GENOTIPOS DE PAPA *(Solanum tuberosum* L.*)* A LA PROPAGACION MASIVA *IN VITRO*……16

RESUMEN……....17

2.1 INTRODUCCION.....18

2.2 MARCO CONCEPTUAL……..20

2.2.1 Descripción de la papa *(Solanum tuberosum* L.*)*……...20

2.2.2 Descripción Botánica de la papa……..20

2.2.3 Clasificación taxonómica de la papa……21

2.2.4 Zonas de producción de papa en Guatemala……21

2.2.5 Variedades cultivadas……22

2.2.5.1 Loman……22

2.2.5.2 Tollocan……22

2.2.5.3 Atlantic……...23

2.2.5.4 Icta Xalapan……..23

2.2.6 Producción y comercialización de la papa en Guatemala……...25

2.2.7 Virus asociados al cultivo de papa……..26

2.2.7.1 PLRV (Potato Leafroll virus)……..26

2.2.7.2 PLRV (Potato Virus Y)……26

2.2.8 La técnica del Cultivo de Tejidos Vegetales……..27

2.2.8.1 Etapa 0 Selección de la plantas madres……..28

2.2.8.2 Etapa 1. Establecimiento de los cultivos axénicos……28

2.2.8.3 Etapa 2 Multiplicación…….29
2.2.8.4 Etapa3 Elongación y enraizamiento…….29
2.2.8.5 Adaptación al medio externo…….29
2.2.9 Ventajas de la micropropagación……30
2.2.10 Desventajas de la micropropagación……30
2.2.11 Medios de cultivo…….31
2.2.12 Componentes minerales…….32
2.2.13 Componentes orgánicos…….33
2.2.14 Productos orgánicos estimulantes……34
2.15 Eliminación de patógenos con fines de producción de semilla de papa……35
2.15.1 Cultivos de meristemos……...35
2.15.2 Producción de papa libre de virus…….35
2.15.2.1 Descripción y realización de la técnica……..37
2.16 Reguladores de crecimientos……38
2.16.1 Auxinas……..38
2.16.1.1 Generalidades……39
2.16.1.2 Biosíntesis...……...40
2.16.1.3 Efectos fisiológicos de las auxinas…….41
2.16.1.4 Usos comerciales……..42
2.16.2 Giberelinas……42
2.16.2.1 Biosíntesis...……...43
2.16.2.2 Catabolismo.……..43
2.16.2.3 Transporte……..44
2.16.2.4 Efectos fisiológicos……44
2.16.3 Las citocinas…….46
2.16.3.1 Biosíntesis...……...46
2.16.3.2 Catabolismo.……..47

2.16.3.3 Ubicación……47
2.16.3.4 Movilización……47
2.16.3.5 Efectos fisiológicos citocininas……48
2.3 OBJETIVOS……...49
General……..49
Específicos……49
2.4 HIPOTESIS……50
2.5 METODOLOGIA……51
2.5.1 Metodología Experimental……51
2.5.2 Fase I: Propagación de las cuatro variedades para tener suficiente material….52
2.5.3 Manejo del Experimento..……52
2.5.2.1 Fase II: Establecimiento de los cultivos para la inducción de brotes…..52
2.5.3.2 Unidad experimental……53
2.5.3.3 Diseño experimental……..53
2.5.3.4 Modelo estadístico……...53
2.5.3.5 Descripción de los tratamientos……54
2.5.3.6 Croquis……..54
2.5.3.7 Variables respuesta……55
2.5.3.8 Fase III: Enraizamiento de los brotes obtenidos en la Fase II……55
2.5.3.9 Unidad Experimental……...55
2.5.3.10 Diseño Experimental……56
2.5.3.11 Modelo estadístico……56
2.5.3.12 Tratamientos……..56
2.5.3.13 Croquis……57
2.5.3.14 Variables respuesta……..57
2.6 MARCO REFERENCIAL……..57
2.6.1 Ubicación y descripción del sitio experimental……..57

2.6.2 Condiciones Climáticas……58

2.6.3 Descripción de los clones……58

2.6.3.1 Loman.....58

2.6.3.2 Tollocan……59

2.6.3.3 Atlantic……...59

2.6.3.4 IctaFrit……60

2.7 RESULTADOS Y DISCUSION……61

2.7.1 Fase II: Inducción de brotes……61

2.7.1.1 Análisis estadístico de la variedad Loman……..61

2.7.1.2 Análisis estadístico de la variedad Atlantic……..63

2.7.1.3 Análisis estadístico de la variedad Tollocan……66

2.7.1.4 Análisis estadístico de la variedad IctaFrit……..69

2.7.2 Fase III Enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase II……71

2.7.2.1 Discusión de Análisis……..71

2.7.2.2 Efecto fisiológico de las hormonas en los explantes……71

2.8 CONCLUSIONES……..73

2.9 RECOMENDACIONES……74

2.10 BIBLIOGRAFIA……75

CAPITULO III PLAN DE SERVICIOS PARA MEJORAR EL DESEMPEÑO DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES……...77

3.1 ANTECEDENTES……78

3.2 PROYECTOS……79

3.2.1 Realización del Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales……79

3.2.1.1 Definición……..79

3.2.1.2 Actividad……79

3.2.1.3 Objetivo……79

3.2.1.4 Meta……...79

3.2.1.5 Metodología……..80

3.2.1.6 Resultados……80

3.2.2 Apoyo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales sirviendo como facilitador para la realización de las diferentes practicas y mantenimiento del laboratorio……100

3.2.2.1 Actividad……100

3.2.2.2 Objetivo……100

3.2.2.3 Meta……..100

3.2.2.4 Metodología……..100

3.2.2.5 Resultados……100

INDICE DE CUADROS

Cuadro **Página**

1 Matriz de priorización de problemas relevantes del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales……8
2 Conteo de problemas del laboratorio……..9
3 Jerarquización de problemas……9
4 Área cultivada de papa en Guatemala……21
5 Rendimientos Promedios de las Principales zonas Productoras de Papa…….23
6 Porcentaje de Agricultores que han recibido Capacitación y Asistencia Técnica…….24
7 Descripción y dosis de los tratamientos de la fase II……54
8 Distribución de las unidades experimentales en el espacio……..54
9 Descripción de los tratamientos de la fase III……..56
10 Distribución de las unidades experimentales en el espacio……..57
11 Análisis de varianza para la variedad Loman……..61
12 Análisis Tukey para la variedad Loman……61
13 Análisis de varianza para la variedad Atlantic……63
14 Análisis Tukey para la variedad Atlantic……...64
15 Análisis de varianza para la variedad Tollocan……...66
16 Análisis Tukey para la variedad Tollocan……67
17 Análisis de varianza para la variedad IctaFrit……..69
18 Análisis Tukey para la variedad IctaFrit……69

INDICE DE FIGURAS

Figura **Página**

1 Materiales del Área de Incubación……13
2 Cultivos dentro del área de Incubación……13
3 Área de trabajo para la elaboración de medios……13
4 Reactivos para la elaboración de medios……13
5 Área de transferencia……14
6 Campana de siembra……14
7 Campana de siembra……14
8 Oficina……14
9 Área de lavado de cristalería……..14
10 Área de esterilización……..14
11 Cadena de producción de la papa……25
12 Estructuras químicas de las auxinas sintéticas……...39
13 Ciclo del Ácido Indolbutirico……40
14 Hipótesis del crecimiento ácido……42
15 Catabolismo de metabolitos inactivos……..43
16 Estimulación de la germinación de semillas……45
17 Estructuras químicas de citocininas……..46
18 Balance hormonal de citoquininas por la edad del tejido……..48
19 Características morfológicas de la variedad Loman……..58

20 Características morfológicas de la variedad Tollocan……59
21 Características morfológicas de la variedad Atlantic……. 59
22 Características morfológicas de la variedad IctaFrit……..60
23 Longitud de brotes inducidos de la variedad Loman……..62
24 Crecimiento del esqueje……..63
25 Crecimiento de brote y de raíz……63
26 Longitud de brotes de la variedad Atlantic……64
27 Crecimiento del brote……65
28 Planta con buen desarrollo, tanto de brote y de raíz……66
29 Longitud de brotes de la variedad Tollocan……...67
30 Desarrollo de brote sin crecimiento de raíz……...68
31 Crecimiento de brote……68
32 Longitud de brotes de la variedad IctaFrit……..70
33 Crecimiento del esqueje……70
34 Desarrollo de brote y raíz……70
35 Impartiendo el Curso de Biotecnología……101
36 Colaboración con estudiantes de la Facultad de Farmacia……..101
37 Equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales……101

CAPITULO I

DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

1.1 INTRODUCCION

Debido a la importancia que ha tenido la biotecnología cuando se presenta como una opción para mejorar la agricultura de exportación.

El laboratorio de cultivo de tejidos, fue fundado en 1988, estuvo coordinado por el Ing. Domingo Amador. Fue creado inicialmente para realizar un proyecto de investigación sobre cultivo de anteras de trigo y arroz.

Fue creado para apoyar la docencia y la investigación que se realiza en la Facultad de Agronomía. Surgió de la necesidad de investigar el mejoramiento de cereales de importancia para la dieta alimenticia. Con apoyo de la Agencia Internacional de Energía Atómica se realizaron inducciones de mutaciones con radiación isotópica para producir materiales de trigo y arroz resistentes a enfermedades. (Ing. Agr. Domingo Amador).

Pertenece al Área Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual se encuentra en el Edificio T-8, 3er. Nivel, es un laboratorio que se ha utilizado para investigaciones de los estudiantes, así como un apoyo para lo reforma educativa del estudiante, en el cual se imparten algunos laboratorios de Biotecnología, como de Cultivo de Vegetales. (Boletín No. 2-99). Dicho laboratorio cuenta con un área de 5m x 8 m.

1.2 MARCO REFERENCIAL

1.2.1 Características del Laboratorio

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se encuentra situado en el tercer nivel del edificio T-8 de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en el laboratorio se encuentra una persona encargada que es la que mira todo el control sobre el manejo del mismo, siendo esta persona Ing. Agr. Makmilan Cruz Sic.

1.2.2 Personal

Con respecto a este componente podemos decir que el laboratorio cuenta con solamente una persona, que es la que maneja y controla todos los cultivos que se tienen dentro del laboratorio.

1.2.3 Materiales Y Equipo:

Los instrumentos y equipos de trabajo con los que cuenta el laboratorio son los adecuados para la realización de las diferentes investigaciones, así como las practicas que los estudiantes realizan de los diferentes cursos.

1.2.4 Docencia e Investigación:

En el Laboratorio también se imparten prácticas de laboratorio de algunos cursos como Biotecnología y Fitogenética, también es usado para investigaciones de los mismos estudiantes, así como de instituciones externas de la universidad.

1.3 OBJETIVOS

General:

- Describir la situación actual del el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía USAC.

Específicos:

- Determinar los problemas más relevantes que afectan el desempeño del laboratorio.

- Plantear posibles soluciones que ayuden a conocer todo lo que el el laboratorio realiza y ha realizado durante estos años.

1.4 METODOLOGIA

1.4.1 FASE DE GABINETE.

Esta fase se basó en la recopilación de información primaria, tomando en cuenta a los estudiantes y profesores que ha trabajo en el laboratorio. Dicha información fue recopilada a través de entrevistas a los estudiantes y profesores, revisión de literatura relacionada con el laboratorio, consultas de trifoliares, revistas, periódicos etc.

Los aspectos principales que se tomaron en cuenta para la extracción de la información fueron: las investigaciones que se han trabajado en el laboratorio, que especies son las que mas se han utilizado en el laboratorio; así también que cursos se han impartido en el laboratorio.

1.4.2 FASE DE CAMPO.

En esta fase se llevo a cabo un reconocimiento del área, con la finalidad de observar las condiciones físicas sobre las cuales atraviesa el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, dentro de estas se observaron la infraestructura, el material, equipo y especies vegetales con las que cuenta actualmente el laboratorio

Así mismo se llevo a cabo una serie de encuestas hacia los profesores y estudiantes con el objetivo de recopilar información histórica del laboratorio. Esta encuesta contenía preguntas que eran enfocadas al seguimiento que se le ha dando al laboratorio así como al conocimiento que se tiene por parte del estudiante de la Facultad de Agronomía.

Se realizaron entrevistas hacia los profesores y estudiantes, para poder saber que uso ha tenido el laboratorio de Cultivo de Tejidos de Vegetales. Y en base a las respuestas dadas por los entrevistados poder detectar los diferentes problemas que tiene dicho laboratorio.

1.4.3 FASE FINAL DE GABINETE.

Esta fase consistió en el análisis y descripción de la información así como de los principales problemas por los que atraviesa el laboratorio; luego se llevo a cabo la integración de la información obtenida tanto de las encuestas como entrevistas y revisión de literatura; con esta información se elaboró el presente diagnostico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 IDENTIFICACION DE LA PROBLEMÁTICA.

A manera de resumen se pueden establecer los siguientes problemas observados en el laboratorio.

1.5.2 BASE DE DATOS NO CONOCIDA

Este es uno de los problemas que mas afecta al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, ya que no se cuenta con un registro de datos de todo lo que se ha hecho en el laboratorio, esto viene a dar como resultado que las diferentes investigaciones que se han realizado en el laboratorio sea desconocido por los profesores como por los estudiantes.

1.5.3 BAJO PRESUPUESTO

Este componente es el principal para el laboratorio, ya que se cuenta con un bajo presupuesto para el mantenimiento del laboratorio como para prestar servicios, lo que viene a dificultar el ser promovido, por la misma falta de recursos.

1.5.4 POCA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPO DE TRABAJO

El lugar esta demasiado reducido lo que dificulta atender una demanda mayor, así como también la impartición de practicas de laboratorios cuando es mucho el estudiantado.

También es importante mencionar que el equipo de trabajo que se tiene es muy poco lo que dificulta el trabajo de los estudiantes, ya que se tiene que hacer dos secciones para poder atender a todos los estudiantes.

1.5.5 RELACION ENTRE ESTUDIANTES Y LABORATORIO

Debido a la falta de información sobre las diferentes investigaciones realizadas en el laboratorio, es poco conocido por los estudiantes, lo que viene a dar como resultado el poco conocimiento del mismo.

1.5.6 BAJA DISPONIBILIDAD DE MANO DE OBRA

Se encontró que solamente persona elabora en el laboratorio, teniendo un horario de inicio 9 de la mañana, terminando a las 5 de la tarde de lunes a viernes. Esto también viene a afectar un poco ya que se es necesario que se cuente con más personal para que el laboratorio funcione de una mejor manera.

1.5.2 SINTESIS DEL DIAGNÓSTICO

Para poder conocer la situación actual y con la finalidad de un mejor análisis del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, se elaboró una tabla de priorización de problemas tomando en cuenta la información recopilada mediante cada unas de las fases descritas en la metodología; para luego priorizar mediante un análisis matricial los principales problemas. Con el cual se comprende de una mejor manera la problemática presentada por parte del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Cuadro 1 Matriz de priorización de problemas relevantes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

Problemas	Bajo presupuesto	Baja disponibilidad de mano de obra	Base de datos no conocida	Relaciones entre estudiantes y laboratorio	Poca infraestructura y equipo de trabajo
Bajo presupuesto		BP	BDNC	BP	BP
Baja disponibilidad de mano de obra			BDNC	BDMO	PIE
Base de datos no conocida				BDNC	BDNC
Relaciones entre estudiantes y laboratorio					PIE
Poca infraestructura y equipo de trabajo					

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos por las diferentes entrevistas y encuestas hechas hacia lo s profesores y estudiantes.

BP = Bajo presupuesto.

BDNC = Base de datos no conocida.

BDMO = Baja disponibilidad de mano de obra.

REL = Relaciones entre estudiantes y laboratorio.

PIE = Poca infraestructura y equipo de trabajo

Cuadro 2 Conteo de Problemas

Total	
Bajo presupuesto (BP)	3
Baja disponibilidad de mano de obra (BDMO)	1
Base de datos no conocida(BDNC)	4
Relaciones entre estudiantes y laboratorio (REL)	1
Poca infraestructura y equipo de trabajo(PIE)	1

Cuadro 3 Jerarquización de Problemas

Jerarquización	
Bajo presupuesto (BP)	2
Baja disponibilidad de mano de obra (BDMO)	5
Base de datos no conocida(BDNC)	1
Relaciones entre estudiantes y laboratorio (REL)	4
Poca infraestructura y equipo de trabajo(PIE)	3

Nota: La matriz de problemas se realizó utilizando la metodología de confrontación de problemas.

1.6 CONCLUSIONES

- El poco conocimiento del Laboratorio de Cultivos de Vegetales se debe a que no se le ha dado la importancia necesaria por diferentes circunstancias, entre las que podemos mencionar: cuenta con un bajo presupuesto, poca mano de obra, espacio físico no adecuado etc. Lo cual viene a originar causas que lo hacen poco conocido por el Estudiante así como también por parte del sector productivo.

- Es evidente que el principal problema que tiene el laboratorio de Cultivo de Vegetales es la falta de seguimiento para mejorar las condiciones del laboratorio con respecto a espacio, material y equipo, para lo cual la estructura administrativa del Área Tecnológica tendrá que poner mucho énfasis para darle la importancia que se merece el laboratorio.

- Según el acomodamiento existente de el Laboratorio de Cultivo Vegetales se plantea como posibles soluciones la creación de una base de datos donde se pueda dar a conocer lo que se ha hecho en el laboratorio, metodologías para la micro propagación de las especies demandadas y la contratación de personal preparado para que el laboratorio tenga un buen rendimiento en base a la demanda que se pueda tener.

1.7 RECOMENDACIONES

- Impulsar y desarrollar actividades que ayuden a que el laboratorio tenga un mayor realce y a la misma vez cree el interés por los estudiantes.

- Mejorar el presupuesto del laboratorio para que se tenga un mejor desenvolvimiento, y a la misma vez tenga buen rendimiento ya que con esto se estará ayudando al laboratorio para que pueda vender servicios que ayuden a la agricultura nacional.

- Integrar al laboratorio epesistas que ayuden a crear documentos y protocolos que muestren las diferentes investigaciones que se han desarrollado dentro del laboratorio.

1.8 BIBLIOGRAFIA

1. Amador, D. 1999. Cultivo de tejidos. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Boletín Agro-Informativo no. 2:8.

2. _____. 2006. Curso de biotecnología. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 145 p.

3. _____. 2006. Practicas de Laboratorio Cultivo de Tejidos de Vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 43 p.

4. Franco, E. 1987. Agronomía contara con Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Boletín Agro-Informativo no. 2:20.

5. _____. 1989. Donan mas equipo para el Laboratorio de Biotecnología. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Boletín Agro-Informativo no. 3:12.

6. Zúñiga, B. 1989. Reproducción del banano en laboratorio. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía, Boletín Agro-Informativo no. 3:12.

1.9 ANEXO

Figura No. 1 Materiales del Área de Incubación.

Figura No. 2 Cultivos dentro del Área de Incubación

Figura No. 3 Área de trabajo Elaboración de medios

Figura No. 4 Reactivos para la elaboración de medios

Figura No. 5 Área de Transferencia

Figura No. 6 Campana de Siembra

Figura No. 7 Campana de Siembra

Figura No. 8 Oficina

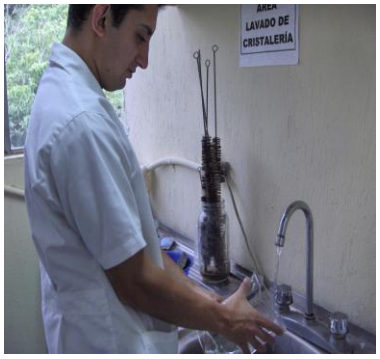


Figura No. 9 Área de Lavado Cristalería

Figura No. 10 Área de Esterilización

Encuesta sobre el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Vegetales

1. Organización del laboratorio:

2. Se cuenta con el equipo y reactivos para responder a las necesidades (Material y equipo con tecnología):

3. Personal del laboratorio: (Preparación del personal.)

4. Apoyo (financiero, equipo) de otras instituciones tanto nacionales como extranjeros:

5. Horarios de trabajo:

6. Especies vegetales que se propagan en el laboratorio:

7. Que destino tienen estas especies vegetales (para investigaciones):

8. Se han tenido proyectos para obtener recursos económicos que sirvan para el mantenimiento del laboratorio de cultivo de tejidos:

9. Se cuenta con la infraestructura específica para el desarrollo de las plantas propagas en el laboratorio de cultivo de tejidos:

10. Se han cultivado algunas especies silvestres en vía de estudio:

11. Ha habido una base de datos donde se pueda dar a conocer los diferentes trabajos realizados en el laboratorio de cultivo de tejidos:

12. Se le ha dando un buen seguimiento por parte de las autoridades de la facultad: presupuesto.

13. Hay demanda en el laboratorio: especies propagadas. Demanda del sector productivo de especies propagadas en el laboratorio. Cuáles ?. Costo ?. Mercado potencial del material propagado ?. Competidores ?.

14. El laboratorio tiene capacidad (personal, infraestructura, equipo reactivos, espacio) para satisfacer la demanda que se tiene:

15. Qué recursos se necesitan para atender las demandas de los productores?

16. Presupuesto del laboratorio:

CAPITULO II. INVESTIGACION

RESPUESTA DE CUATRO GENOTIPOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) A LA PROPAGACIÓN MASIVA *IN VITRO.*

RESPONSE OF FOUR GENOTYPES OF POTATO *(Solanum tuberosum* L.*)* FOR MASS PROPAGATION IN VITRO.

RESUMEN

La papa es un cultivo que siempre ha sido explotado en Guatemala, la mayoría de productores se concentran en el área de occidente. Actualmente en nuestro país este cultivo ha sido afectado por diferentes enfermedaes causadas por microorganismos, siendo los virus uno de los mas importantes. Estas son trasmitidas, en principio, a través de la semilla y provocan pérdidas que pueden alcanzar el 100% de la producción.

Actualmente se obtienen semilla de papa de cosechas anteriores la cual es seleccionada por el tamaño, sanidad del material, esto se realiza en el campo por el agricultor pero sin determinar técnicamente la viabilidad, la sanidad a través de análisis de laboratorio.

Para encontrar una alternativa para el control de estos microorganismos es importante la obtención de metodologías que contribuyan a disminuir estos problemas, la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales y su aplicación en esta investigación es imprescindible para obtener plantas libres de enfermedades utilizando únicamente la rama de la planta y así mismo evaluar las concentraciones de reguladores de crecimiento de Citocininas y Auxinas que van desde 0.5 hasta 3.0 mg/lit., se determino que no hay necesidad de utilizar reguladores de crecimiento para generar brotes y raíces. Si se utilizan reguladores de crecimiento se recomienda utilizar concentraciones bajas, ya que concentraciones altas inhiben el crecimiento de brotes y de raíces. Con esto se logro obtener plantas con calidad fitosanitarias y el recomendar que no hay necesidad de utilizar reguladores de crecimiento, solamente con el medio M.S. al 100% se obtienen plantas que estén libres de microorganismos.

2.1 INTRODUCCIÓN

En Guatemala, el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.*)* es un cultivo que forma parte de la actividad de los agricultores, principalmente en las áreas de occidente y algunas áreas de oriente como Jalapa. Esta hortaliza es fundamental en la dieta de los guatemaltecos, es por esto su importancia tanto para el consumo como para la agroindustria guatemalteca.

Es cultivada en áreas con temperaturas templadas, preferentemente menores de 20°C hasta 13°C, existiendo 17 microclimas que permiten cultivar papa a lo largo de todo el año. El ciclo del cultivo, oscila entre los 70 – 100 días y las principales variedades cultivadas en Guatemala son Loman, Tollocan y Atzimba. A pesar de las pocas exportaciones que se tienen, Guatemala se ha posicionado como el principal exportador centroamericano de papa fresca, manteniendo una tendencia creciente cercana al 14% anual durante los últimos 10 años (14).

El cultivo de la papa en nuestro país ha generado empleos directos en el componente de producción agrícola, como también en la transformación industrial. El hecho de que el 93.5% de la población rural y el 97.2% de la población urbana compra la papa que consumen. Varios departamentos que se han dedicado a cultivarla entre los que podemos mencionar San Marcos, Huehuetenango, Jalapa, Totonicapán, entre otros (14).

Actualmente se obtiene semilla de papa de cosechas anteriores la cual es seleccionada por el tamaño, sanidad del material, esto se realiza en el campo por el agricultor pero sin determinar técnicamente la viabilidad, la sanidad a través de análisis de laboratorio. Lo anterior provoca que la diseminación de enfermedades por la siembra de estos materiales se expanda a nuevas áreas y lo que repercute en una mala calidad del tubérculo, aumento de costos para el tratamiento de enfermedades y menores utilidades.

Por tal razón es importante la obtención de metodologías que contribuyen a disminuir estos problemas, la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales y su aplicación en esta investigación es imprescindible para obtener plantas libres de enfermedades y que estén disponibles par su uso y requerimiento.

Para un adecuado desarrollo de los brotes y raíces se utilizo el medio nutritivo Murashige y Skoog, con diferentes concentraciones de citocininas y auxinas en el medio de cultivo, observándose que las variedades Loman, Atlantic, Icta-Frit son las que mejor responden al cultivo *In Vitro*, con la variedad Tollocan, es poco recomendable utilizarla ya que se observo que tiene un crecimiento lento como lo indican los análisis estadísticos, asi mismo se pudo constatar que no es necesario la utilización de reguladores de crecimiento, solamente utilizan un medio M.S. al 100% es suficiente, y si se utilizan reguladores usarlos en concentraciones bajas, ya que concentraciones altas inhiben el crecimiento de brotes y raíces.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Descripción de la papa (*Solanum tuberosum* L.)

2.2.2 Descripción botánica

Es una planta herbácea, anual, por su manejo; perenne por su habilidad de reproducirse vegetativamente; que produce tubérculos, compuesta de la siguiente forma (9).

- Una parte aérea; el follaje: tallos, hojas e inflorescencias.

Sus tallos son llenos, con hojas muy hendidas, flores variando del blanco al violeta, según la variedad, existiendo algunas variedades que no florecen y otras que sus flores no forman semillas (2).

El fruto es una baya, semillas con un embrión curvo o recto dentro de un esperma, de sabor desagradable y probablemente venenosa, con semillas fértiles, pero que no se emplean para la propagación, excepto cuando se desea obtener nuevas variedades.

Debajo del suelo, a partir del extremo de un estolón se forman los tubérculos cargados de almidón (7).

- Una parte subterránea: estolones, tubérculos y raíces (9).

La formación de los tubérculos se inicia generalmente cuando las plantas alcanzan 25 cms de altura o de 5 a 6 semanas después de la siembra y están listos para cosecharse a los 120 días, Su reproducción se hace por medio de tubérculos utilizándose ya sea enteros o seccionados (2).

2.2.3 Clasificación Botánica de la papa

División	Tracheophyta
Subdivisión	Pinophytina (Gymnospermae)
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotiledoneas
Serie	Sin Pétalos
Subserie	Tetracíclicas
Orden	Polemoniales
Familia	Solanaceas
Género	*Solanum*
Subgénero	Leptostemonum
Sección	Tuberarium
Subsección	Hyperbasarthrum
Especie	S. *tuberosum*

2.2.4 Zonas de Producción de Papa en Guatemala

Los departamentos que por sus características climáticas y de suelo se han posicionado como las principales regiones productoras de papa son:

Cuadro 4 Área cultivada de papa en Guatemala.

Departamento	Área de Cultivo (Ha)
Huehuetenango	Mas de 1,500
San Marcos	Más de 1,500
Quetzaltenango	Entre 1,000 y 1,500
Chimaltenango	Entre 500 y 1,000
Guatemala	Entre 500 y 1,000
Las Verapaces	Menos de 500
Jalapa	Menos de 500
Sololá	Menos de 500
Totonicapán	Menos de 500

Fuente: Comité Coordinador del sector de la papa (10).

De acuerdo con la información recopilada por el ICTA, el 61% de las fincas en las cuales se cultiva papa, es utilizado para la siembra de otros cultivos como el maíz, frijol,

trigo, avena, hortalizas y habas. El tamaño promedio de las fincas es de 1.52 Hectáreas-Ha- de las cuales 0.585 Ha son utilizadas para el cultivo de la papa.
En otras palabras, la extensión actual de los cultivos de papa podría incrementarse por lo menos en un 56%, tomando en cuenta que los dueños de dichas fincas ya cuentan con el conocimiento técnico para producir papa y que dichas fincas reúnen las condiciones necesarias para el cultivo (10).

2.2.5 Variedades Cultivadas

2.2.5.1 Loman

Esta variedad se adapta bien a altitudes de 1,700 a 2,500 msnm. La planta alcanza alturas de 0.60 a 0.70 mts, con tallos erectos que al madurar toman el habito rastrero. Su follaje es verde oscuro y por lo regular no florea.

Tubérculos alargados y ligeramente aplanados, con ápices terminados en punta, de color amarillo crema en su exterior y crema interiormente. Ciclo vegetativo de 90 a 100 días. Susceptibilidad al tizón tardío y un rendimiento por manzana de 640 a 930 quintales por hectárea (1).

2.2.5.2 Tollocan

Variedad que parece ser una buena alternativa, por su resistencia a enfermedades, alto rendimiento y aceptación. Rendimientos comerciales de 570 quintales por hectárea. Plantas con una altura de 0.70 a 0.80 mts. Flores blancas, tubérculos redondos y planos, con ojos poco profundos, piel de color amarillo crema y su interior amarillo intenso. Ciclo vegetativo de 100 a 110 días (1).

2.2.5.3 Atlantic

Es una nueva variedad que se está promoviendo, para la elaboración de papalina. Introducida al país por la Empresa Productos René, S.A. y multiplicada en sus inicios por el ICTA. Es de tubérculo oblongo. Color de piel crema y pulpa blanco. Alcanza alturas de planta de 40-50 cm. (2,390 msnm). Florea a los 55-60 días después de la siembra. El color de sus flores es lila pálido. A 2,390 msnm reporta 21.4 % de sólidos totales y 15.8 % de almidón. Es susceptible a Tizón Tardío. Uno de los atributos principales de esta variedad es su calidad industrial. Excelente para papalinas y papas fritas a la francesa.Presenta una textura harinosa, seca (1).

2.2.5.4 Icta Xalapan

Variedad de porte alto (75-95 cm), follaje denso de color verde y hojas gruesas. Presenta flores de color morado. Tubérculo de forma alargado. Su hábito de crecimiento es decumbente, por lo que requiere calza alta y oportuna desde la siembra hasta antes de la floración. Su ciclo vegetativo puede variar de 100 a 140 días después de la siembra. El rendimiento varía de 25 a 40 t/ha. Se considera tolerante a Tizón Tardío así como a heladas no muy severas. Es buena para frituras caseras y papas hervidas (1).

Cuadro 5 Rendimientos Promedio de las Principales Zonas Productoras de Papa

	LOMAN	**TOLLOCAN**	**ICTA-XALAPÁN**
	(TM/Ha)	**(TM/Ha)**	**(TM/Ha)**
Huehuetenango	25	31	39
San Marcos	24	21	21
Quezaltenango	16	33	7
Sololá	22		
Chimaltenango	18	32	
Guatemala	17	21	25
Jalapa	16	17	13
Las Verapaces	28	53	

Fuente: Diagnostico del sector de la papa en Guatemala (10).

Los datos mostrados en los cuadros nos indican los rendimientos promedios que tienes las diferentes zonas de Guatemala donde se produce papa, expresadas en toneladas métricas por hectárea, los cuales nos indican y reflejan que la papa es cultivada en la mayoría del altiplano occidental, y una parte en el departamento de Jalapa (10).

Cuadro 6 Porcentaje de Agricultores que han recibido Capacitación y Asistencia Técnica

	CAPACITACION		ASISTENCIA TECNICA	
DEPARTAMENTO	SI (%)	NO (%)	SI (%)	No (%)
Huehuetenango	34	66	33	67
San Marcos	28	71	22	78
Quezaltenango	10	90	22	78
Sololá	37	63	20	80
Chimaltenango	2	98	3	97
Guatemala	-	100	-	100
Jalapa	23	77	13	87

Fuente: Diagnostico del sector de la papa en Guatemala (10).

Es interesante notar como influye la poca asistencia técnica en la tecnología utilizada y los rendimientos obtenidos. En Chimaltenango únicamente el 3% de los agricultores afirmó haber recibido asistencia técnica; sin embargo, es la región que más gasta en tecnología agrícola. Otro caso interesante es el de las Verapaces, en dónde solamente el 2% de los agricultores afirmó haber recibido asistencia técnica y es la región que presenta los mejores rendimientos en las principales variedades (10).

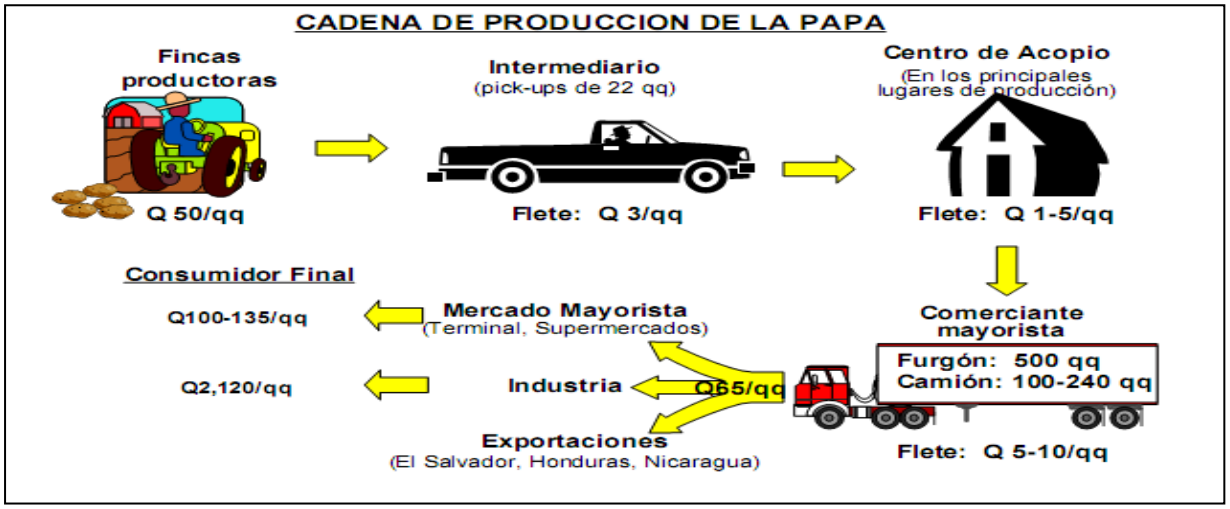
Por otra parte, existe una relación directa entre el uso de tecnología y los rendimientos obtenidos, para la variedad Loman, Las Verapaces, Huehuetenango y San Marcos son los departamentos que más invierten en abono, insecticidas y fungicidas y también los que obtienen los mejores rendimientos.

Las principales zonas productoras de papa cuentan con algunos centros de acopio privados, en donde se realiza la comercialización en grandes cantidades con los clientes tanto nacionales como internacionales y actualmente el Ministerio de Agricultura está brindando financiamiento para la construcción de otros centros de acopio adicionales (3).

2.2.6 Producción y comercialización de la papa en Guatemala

Es evidente que la globalización o apertura de mercados cambia totalmente las perspectivas del mercado. La influencia de las cadenas de alimentos rápidos y la velocidad con que la sociedad exige movilizarse, hace que exista una presión por cambiar muchas de nuestras costumbres, dentro de las cuales se encuentra nuestra alimentación.

Cada día aumenta la demanda por producto industrializado, papas fritas, chips, etc., y declina la demanda de papa fresca para lo que podemos llamar la cocina domestica. Para mantenerse en el mercado de las papas hay dos opciones, la primera es mantener y promocionar las formas tradicionales de consumo de papa local, lo cual es difícil con las nuevas generaciones, especialmente por el bombardeo masivo de los medios de comunicación. La segunda opción es cambiar todo el actual sistema de producción para entrar de lleno en la industrialización de la papa. Para esta segunda opción se cuenta con algunos obstáculos como son: la falta de variedades locales aptas para la industria, normalmente se depende de variedades producidas en países desarrollados, lo cual les da una ventaja comparativa, no solo por la inversión que significa obtener materiales, sino porque al ser producidos en sus condiciones, bajo las condiciones de esta región, los materiales no pueden desarrollar su potencial a un 100% (3).



Fuente: Diagnostico del sector de la papa en Guatemala (10). .

Figura 11. Cadena de produccion de la papa.

2.2.7 Virus Asociados al Cultivo de la papa

Se conocen aproximadamente veinticinco diferentes virus y viroides que infectan a la papa en condiciones naturales. Causan diferentes síntomas en hojas, tallos y tubérculos. Casi todas las enfermedades virales reducen el vigor de la planta, alteran el metabolismo de las células y muchas causan perdidas de rendimiento. Frecuentemente dos o mas virus pueden estar presentes en una misma planta al mismo tiempo . Las enfermedades virales rara vez causan deterioro del tubérculo en almacenamiento (9).
Los principales virus son:

2.2.7.1 PLRV (Potato Leafroll Virus)

Es el más importante porque causa pérdidas en un más de un 90% sobre el rendimiento, es transmitido por áfidos.

A. Sintomatología y difusión en el campo

En el campo la enfermedad se presenta bajo dos tipos de síntomas: el enrollamiento primario que se caracteriza porque las plantas afectadas muestran las hojas jóvenes erectas, ligeramente enrolladas, frecuentemente con coloración violácea en su base y con clorosis intervenal destacándose las venas de un verde más intenso. El enrollamiento primario se manifiesta en aquellas plantas que han contraído la enfermedad durante el mismo ciclo de cultivo. En cambio, las que muestran síntomas de enrollamiento secundario proceden de tubérculos infectados en el ciclo anterior. Estos síntomas consisten en fuerte enrollamiento de las hojas, en especial las inferiores, textura tiesa y quebradiza y clorosis intervenal del follaje y enanismo severo de toda la planta (8).

2.2.7.2 El PVY ("Potato Virus Y"):

Es el segundo virus más importante de la papa, es también transmitido por áfidos y a través de tubérculos infectados, es una enfermedad causada por el **virus** PVY ("Potato Virus Y"). De las virosis de la **papa** esta enfermedad es la segunda en importancia, las pérdidas que

causa en el rendimiento pueden alcanzar el 80% en cultivares altamente susceptibles al ataque del virus. El virus se perpetúa por **tubérculos** infectados y es transmitido por **áfidos** en forma no persistente. El PVY puede trasmitirse mecánicamente a través de la maquinaria, herramientas, y por el daño que se les hace a las plantas mientras se camina a través del cultivo. Sin embargo, los áfidos son por excelencia el medio más eficiente de transmisión.

A. Síntomas:

Los síntomas varían mucho según las variantes del virus, el **cultivar** y el medio ambiente. Son **síntomas** típicos la rugosidad, aglomeración, retorcimiento de hojas, doblez hacia abajo del margen de los folíolos, enanismo, necrosis de las nervaduras de los folíolos, manchas necróticas, necrosis de las hojas y rayado en el tallo. Los cultivares menos sensibles, o aquellos infectados con una variante menos agresiva llamada *PVYN*, reaccionan mostrando sólo mosaico suave o pueden estar infectados sin presentar síntomas.

B. Razas:

En base a los diferentes síntomas que causan en papa se han identificado varias razas de PVY. PVYO es la raza común y causa síntomas de mosaico. PVYC causa estriado puntiforme (“stipple streak”). PVYN, es la raza necrótica y en general causa síntomas leves en el follaje, sin embargo en variedades de papa susceptible causa necrosis en las hojas. Infecciones mezcladas de las razas común y la necrótica son frecuentes y los **genomas** (material genético) se pueden mezclar, produciendo razas hibridas (por ejemplo PVYN:O y PVYNTN). Las razas PVYNTN pueden causar necrosis en los tubérculos (8).

2.2.8 La técnica del Cultivo de Tejidos Vegetales

Es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos (investigación bioquímica, genética, fisiológica, molecular, estructural, etc) y aplicados en la biología vegetal (propagación conservación y manipulación *in vitro* de material vegetal). Estas se basan en el empleo de medios de cultivos semisólidos que contienen agar, macro nutrientes, micro

nutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) y sacarosa como fuente de carbono.

Dentro de este conjunto de técnicas se encuentra la denominada: micropropagación. Un término empleado para describir a la propagación asexual de plantas. Es una de las técnicas más utilizadas, debido a su enorme productividad al compararse con las técnicas tradicionales de propagación de plantas vía semillas o propagación vegetativa.

La micropropagación, de una especie, permite a partir de diversos explantes (embriones, cotiledones, hipocotilo, epicotilo, tallos, hojas), regenerar plantas completas idénticas en mayor cantidad y calidad a las obtenidas a partir de semillas. Este tipo de técnicas, son de gran utilidad para la conservación de especies vía semillas, en los que los porcentajes de germinación son bajos o cuya viabilidad es muy corta (chile habanero). Permitiendo solucionar así la disponibilidad de material vegetal.

La micropropagación de cualquier especie vegetal, consta de 5 etapas básicas:

2.2.8.1 Etapa 0. Selección de las plantas madres.

Es una etapa preparativa en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro.* Si se parte de una planta con mejores características deseables superiores al promedio, las plantas regeneradas tendrán un alto valor.

2.2.8.2 Etapa 1. Establecimiento de los cultivos axénicos.

La etapa consiste en la selección del explante y la asepsia del mismo para iniciar el cultivo. La elección del explante, depende de la especie y del sistema de proliferación en la etapa 2. Es una etapa crucial, ya que la introducción de explantes obtenidos a partir de plantas adultas, está limitado por problemas de contaminación por hongos o bacterias. Motivo por el cual se prefiere iniciar el establecimiento del cultivo a partir de semillas asépticas germinadas

in vitro, facilitándose así la obtención de los explantes asépticos (raíz, tallos u hojas). En esta etapa es muy común emplear medios de cultivo diluido y libre de reguladores de crecimiento.

2.2.8.3 Etapa 2. Multiplicación del tejido.

Esta etapa es realmente donde se realiza la micropropagación, ya que es donde se obtienen un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de los explantes. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: organogénesis (formación de órganos) y embriogenesis (formación de embriones) y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos. Para favorecer esta etapa se emplean medios de cultivos con reguladores de crecimiento: como las citocininas y auxinas.

2.2.8.4 Etapa 3. Elongación y enraizamiento.

En general, lo que se obtiene en la Etapa 2, son pequeños brotes, en la mayoría de los casos carentes de raíz y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. Esta etapa consiste en lograr que los brotes se elonguen y formen su sistema radical al mismo tiempo, para facilitar su manipulación y adaptación al medio externo. Para favorecer la elongación se emplean medios de cultivos suplementados con citocininas o libre de reguladores de crecimiento, mientras que para el enraizamiento de los brotes se emplea las auxinas.

2.2.8.5 Etapa 4. Adaptación al medio externo.

Las plantas enraizadas *in vitro* presentan varias características peculiares que dificultan, su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo. Entre estas características se encuentran: la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las plantas generadas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (cutícula poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado). Las plantas generadas no realizan una fotosíntesis normal, ya que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que la anatomía de las hojas difieren de las plantas que crecen in vivo, siendo mas delgadas y con menor contenido de clorofilas, Por lo que es necesario desarrollar en forma paulatina su autotrofía,

para adaptarlas al medio externo con éxito. Como son cultivos libres de patógenos, las plantas no han activado sus mecanismos de resistencia naturales, por lo que es recomendable trabajar en las condiciones más higiénicas posibles.

Esta etapa, es crucial, ya que de nada sirve tener un sistema de proliferación muy productivo, si el porcentaje de plantas que sobreviven en esta etapa es muy bajo, debido a la contaminación por bacterias u hongos. Esto es muy común, cuando las raíces no son adecuadamente lavadas con agua para eliminar los remanentes del medio de cultivo (agar).

2.2.9 Ventajas de la micro propagación:

- Es un sistema muy utilizado para la manipulación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes.
- El proceso se realiza en laboratorio y bajo condiciones controladas, por lo que es independiente de las condiciones externas.
- El número de plantas que se pueden obtener es ilimitado. El límite es la capacidad del laboratorio.
- El espacio requerido es mínimo y el tiempo en el que se realiza el proceso es relativamente corto.
- Las plantas obtenidas están libres de patógenos (bacterias, hongos o virus), por lo que se pueden exportar fácilmente.

2.2.10 Desventajas de la micro propagación:

- Costo inicial del laboratorio.
- Requerimiento de personal especializado.
- Costos de producción.

2.2.11 Medios de cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo *"in vitro*" de células, tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, embrioides, la organogénesis, la micropropagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Así, los medios de cultivo pueden ser líquidos o tener un soporte sólido, tienen sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, fitohormonas, etc. También pueden contener por ejemplo extractos naturales, según su finalidad y debe quedar claro que no todos llevan un complemento completo de todos los factores.

A. Soporte:

Los medios de cultivo pueden ser sólidos y líquidos. En este último caso también puede utilizarse como soporte papel de filtro o perlas de cristal.

Los medios sólidos o semisólidos según la concentración del soporte, llevarán distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en la superficie. Entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar.

El agar solidifica el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica.
El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos. Por otra parte, la composición del agar es variable y, a veces, mal definida y podría aportar oligoelementos que actúan favorablemente sobre el crecimiento.

La concentración de agar es variable debido al origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. Las concentraciones más utilizadas varían entre 6 – 10 g/L.

En 1962, Murashige y Skoog propusieron un medio para la investigación del crecimiento óptimo de callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Este medio es netamente superior a los

medios anteriormente usados para iniciar la organogénesis y particularmente, para la neoformación de yemas. (Medio MS)

A partir de estos resultados, el medio MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo “in vitro”. Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS junto con el empleo de fitohormonas apropiadas (citocininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre órgano génesis en cultivo “*in vitro*”.

El medio MS está caracterizado, principalmente, por un contenido muy fuerte de nitrógeno (60 meq/L apróx) del cual 1/3 está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada en potasio.
El intento de adaptar mas estrechamente la composición de la solución mineral de base al material utilizado y al tipo de cultivo (células aisladas, callo, androgénesis, neoformación de yemas, embriogénesis, etc.) ha llevado a la difusión de un elevado número de medios diferente. Los medios actuales se distinguen por un elevado contenido en nitrógeno, la presencia de iones NH_4^+ y la inversión de la relación Ca/K, con predominio del potasio. Sin embargo, según la especie y la naturaleza del cultivo, no se pueden determinar las concentraciones óptimas sin realizar ensayos previos, especialmente para el nitrógeno y el potasio.

2.2.12 Componentes minerales.

Los componentes minerales esenciales para la vida de las plantas se dividen en:

- **Macroelementos:** se utilizan en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio.
- **Oligoelementos o microelementos**: aunque son necesarios en menor cantidad, juegan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales microelementos son: hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cobalto y boro.

Las exigencias minerales varían con la especie, la naturaleza del tejido y su estado fisiológico, pero, demás, también varían con el método de cultivo y el tipo de organogénesis estudiado. Por ejemplo, los meristemos y , en forma general, los tejidos con actividad metabólica elevada, pueden presentar importantes necesidades en potasio.
En los medios de cultivo se aportan cantidades elevadas de elementos minerales, superiores a las necesidades efectivas de los tejidos. Los problemas que se plantean deben enfocarse en términos de potenciales osmóticos.

2.2.13 Componentes orgánicos:

Dentro de los componentes orgánicos de los medios de cultivo tenemos azúcares, vitaminas, aminoácidos, productos orgánicos estimulantes y reguladores del crecimiento.

- Azúcares:

Los tejidos y células cultivadas " in vitro" son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego, resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima del azúcar en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g/L, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética. Otros autores vinculan la necesidad de azúcares con problemas osmóticos o de un efecto indirecto sobre el metabolismo de los reguladores endógenos. Se ha demostrado que la galactosa, la lactosa y la rafinosa inhiben la síntesis de auxina en los coleóptilos de avena (*Avena sativa* L.) por mecanismos no dilucidados. Los inhibidores de la síntesis de auxina estimulan la embriogénesis a partir de masas de tejidos embriogénicos de *Citrus sinensis*, c.v. Shamouti. Igualmente, la galactosa estimula la embriogénesis en forma similar, a partir de masas de tejidos que no habían producido jamás embriones, previamente; plantean la hipótesis de una inhibición por la galactosa para la conversión del indolacetaldehido en AIA.

- Vitaminas:

Las vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivos “in vitro” y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

La tiamina (0.1 – 1.0 mg/L) tiene un efecto claro en los medios de cultivo. También se han señalados efectos favorables para el ácido nicotínico, la peridoxina y la riboflavina sobre el crecimiento de los cultivos.

El compuesto que mas frecuentemente se añade a los medios de cultivo es el meso-inositol (myo-inositol), se emplea en concentraciones entre 50 – 500 mg/L y su efecto se evidencia sobre la proliferación de tejidos y sobre la activación de la organogénesis.
El ácido ascórbico (1 – 10 mg/litro) y el ácido cítrico (50 –100 mg/L) se utilizan en ocasiones no como vitaminas sino como antioxidantes para evitar el oscurecimiento de determinados tejidos.

- Aminoácidos:

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos , aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa “*in vitro”.* Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general.

2.2.14 Productos orgánicos estimulantes

En los medios de cultivo con frecuencia se han utilizados numerosos productos o extractos naturales de composición variable y no bien definida, con distintos resultados. Entre estos productos pueden citarse:

- Extracto de levadura (0.5 – 1.0 g/L)
- Hidrolizado de caseína (0.5 – 3.0 g/L)
- Peptona
- Agua de coco (5 – 15 %)
- Albumen inmaduro de maíz
- Jugo de plátano, tomate y de naranja
- Extractos de diversos hongos
- Savia de la vid o de abedul, etc.

De ellos, el agua de coco es el más utilizado, cuya composición ha sido estudiada por diferentes autores e inicialmente por Shantz y Steward (1952). Se han detectado diversos componentes que enriquecen los medios de cultivo, entre ellos: vitaminas, aminoácidos y sus amidas, diversos azúcares y sus hexitoles, predominando el inositol y el sorbitol; y reguladores del crecimiento endógenos: auxinas y citocininas (isopenteniladenina).

2.15 Eliminación de patógenos con fines de producción de semilla de papa

Los patógenos vegetales, tales como nemátodos, hongos, bacterias, micoplasmas, virus y viroides pueden ser transmitidos de plantas enfermas y plantas sanas de papa. Sin embargo, no todas las células resultan infectadas; los tejidos meristemáticos se encuentran algunas veces libres de patógenos por lo que es posible recobrar plantas no infectados mediante técnicas de meristemos *in vitro*, y lograr su crecimiento.

La termoterapia, tratamiento de las plantas y temperaturas altas, también se aplica en la erradicación de virus. Desde hace muchos años se utiliza con éxito en la erradicación de virus de claveles, geranios, fresas y cítricos; para ella, las plantas son tratadas y temperaturas altas bajo condiciones de invernadero o cámara de crecimiento. Actualmente el método estándar para erradicar virus en muchos cultivos propagados vegetativamente es la termoterapia combinada con el cultivo de meristemos.

Experimentos llevados han demostrado que el tratamiento de plantas con temperaturas elevadas (termoterapia) lleva una reducción en la concentración del virus en la planta. Ha sido aplicada en tubérculos de papa en reposo y se ha observado una reducción en la concentración de virus, especialmente del virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), habiéndose logrado eliminación total de este virus, tan solo utilizando termoterapia.
Esta se puede aplicar en plántulas *in vitro*. Nudos (20 nudos/caja) con una yema se colocan en cajas de plástico (Magenta GA-7) que contienen medio semisólido de propagación (10). Las cajas se incuban bajo las condiciones adecuadas. Estas son selladas con cinta adhesiva cuando las plantas alcanzan aproximadamente 3 cm. de altura y presentan un buen sistema radicular, sometiéndolas luego al tratamiento de termoterapia. Al cabo de un mes, los meristemos apicales se aíslan y siembran en un medio de cultivo apropiado (13).

2.15.1 Cultivo de meristemos

Debido y que los tejidos meristematicos algunas veces se encuentran libres de patógenos, es posible recobrar plantas no infectadas mediante técnicas de cultivo de meristemos in vitro, y mantenerlos hasta obtener plantas adultas sanas. Cuando el material vegetal proviene de in vitro no es necesario esterilización (13).

2.15.2 Producción de papa libre de virus

En el caso de papa, como en todas las especies de propagación agámica, los virus tienen una particular importancia por su acumulación en los materiales de propagación y su incidencia en los rendimientos. Se citan en esta especie más de 20 virus que afectan el cultivo, pero solo 3 ó 4 son de significativa importancia en la Argentina (PVY, PLRV, PVX y PVS) (12). La única herramienta disponible actualmente para obtener plantas libres de virus de manera eficiente y confiable, es utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* (13).

2.15.2.1 Descripción y realización de la técnica

Luego de cosechados y suberificados, los tubérculos seleccionados de los cuales se desea extraer meristemos son sometidos a tratamiento para romper dormición en el caso de que sea necesario.

Luego de transcurridos 15 días en una cámara de brotación a 20 °C aproximadamente, los tubérculos desarrollan brotes de 1 cm. de longitud. En este momento se procede a cortarlos. Inmediatamente se los desinfecta sumergiéndolos unos segundos en alcohol y luego en hipoclorito de sodio al 2% durante 10 - 15 minutos. El recipiente que contiene estos brotes es introducido bajo cámara de flujo laminar ya acondicionada para trabajar. Una vez transcurrido el tiempo de desinfección los brotes son lavados por lo menos 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito y colocados en una caja de petri también estéril. De aquí se van tomando los brotes para realizar la extracción de los meristemos. El trabajo se realiza bajo el campo visual de una lupa binocular con luz puntiforme, utilizando herramientas tales como bisturíes, pinzas y micro cuchillas.

A. Extracción del meristemo

Sobre papel estéril y con ayuda de una pinza que sostiene la base del brote se procede a cortar con un bisturí las hojas y primordios exteriores, cuidando de no dañar el meristemo apical y dejándolo limpio de tejidos adyacentes.

Una vez descubierto el domo se lo extrae con 1-2 primordios foliares utilizando una micro cuchilla. Por lo general, el corte se realiza perpendicular al eje del meristemo entre 0.1 y 0.2 mm por debajo de la superficie del domo. El explante adherido a la micro cuchilla es transferido a un tubo con medio de cultivo. Es conveniente depositarlo con el ápice hacia arriba para facilitar el crecimiento armónico del tejido. Inmediatamente después se tapa el tubo con polietileno termo contráctil que permite el intercambio gaseoso con el ambiente.

B. Incubación

Los tubos sembrados se incuban en cámara de cría a 25 ± 2 °C con 70% de Humedad Relativa. La luz es suministrada con tubos fluorescentes usándose una intensidad de 2000 lux y un foto período de 16 horas.

C. Desarrollo del cultivo

En el transcurso del proceso de desarrollo se pueden realizar 3-4 repiques o subcultivos de los explantes en el mismo medio, con una frecuencia variable entre 1 y 2 semanas. Se efectúan lecturas periódicas para observar el desarrollo y descartar tubos contaminados y meristemos muertos o que al cabo de cierto tiempo no hayan experimentado ningún crecimiento. A los 75-80 días se obtienen las primeras plántulas completas. Estos explantes, que por lo general poseen 4-5 nudos, son micropropagados en un medio adecuado.

2.16 Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas actualmente se agrupan en cinco categorías: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno. Además de estas sustancias naturales (reguladores endógenos) existen numerosos productos de síntesis que pueden utilizarse como reguladores del crecimiento en el cultivo “in vitro”.

En los métodos de propagación “ *in vitro*” se emplean ampliamente las auxinas; en la organogénesis y las aplicaciones a la multiplicación vegetativa está ampliamente ligada a la utilización conjunta de auxinas y citocininas. La importancia de las giberelinas en cultivo “*in vitro*” está mucho más restringida. El ABA (ácido abscísico) y los compuestos que desprenden etileno se utilizan con menor frecuencia en casos más específicos.

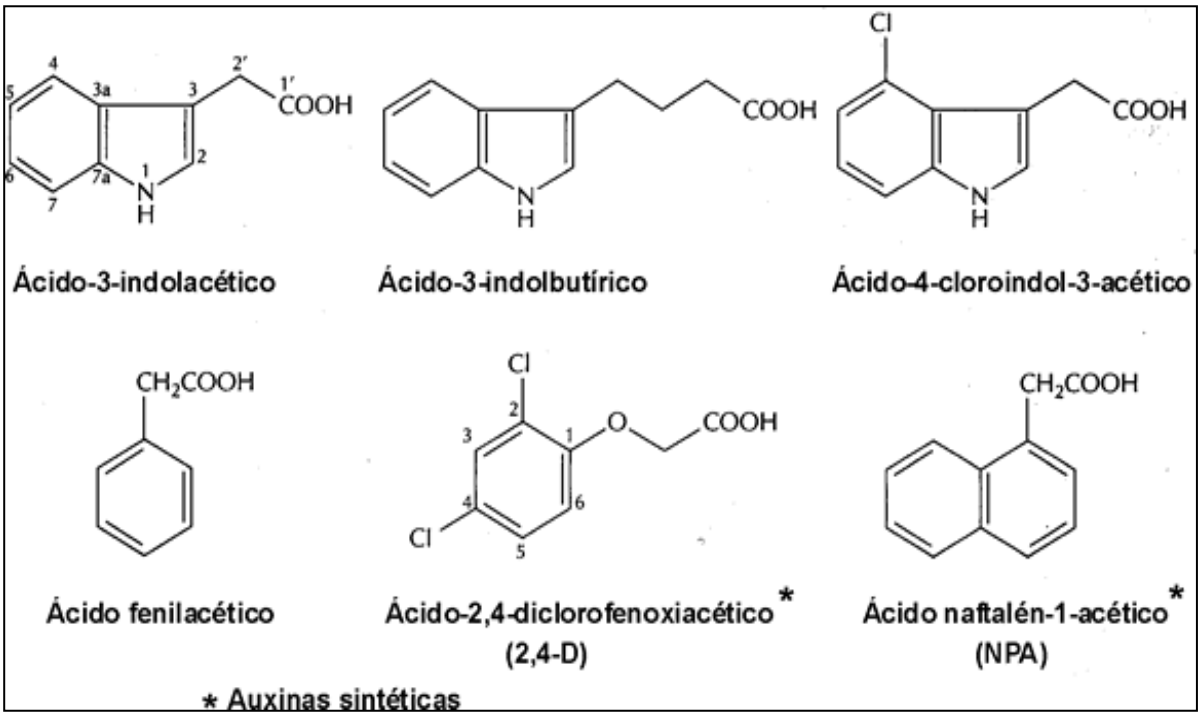
2.16.1 Auxinas

Son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano que se sintetiza por la vía Shikímica, la principal auxina es el ácido 3-indolacético

(AIA), pero también se pueden emplear el ácido 3 – indol propiónico (AIP) y el ácido 3- indol butírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles. Otros compuestos sintéticos pueden comportarse como auxinas muy débiles (ácido fenilacético) o fuertes : ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

2.16.1.1 Generalidades

La mayoría de ellas son derivados indólicos relacionados con el ácido indol acético (AIA), sin embargo existen algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica.



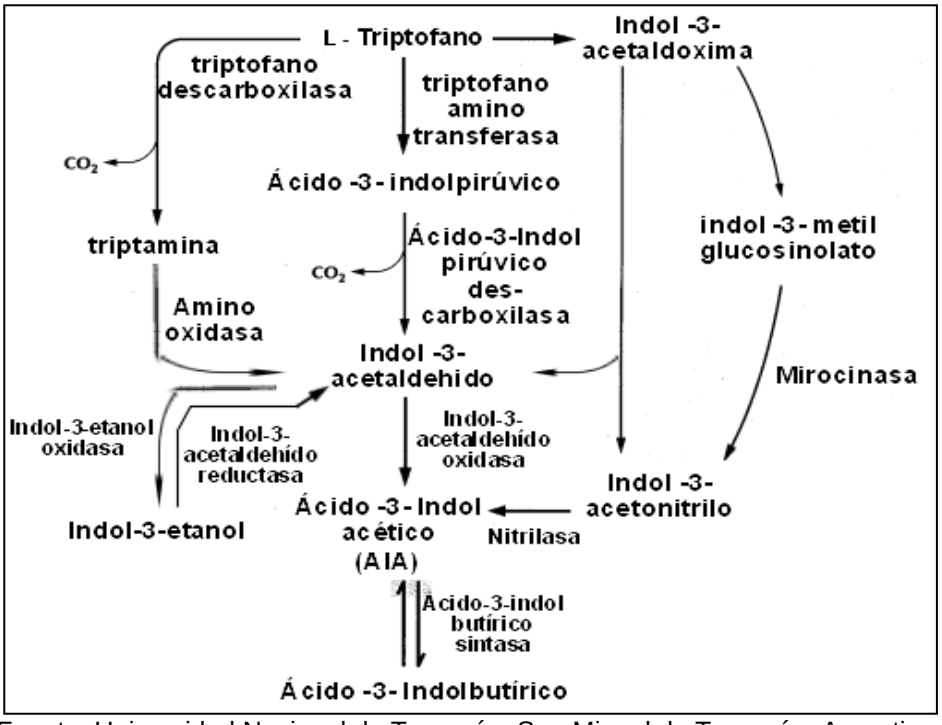
Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina (16).

Figura 12. Estructuras químicas de las auxinas sintéticas.

2.16.1.2 Biosíntesis

Se asocia con los tejidos en intensa división, especialmente en: meristemos apicales de tallos y raíces, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. También en hojas maduras y ápices de raíces, aunque en menor proporción. Sin embargo, las auxinas también fueron encontradas en otras partes de las plantas a donde son movilizadas desde su sitio de síntesis por transporte polarizado.

La principal auxina endógena es el ácido indol-3-acético (AIA). Es sintetizada en la planta a partir del L-triptofano, que puede estar libre o formando parte de proteínas. Por acción de una transaminasa se transforma en ácido indolpirúvico el cual se descarboxila por acción de una descarboxilasa formándose indol-acetaldehído. Luego actúa una oxidasa que lo transforma en ácido indol acético. Existen otras vías de síntesis que conducen al compuesto mediante la formación intermedia de triptamina, o bien mediante un intermediario nitrílico. El AIA se puede transformar en ácido indol butírico por acción de una sintasa.



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina (16).

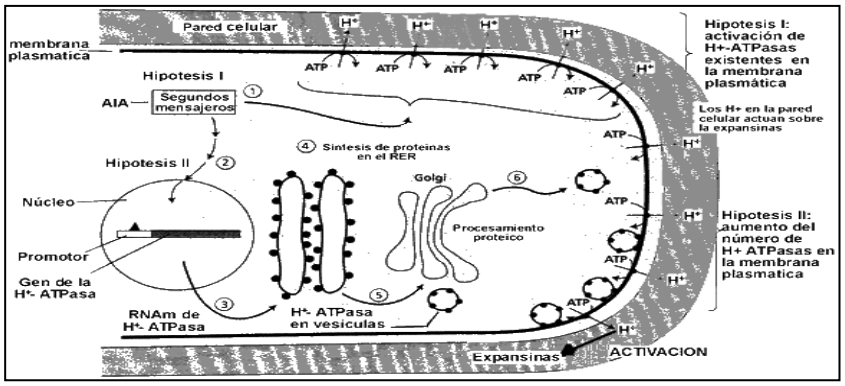
Figura 13. Ciclo del Ácido indolbutírico

2.16.1.3 Efectos fisiológicos de las auxinas

A. **Promueven el crecimiento en tallos y coleóptilos. La elongación se produce por aumento de:**
   a. **Extensibilidad de la pared:** surgió así la "*hipótesis del crecimiento ácido*"**:** que sugiere que una de las principales acciones auxínicas es la de inducir a las células a transportar protones hacia la pared celular tanto por estimulación de H^+ ATPasas existentes como por incremento en la síntesis de estas proteínas. La capacidad de los protones para provocar la pérdida de pared esta mediada por proteínas llamadas "*Expansinas*", que rompen los puentes hidrógeno entre los polisacáridos de la pared.
   b. **Captación de solutos.**
   c. **Síntesis y depósito de polisacáridos y proteínas:** necesarias para mantener la capacidad de desgaste de la pared inducida por ácidos.

B. **Promueven la formación de raíces adventicias.**
C. **Inhiben el crecimiento en raíces en concentraciones bajas.**
D. **Promueven la dominancia apical** (fenómeno por el cual las yemas apicales de muchas plantas presentan mayor crecimiento que las yemas laterales)**.** Los brotes apicales inhiben el crecimiento de los brotes laterales (axilares), se cree que las auxinas convierten al ápice del tallo en un vertedero de citocininas provenientes de la raíz, lo que explicaría la dominancia apical.
E. **Favorecen la floración.**
F. **Inducen la diferenciación vascular.**
G. **Retardan la abcicion de hojas, flores y frutos jóvenes.** La abscisión es la caída de hojas, flores y frutos en plantas vivas. Este efecto esta regulado por un balance hormonal que implica a las auxinas y al etileno, cuando el órgano vegetal (hoja, flor o fruto) es joven el balance favorece al AIA, que disminuye la sensibilidad al etileno (lo que retarda la abscisión), pero cuando el órgano vegetal envejece, disminuyen los niveles de AIA, y se incrementan la de etileno, por ello el balance hormonal termina por favorecer al etileno (que incrementa la abscisión).

H. Estimulan la formación de raíces adventicias de tallos y hojas. Por lo que comercialmente son usadas como hormonas de enraizamiento



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán (16).

Figura 14. Hipótesis del crecimiento ácido

La proteína de fijación de auxinas I (**ABA I**) sería el receptor de las auxinas. Se ubica principalmente en el lúmen del retículo endoplásmico. Su sistema de transducción involucra al AMPc y a la cascada de la MAP kinasa. La activación transcripcional de genes involucra la ubiquitinación de proteínas reguladoras del DNA (14).

2.16.1.4 Usos comerciales

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tiene una intensa actividad herbicida sobre malezas dicotiledóneas. El ácido naftalénacético se usa para el raleo de frutos y para impedir la caída prematura de frutos de manzanas y perales.

2.16.2 Giberelinas

Las giberelinas son dipertenos (con C_{20} ó C_{19}), derivados de la vía isoprenoide, con una estructura básica denominada esqueleto gibánico o giberelano; la giberelina más difundida es el AG_3 – o ácido giberélico. Se denominan con la letras AG_n y un subíndice que indica el orden de su descubrimiento, dado por las moléculas con sus radicales sustituidos (H^+, CH_3^+, OH^-, etc); en la actualidad se conocen más de 90 giberelinas diferentes, aunque en una misma planta pueden encontrarse solo algunas de ellas.

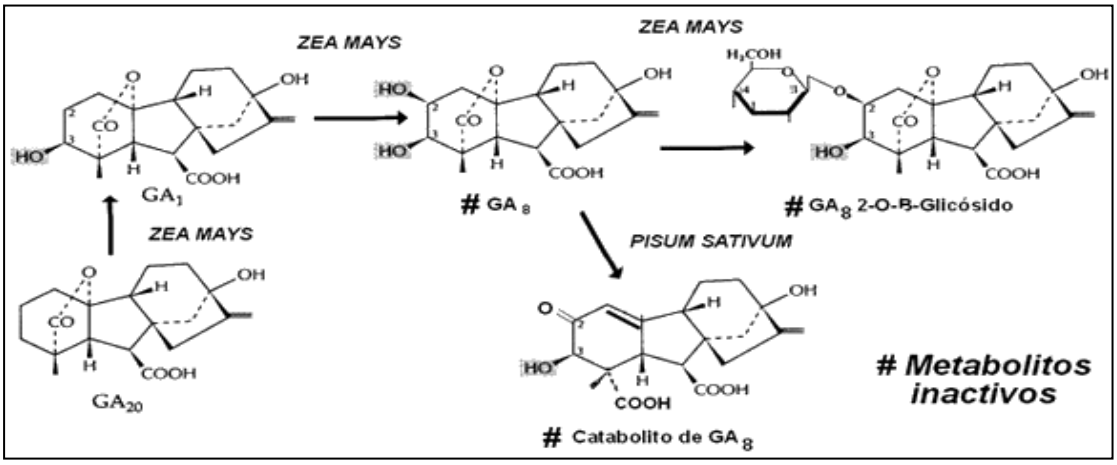
2.16.2.1 Biosíntesis

Podemos decir que los primeros pasos de síntesis son comunes al camino biosintetico de poliisoprenoides; a partir de la Acetil CoA y por la vía del acetato mevalonato se forma isopentenil PP, que representa la unidad isoprénica base de estos compuestos. Luego continuará la síntesis con formación de geranil PP, farnesil PP y geranil geranil PP (compuesto de 20 carbonos, dador de todos los carbonos de las giberelinas). Este compuesto se cíclica para formar el ent-Kaureno o (-) Kaureno. Por acción de monooxigenasas (del tipo citocromo P450) el C19 de este compuesto es oxidado a alcohol (ent-Kaurenol), aldehído (ent-Kaurenal) y ácido ent-Kaurenoico, a nivel de la membrana del retículo endoplásmico. En un paso posterior el anillo B se contrae por expulsión del C7 pasando de un anillo de 6 Carbonos a otro de 5, formando el gibano, luego por oxidación en C7 se forma el GA_{12} aldehído (15).

2.16.2.2 Catabolismo

Varía según la especie. Se encontraron inactivaciones catabólicas por:

- Hidroxilación (en Zea mays).
- Hidroxilación + glicosilación (en Zea mays).
- Hidroxilación + oxidación (hasta el catabolito GA_8 en *Pisum sativum*).
- Oxidación + ciclización con azufre



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán (16).

Figura 15. Catabolismo de metabolitos inactivos

2.16.2.3 Transporte

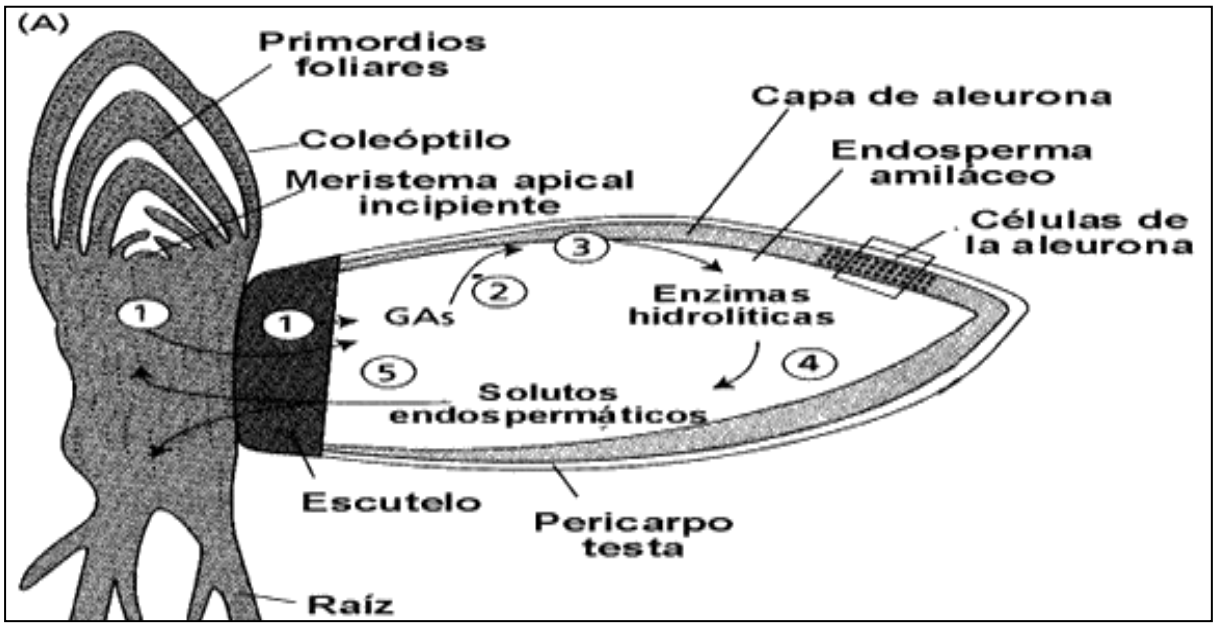
Por el floema junto con los productos de la fotosíntesis y también por el xilema probablemente por desplazamiento radial desde el floema al xilema. Generalmente se movilizan a tejidos jóvenes en crecimiento tales como puntas de tallos y raíces y hojas inmaduras. No exhiben una polaridad en el transporte como en el caso de las auxinas.

2.16.2.4 Efectos fisiológicos

Las giberelinas son esencialmente hormonas estimulantes del crecimiento al igual que las auxinas, coincidiendo con éstas en algunos de sus efectos biológicos.

A. **Estimulan la elongación de los tallos** (el efecto más notable). Debido al alargamiento de las células más que a un incremento de la división celular, es decir que incrementan la extensibilidad de la pared, este efecto lo consiguen con un mecanismo diferente al de las auxinas, pero es aditivo con el de éstas.

B. **Estimulan germinación de semillas en numerosas especies, y en cereales movilizan reservas para crecimiento inicial de la plántula.** Las semillas se encuentran encerradas en una pared celular (proveniente del fruto) llamada “pericarpo testa”. (1) Las GAs son sintetizadas por los coleóptilos y el escutelo del embrión, y liberadas al endosperma amiláceo. (2) Las GAs difunden hacia la capa de aleurona (3) las células de la aleurona son estimuladas para sintetizar y secretar α-amilasa y otras hidrolasas hacia el endosperma amiláceo. (4) El almidón y otras macromoléculas se degradan hasta pequeñas moléculas sustrato. (5) Esos solutos son captados por el escutelo y transportados hacia el embrión en crecimiento.



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán (16).

Figura 16. Estimulación de la germinación de semillas.

C. **A nivel de las células de la aleurona, en semillas de cereales estimulan la síntesis y secreción de a-amilasas, y la síntesis de otras enzimas hidrolíticas (por ejemplo β-1,3-glucanasa y ribonucleasa).** La unión de GA a su receptor membranal produce la *activación de la proteína G* de membrana, lo que deriva en: (I.) una *vía de transdución dependiente de* Ca^{+2} que involucra a la Calmodulina y a proteínas kinasas, que favorecen la exocitosis (hacia el endosperma) de vesículas cargadas de α-amilasa; (II.) una *vía de transducción independiente de* Ca^{+2}, que involucra al GMP cíclico como segundo mensajero, esto activa a un intermediario de transducción proteico, que a nivel del núcleo favorece la degradación del represor genético, que impedía la expresión del gen GA-myb; la proteína GA-myb es un factor de transcripción que favorece la expresión de genes que codifican la biosíntesis de α-amilasa (y otras enzimas hidrolíticas) que se almacenarán en vesículas para su posterior exocitosis.

D. **Inducen la partenocarpia** Proceso por el cual se forma fruto sin fertilización. Las auxinas también producen partenocarpia, pero las giberelinas son más activas.

E. Reemplaza la necesidad de horas frío (vernalización) para inducir la floración en algunas especies (hortícolas en general).

F. Inducción de floración en plantas de día largo cultivadas en época no apropiada.

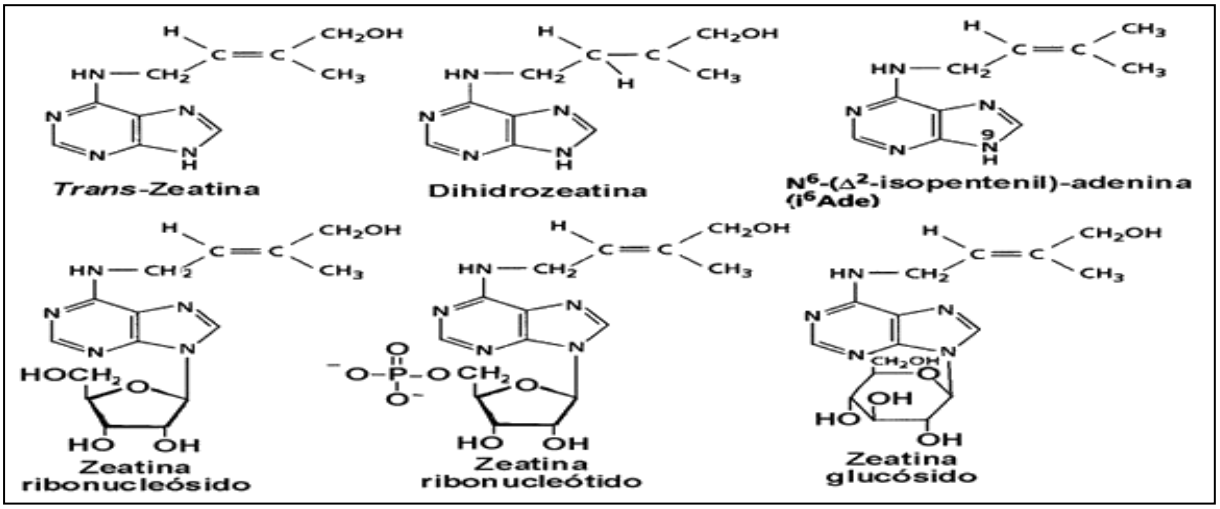
G. Detienen el envejecimiento (senescencia) en hojas y frutos de cítricos (15)

2.16.3 Las citocinas

Siendo los que se usan con mayor frecuencia en los medios de cultivo: la kinetina (KIN), la 6-bencilaminopurina (BAP), la 2-isopenteniladenina (IP) y la zeatina. El BAP se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo. Generalmente las citocininas de evitan o se emplean en dosis muy débiles en los medios de enraizamiento porque presentan un efecto inhibidor sobre la rizogénesis (12).

2.16.3.1 Biosíntesis

Tiene lugar principalmente en el citosol de las células de meristemas apicales de raíz, y también en embriones jóvenes de maíz y hojas jóvenes en desarrollo. La cadena lateral deriva de la vía del acetato-mevalonato. El isopentenil pirofosfato se transfiere al AMP (derivado de la síntesis de purinas) por acción de la Citoquinina sintasa (una prenil transferasa similar a las de la síntesis de los terpenos).



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán (16).

Figura 17. Estructuras químicas de citocininas

Las provenientes del RNAt se forman durante el procesamiento del precursor del RNAt (existe una prenil transferasa diferente a la vista en la otra vía que reconoce una secuencia específica de bases, y no emplea AMP como sustrato).

2.16.3.2 Catabolismo

Tiene lugar principalmente por:

A. **Conjugación**
   a. Conversión a ribonucleósidos o ribonucleótidos.
   b. Conversión a glicósidos: éstos constituyen la principal forma de almacenamiento de citoquininas.
B. **Conversión a Adenina:** o sus derivados por acción de la citoquinina oxidasa.

2.16.3.3 Ubicación

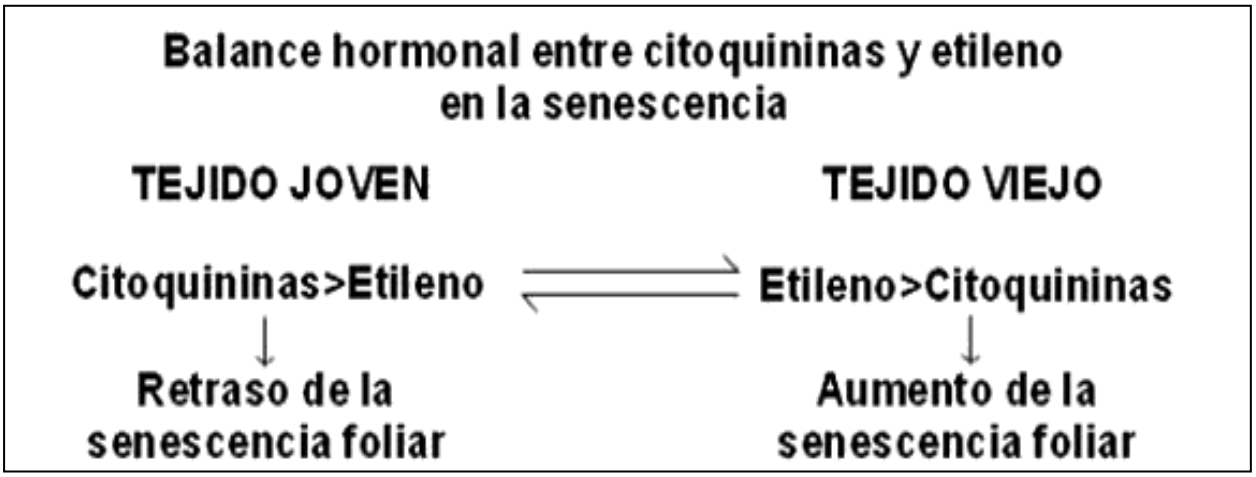
Se las encuentra en tejido vascular, sobre todo en el xilema, en puntas de raíces, en frutos en desarrollo, en tejidos tumorales infectados por *Agrobacterium tumefaciens*, en semillas en germinación, en nódulos de raíces de Leguminosas, en algas, bacterias y hongos.

2.16.3.4 Movilización

Las citocininas sintetizadas en las raíces son movilizadas (como ribonucleótidos principalmente) por el xilema hacia la hoja, donde se acumulan (en primavera y principios del verano) o bien se desglicosilan cobrando actividad. Cuando las hojas alcanzan el máximo desarrollo, las citocininas son glicosiladas y luego exportadas vía floema a otros órganos, como los frutos.

2.16.3.5 Efectos fisiológicos citocininas

- Promueven la división celular. Asociadas a las auxinas favorecen el transcurso de G_2 a M.
- Promueven la formación y crecimiento de brotes laterales (axilares). Es decir que vencen la dominancia apical.
- Promueven la movilización de nutrientes hacia las hojas.
- Promueven la germinación de las semillas y el desarrollo de brotes.
- Promueven la maduración de los cloroplastos. Participan en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y proteínas enzimáticas junto con otros factores tales como la luz o los nutrientes.
- Promueven la expansión celular en hojas y cotiledones. Al igual que las auxinas por un incremento en la extensibilidad mecánica aunque no hay bombeo de protones.
- Retrasan la senescencia de las hojas. La senescencia es un proceso genéticamente programado que afecta todos los tejidos vegetales.
- Estimulan la producción de óxido nítrico**.** Esto refuerza el efecto de retraso en la senescencia (14).



Fuente: Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán (16).

Figura 18. Balance hormonal de citoquininas por la edad del tejido.

2.3 OBJETIVOS

General

- Establecer un procedimiento para la propagación masiva *in vitro* de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.).

Específicos

- Determinar la combinación adecuada de reguladores del crecimiento para la propagación masiva de plantas de papa.

- Establecer el tratamiento más adecuado para el enraizamiento de los brotes *in vitro* obtenidos.

- Establecer las condiciones de manejo para la sobrevivencia de las plántulas en el invernadero.

2.4 HIPÓTESIS

- El cultivo de tejidos *In Vitro* de la papa *(Solanum tuberosum* L.), producirá la inducción de brotes y generación de raíces en al menos una de las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas.

- La papa (*Solanum tuberosum* L.), regenerara plántulas sanas a partir del cultivo *In Vitro* de esquejes con nudos en al menos una de las combinaciones de reguladores de crecimiento utilizadas.

2.5 METODOLOGIA

2.5.1 Metodología Experimental

- Materiales:

- Genotipos de papa: Loman, Tollocan, Atlantic, IctaFrit
- Material vegetal limpio.
- Frascos de vidrio pequeños
- Cajas Petri
- Pinzas y bisturí
- Productos químicos
- Alcohol

- Equipo:

- Campana de siembra
- Cuarto de incubación
- Medidor de pH
- Agitadores Magnéticos

El estudio estuvo conformado de cuatro fases:

Fase I →	**Fase II (1 al 16 días)** →	**Fase III (16 a 30 días)**
Propagación de los cuatro clones para tener suficiente material.	Inducción de brotes	Enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase II.

Para todas las fases (I, II, II) se utilizo el medio nutritivo Murashige y Skoog.

2.5.2 Fase I: Propagación de las cuatro variedades para tener suficiente material

En esta fase se hizo una propagación masiva de los cuatro clones, para contar con suficiente material para la realización de la investigación.

a. Se prepararon medios MS. al 100% sin ningún regulador de crecimiento para adaptar y propagar más material, utilizando tubos de ensayos de 150 mm de largo y 25 mm de diámetro.

b. Seguidamente se hicieron unos cortes de tallos que contenían entre dos y tres nudos de cada plantita, los cuales se sembraron en los medios que se elaboraron anteriormente, esto se hizo dentro de la campana de trabajo, ubicada dentro del laboratorio.

c. Pasado 4 o 5 semanas, ya se tenía suficiente material para empezar la siguiente fase II.

2.5.3 Manejo del Experimento

2.5.3.1 Fase II: Establecimiento de los cultivos para la inducción de brotes

Esta fase se hizo de inducir al tallo con yemas laterales para que formara brotes y empezara a formar raíces.

Luego de haber pasado la fase I se hicieron nuevamente cortes de tallos que tenían entre 2 a 3 nudos, los cuales fueron sembrados dentro de los tubos de ensayo, estos tubos tenían medio de cultivo Murashige y Skoog al 100% mas reguladores de crecimiento. (citocinina +auxina).

La citocinina que se utilizo fue BAP (6-Bencilaminopurina): La cual promueve la división celular y la diferenciación.

La auxina que se utilizo es ANA (Acido naftalenacetico): La cual promueve la diferenciación de yemas y brotes.

Esto se trabajo en las campanas de siembra, dentro del laboratorio en donde se hizo el corte de los tallos y se colocaron en medio de cultivo. En esta fase los tallos estuvieron por un periodo de cierto tiempo, tomando como base 15 días, las lecturas se tomaron cada 5 días.

- ✓ Genotipos: Loman, Ictafrit, Atlantic y Tollocan.
- ✓ Niveles de ácido naftalenacético (auxina): 0; 0.5; 1.0; 3.0 mg/l Para inducción de raíces.
- ✓ Niveles de bencilaminopurina (citocinina): 0; 3.0; 0.5 mg/l Para inducción de brotes.
- ✓ Número de repeticiones: 4 repeticiones y 7 tratamientos

2.5.3.2 Unidad experimental

La unidad experimental consistía en 1 esqueje con 2 a 3 nudos dentro de un tubo de ensayo de 150 mm de largo y 25 mm de diámetro, con 10 ml de medio.

2.5.3.3 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar debido a que el experimento se llevo a cabo en un laboratorio con condiciones controladas.

2.5.3.4 Modelo Estadístico

$Y_{ij} = U + Ti + Eij$

Donde:

Yij= Longitud de brotes en la ij-esima U.E.

U= Efecto de la media general en la longitud de brotes.

Ti = Efecto del i-esimo tratamiento sobre la longitud de brotes. (7trat)

Eij=Error experimental asociado a la ij-esima unidad experimental. (28 U.E)

2.5.3.5 Descripción de los Tratamientos

Cuadro 7 Descripción y dosis de los tratamientos de la fase II.

Tratamientos	Descripción/Dosis (mg/l)
T1	Testigo (0;0)
T2	3.0 citocinina; 0.5 auxina
T3	3.0 citocinina; 1.0 auxina
T4	3.0 citocinina; 3.0 auxina
T5	5.0 citocinina; 0.5 auxina
T6	5.0 citocinina; 1.0 auxina
T7	5.0 citocinina; 3.0 auxina

2.5.3.6 Croquis

Cuadro 8 Distribución de las unidades experimentales en el espacio.

T1R1	**T2R1**	**T4R1**	**T3R1**	**T5R2**	**T3R4**	**T6R4**
T4R3	T6R1	T7R1	T5R3	T2R2	T7R3	T1R3
T6R2	T3R2	T1R2	T4R2	T7R2	T2R3	T5R1
T1R4	T5R4	T4R4	T2R4	T3R3	T6R3	T7R4

2.5.3.7 Variables respuesta

- Presencia de callo: aquí se tomaron la longitud del callo, asi como longitud de raíces con una regla, para luego registrarlos, estas lecturas se hicieron cada 15 días.
- Número de brotes inducidos por explante cultivado.
- Longitud de brotes.
- Tasa de propagación: Se tomaron lecturas en el tiempo para establecer el tiempo mínimo en la propagación masiva.

Análisis de los resultados: las variables cuantitativas fueron sometidas a análisis de varianza, para conocer si hay diferencias significativas en los datos éstos fueron sometidos a una prueba de comparación de medias (Prueba de Tukey).

2.5.3.8 Fase III: Enraizamiento de los brotes obtenidos en la Fase II.

En esta fase se sembraron los brotes obtenidos de la fase II, en medio nutritivo de Murashige y Skoog, pero solamente se uso ácido naftalecético (auxina), para el crecimiento de la raíz. En esta fase los meristemos estuvieron por un periodo de cierto tiempo, tomando como base 15 días, y las lecturas se tomaron cada 5 días.

- ✓ Genotipos: Loman, Ictafrit, Atlantic y Tollocan
- ✓ Niveles de ácido naftalenacético (auxina): 0; 0.5; 1.0; 3.0 mg/l Promueven la inducción de raíces.
- ✓ Número de repeticiones: 4 repeticiones y 7 tratamientos.

2.5.3.9 Unidad experimental

En esta fase la unidad experimental consistió en 1 esqueje con 2 a 3 nudos dentro de un tubo de ensayo de 150 mm de largo y 25 mm de diámetro, con 10 ml de medio.

2.5.3.10 Diseño Experimental

El diseño utilizado en la fase III fue de Bloques al Azar porque los explantes utilizados vienen de la fase anterior en donde ya se evaluaron otros tratamientos y al ordenarlos se necesita que la distribución sea en bloques al azar.

2.5.3.11 Modelo estadístico

Yij = U + Ti + Eij

Donde:

Yij =Longitud de raíz medida en el i-esimo tratamiento y el j-esimo bloque.

U = efecto de la media general en la longitud de raíces.

Bi = Efecto del j-esimo bloque.

Tj = Efecto del i-esimo tratamiento

Eij=Error experimental asociado a la ij-esima U.E.

2.5.3.12 Tratamientos

Cuadro 9 Descripción de los tratamientos de la fase III.

Tratamientos	Descripción/Dosis (mg/lit) Aux.
T2	3.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs**. 0 aux.
	3.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs**. 0.5 aux.
	3.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs**. 1.0 aux.
	3.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs**. 3.0 aux.
T3	3.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 0 aux.
	3.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 0.5 aux.
	3.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 1.0 aux.
	3.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 3.0 aux.
T4	3.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 0 aux.
	3.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 0.5 aux.
	3.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 1.0 aux.
	3.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 3.0 aux.
T5	5.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs.** 0 aux.
	5.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs.** 0.5 aux.
	5.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs.** 1.0 aux.
	5.0 citocinina; 0.5 auxina **vrs.** 3.0 aux.
T6	5.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 0 aux.
	5.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 0.5 aux.
	5.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 1.0 aux.
	5.0 citocinina; 1.0 auxina **vrs.** 3.0 aux.
T7	5.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs. 0** aux.
	5.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs**. 0.5 aux.
	5.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 1.0 aux.
	5.0 citocinina; 3.0 auxina **vrs.** 3.0 aux.

2.5.3.13 Croquis

Cuadro 10 Distribución de las unidades experimentales en el espacio

T2(3.0 cit.;0.5 aux.) vrs (0 aux)	T5(5.0 cit.; 0.5 aux.) vrs. (0 aux)	T7 (5.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (0 aux.)	T4(3.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (0 aux.)	T3(3.0 cit.; 1.0 aux.) vrs. (0 aux.)	T6(5 cit.; 1.0 aux.) vrs. (0 aux.)	Bloque 1
T5(5.0 cit.; 0.5 aux.) vrs. (0.5 aux)	T6(5 cit.; 1.0 aux.) vrs. (0.5 aux.)	T4(3.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (0.5 aux.)	T3(3.0 cit.; 1.0 aux.) vrs. (0.5 aux.)	T2(3.0 cit.;0.5 aux.) vrs (0.5 aux)	T7 (5.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (0.5 aux.)	Bloque 2
T3(3.0 cit.; 1.0 aux.) vrs. (1.0 aux.)	T7 (5.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (1.0 aux.)	T2(3.0 cit.;0.5 aux.) vrs (1.0 aux)	T4(3.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (1.0 aux.)	T5(5.0 cit.; 0.5 aux.) vrs. (1.0 aux)	T6(5 cit.; 1.0 aux.) vrs. (1.0 aux.)	Bloque 3
T5(5.0 cit.; 0.5 aux.) vrs. (3.0 aux)	T3(3.0 cit.; 1.0 aux.) vrs. (3.0 aux.)	T6(5 cit.; 1.0 aux.) vrs. (3.0 aux.)	T7 (5.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (3.0 aux.)	T4(3.0 cit.; 3.0 aux.) vrs. (3.0 aux.)	T2(3.0 cit.;0.5 aux.) vrs (3.0 aux)	Bloque 4

2.5.3.14 Variables respuesta

- Número de raíces por brote
- Longitud de raíces por brote

Análisis de los resultados: las variables cuantitativas fueron sometidas a análisis de varianza, para conocer si hay diferencias significativas en los datos, éstos fueron sometidos a una prueba de comparación de medias (Prueba de Tukey)

2.6 MARCO REFERENCIAL

2.6.1 Ubicación y descripción del sitio experimental

La investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, el cual se encuentra en el tercer nivel, Edificio T-8 de esta facultad, ciudad capital, la cual se encuentra a una altura 1,300 msnm.

2.6.2 Condiciones Climáticas

La temperatura media anual esta entre los 14° y 24°C, la precipitación es de 1000 a 2,000 mm anuales, la evapotranspiración es de 800 a 1,000mm. Los días de lluvia van de 90 a 120 al año.

En el laboratorio, específicamente en el cuarto de incubación, se cuenta con aire acondicionado, que regula temperatura, así como con un sistema automático de luminosidad, que hace que las plantas tengan sus horas de luz y sus horas de oscuridad.
Dándoles así las condiciones artificiales para el crecimiento y desarrollo de las mismas.

2.6.3 Descripción de los clones

2.6.3.1 Loman:

Fuente. Manual del cultivo de la papa en Guatemala (14).

Figura 19. Características morfológicas de la variedad Loman

Esta variedad se adapta bien a altitudes de 1,700 a 2,500 msnm. La planta alcanza alturas de 0.60 a 0.70 mts, con tallos erectos que al madurar toman el hábito rastrero. Su follaje es verde oscuro y por lo regular no florea.

Tubérculos alargados y ligeramente aplanados, con ápices terminados en punta, de color amarillo crema en su exterior y crema interiormente. Ciclo vegetativo de 90 a 100 días. Susceptibilidad al tizón tardío y un rendimiento por manzana de 640 a 930 quintales por hectárea (1).

2.6.3.2 Tollocan:

Fuente. Manual del cultivo de la papa en Guatemala (14).

Figura 20. Características morfológicas de la variedad Tollocan.

Variedad que parece ser una buena alternativa, por su resistencia a enfermedades, alto rendimiento y aceptación. Rendimientos comerciales de 570 quintales por hectárea. Plantas con una altura de 0.70 a 0.80 mts. Flores blancas, tubérculos redondos y planos, con ojos poco profundos, piel de color amarillo crema y su interior amarillo intenso. Ciclo vegetativo de 100 a 110 días (1).

2.6.3.3 Atlantic:

Fuente. Manual del cultivo de la papa en Guatemala (14).

Figura 21. Características morfológicas de la variedad Atlantic.

Es una nueva variedad que se está promoviendo, para la elaboración de papalina. Presenta follaje abundante de color verde oscuro. Plantas que alcanzan los 80-90 cm. Florea entre los 70-75 días después de la siembra (2,390 msnm) y 130 días después de la siembra a 3,500 msnm. Sus flores son de color rozado. La piel y la pulpa es de color blanco. Florea a los 55-60 días después de la siembra. El color de sus flores es lila pálido. A 2,390 msnm reporta

21.4 % de sólidos totales y 15.8 % de almidón. Es susceptible a Tizón Tardío. Uno de los atributos principales de esta variedad es su calidad industrial. Es excelente para cocinar papas horneadas, papalinas y papas fritas a la francesa. Presenta una textura harinosa, seca (1).

2.6.3.4 IctaFrit

Fuente. Manual del cultivo de la papa en Guatemala (14).

Figura 22. Características morfológicas de la variedad IctaFrit

Plantas que alcanzan los 80-90 cm. Florea entre los 70-75 días después de la siembra (2,390 msnm) y 130 días después de la siembra a 3,500 msnm. Sus flores son de color rozado. La piel y la pulpa es de color blanco. Presenta follaje abundante de color verde oscuro. Plantas que alcanzan los 80-90 cm. Florea entre los 70-75 días después de la siembra (2,390 msnm) y 130 días después de la siembra a 3,500 msnm. Sus flores son de color rozado. La piel y la pulpa son de color blanco (1).

2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.7.1 Fase II: Inducción de brotes

2.7.1.1 Análisis estadístico de la variedad Loman

Cuadro 11 Análisis de varianza para la variedad Loman.

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Longitud de brotes (	28	0.29	0.08	72.27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10.83	6	1.81	1.40	0.2610
tratamiento	10.83	6	1.81	1.40	0.2610
Error	27.09	21	1.29		
Total	37.92	27			

En el cuadro 8 se presenta el análisis de varianza (ANDEVA) elaborado en el software estadístico infostat (2008), y como se puede observar el valor de la probabilidad nos indica que no hay diferencia significativa en la utilización de los tratamientos para ésta variedad.

Cuadro 12 Análisis Tukey para la variedad Loman.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.61319

Error: 1.2898 gl: 21

tratamiento	Medias	n	
T7	2.93	4	A
T6	1.73	4	A
T3	1.63	4	A
T1	1.48	4	A
T5	1.33	4	A
T2	1.10	4	A
T4	0.83	4	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

También se realizó un análisis de prueba de medias utilizando el método Tukey, en el cual todos los tratamientos se presentan en el grupo A. Entendiéndose entonces que no hay variación en los resultados al utilizar cualquiera de los tratamientos descritos en el cuadro 6.

Aunque entre los siete tratamientos no se detectó estadísticamente una diferencia significativa se puede observar en el cuadro 9 que la media mas alta fue del tratamiento 7 con 2.93 cm. Esto nos permite la toma de decisión para la utilización de un tratamiento efectivo para la propagación de plantas de papa *in vitro*.

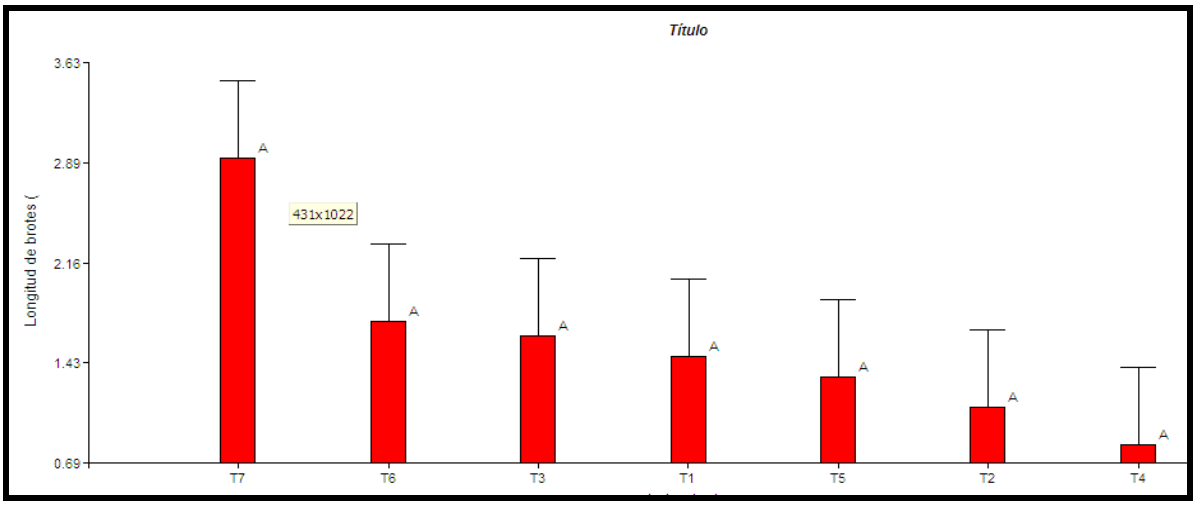


Figura 23 Longitud de brotes inducidos de la variedad Loman.

En esta variedad se observó que los brotes que eran producidos por los esquejes de papa lograban una longitud máxima de 4.5cm, esto para la última fecha de lectura que fue el 1 de marzo de 2009.

El promedio de longitud alcanzado de todos los tratamientos para esta variedad fue de 1.57 cm. Sin embargo la mayor longitud alcanzada para este clon fue la del tratamiento 7 con 4.5cm de longitud de brotes que corresponde a 5.0 mg/lt de citocinina con 3.0 mg/lt de auxina, y un promedio de 2.93 cm, ya que favoreció a una mayor producción de longitud de brote, notándose se así que a esta concentración de citocinina y auxina, se tiene una respuesta favorable en la inducción de brotes. La menor longitud fue la que presento el

tratamiento 4 que corresponde a 3.0 mg/lt de citocinina y 3.0 mg/lt de auxina con 0.83 cm. Esto se debe a que la dosis de hormona vegetal citocinina que se aplico fue menor, observándose así que entre menor sea la dosis de hormona de crecimiento, menor será el crecimiento del brote.

Figura 24 Crecimiento del esqueje.

Figura 25 Crecimiento de brote y de raíz.

2.7.1.2 Análisis estadístico de la variedad Atlantic

Cuadro 13 Análisis de varianza para la variedad Atlantic.

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Longitud de brotes (	28	0.87	0.84	45.99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	65.65	6	10.94	23.78	<0.0001
tratamiento	65.65	6	10.94	23.78	<0.0001
Error	9.66	21	0.46		
Total	75.31	27			

En ésta variedad si hubo diferencia significativa en los tratamientos evaluados según los análisis estadísticos y el mejor de los tratamientos fue el testigo ubicándose en el grupo A del análisis tukey, con una media de 4.88, seguido del tratamiento 3 con un promedio de 2 cm de largo en los brotes.

Cuadro 14 Análisis Tukey para la variedad Atlantic.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.56082
Error: 0.4601 gl: 21

tratamiento	Medias	n				
T1	4.88	4	A			
T3	2.00	4		B		
T2	1.63	4		B	C	
T7	0.83	4		B	C	D
T4	0.70	4		B	C	D
T5	0.25	4			C	D
T6	0.05	4				D

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

La variedd Atlantic si presenta una diferencia en los resultados al utilizar los tratamientos. Según la informacion proporcionada en el cuadro 11 el tratamiento recomendado es el de no utilizar reguladores de crecimiento para la induccion de brotes y raices. El Analisis Tukey forma 4 grupos en los que estadisticamente se puede recomendar el del grupo A, correspondiente al tratamiento testigo.

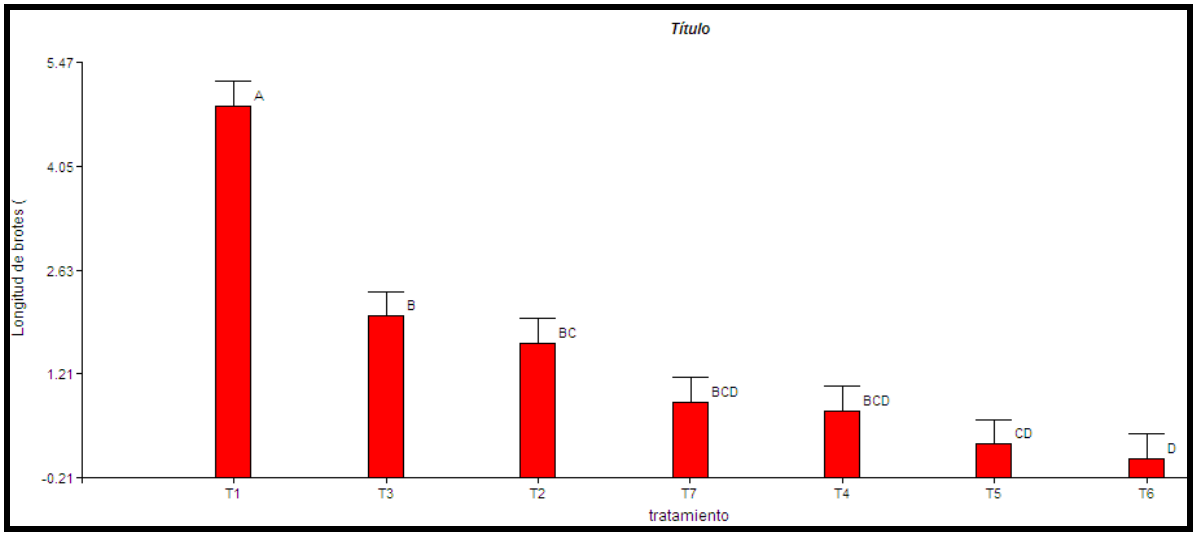


Figura 26 Longitud de brotes de la variedad Atlantic.

En esta variedad se observó que los brotes que eran producidos por los esquejes de papa lograban una longitud máxima de 5.5 cm, siendo estos correspondientes al testigo, esto para la última fecha de lectura que fue el 1 de marzo de 2009.

El promedio de longitud alcanzado de todos los tratamientos para esta variedad fue de 1.11 cm. Sin embargo la mayor longitud alcanzada para este clon fue la del tratamiento 1 con 5.5 cm de longitud de brotes que corresponde al testigo y un promedio de 4.87 cm, ya que favoreció a una mayor producción de longitud de brote, notándose se así que a esta concentración de citocinina y auxina, se tiene una respuesta favorable en la inducción de brotes, pero aun así este clon no tiene un resultado satisfactorio en la aplicación de la hormona. Este tratamiento es el que se utilizó como testigo. Lo que nos indica que para este clon de papa, no es necesario la aplicación de ningún regulador de crecimiento, simplemente con el medio M.S 100% (Medio Murashige y Skoog), para la inducción de brotes. Aun asi podemos mencionar que la menor longitud fue la que presento el tratamiento 6 que corresponde a 5.0 mg/lt de citocinina y 1.0 mg/lt de auxina con 0.05 cm.

En esta variedad se observó que a la larga es de gran beneficio el que no se utilice ninguna dosis de reguladores de crecimiento par la inducción de brotes, esto ayudará a que se tenga un menor costo en la producción de plántulas *In Vitro* de papa.

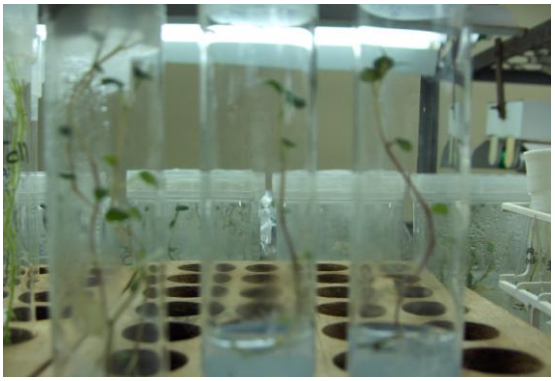


Figura 27 Crecimiento del brote.

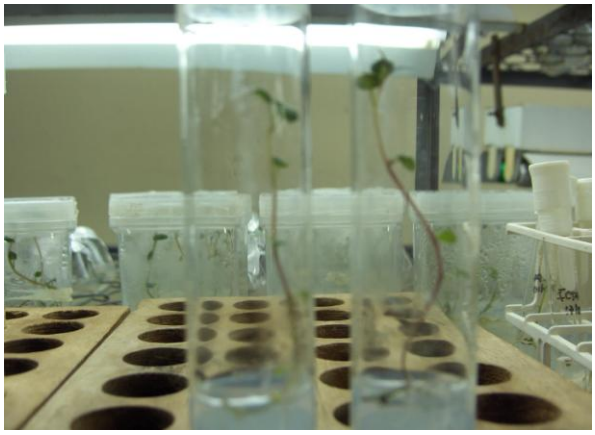


Figura 28 Planta en con buen desarrollo, tanto de brote y de raíz.

2.7.1.3 Análisis estadístico de la variedad Tollocan

Cuadro 15 Análisis de varianza para la variedad Tollocan.

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
longitud de brotes (	28	0.79	0.73	83.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	68.47	6	11.41	13.13	<0.0001
tratamiento	68.47	6	11.41	13.13	<0.0001
Error	18.25	21	0.87		
Total	86.72	27			

Los análisis estadísticos indican que al aplicar los tratamientos para la inducción de brotes en la esta variedad se encontraron diferencias significativas, destacando como el mejor, el tratamiento testigo sobre todos los demás tratamientos. Con esto determinamos que la utilización de las hormonas no ayudaron a los esquejes a producir brotes con longitudes adecuadas puesto que a todos los tratamientos a los que se les aplicó hormonas tuvieron un crecimiento y desarrollo deficiente, según se muestra en los cuadros 12 y 13. El tratamiento testigo alcanzó una media de 4.88 cm de longitud en los brotes y los demás se encontraban por debajo de 0.85 cm.

Cuadro 16 Análisis Tukey para la variedad Tollocan.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.14491
Error: 0.8689 gl: 21

tratamiento	Medias	n		
T1	4.88	4	A	
T2	0.85	4		B
T7	0.83	4		B
T5	0.73	4		B
T3	0.38	4		B
T6	0.18	4		B
T4	0.00	4		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

El análisis tukey que se muestra en el cuadro 13 forma solo dos grupos en los que la diferencia de medias es muy marcada donde el tratamiento testigo tiene 4.03 cm mas de longitud en los brotes que los tratamientos en los que se utilizó los reguladores de crecimiento.

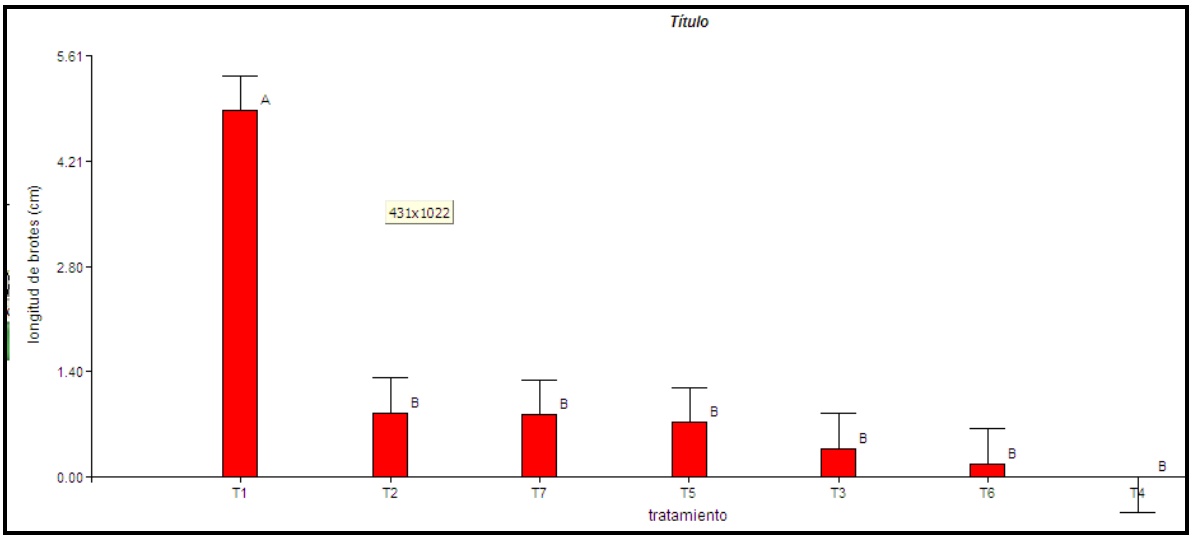


Figura 29 Longitud de brotes de la variedad Tollocan.

En esta variedad se observó que los brotes que eran producidos por los esquejes de papa lograban una longitud máxima de 6 cm. esto para la última fecha de lectura que fue el 1 de marzo de 2009.

El promedio de longitud alcanzado de todos los tratamientos para esta variedad fue de 1.11 cm. Sin embargo la mayor longitud alcanzada para este clon fue la del tratamiento 1 con 6 cm de longitud de brotes que corresponde al testigo 0 mg/lt de citocinina con 0 mg/lt de auxina, y un promedio de 4.87 cm, ya que favoreció a una mayor producción de longitud de brote, notándose se así, que también para esta variedad no hay necesidad de utilizar ningún regulador de crecimiento y que es suficiente con que se utilice un Medio M.S al 100% (Medio Murashige y Skoog) para esta etapa de inducción de brotes teniéndose así, una respuesta favorable en la inducción de brotes. Y el tratamiento que no presento ninguna respuesta en lo que se refiere a la inducción de brotes fue el No. 4, esto puede haber sido causado a que los esquejes que se utilizaron, estaban un poco tiernos.

Lo que nos viene a decir que también para esta variedad no hay necesidad de utilizar reguladores de crecimiento para la generación de brotes, en esta fase.

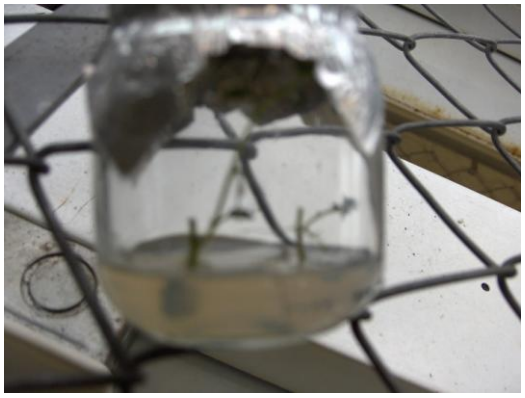


Figura 30 Desarrollo de brote sin crecimiento de raíz.

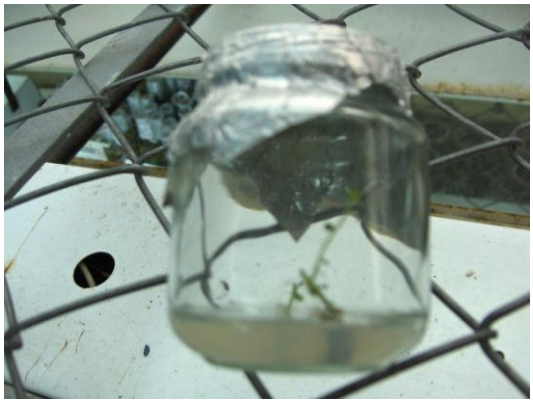


Figura 31 Crecimiento de brote.

2.7.1.4 Análisis estadístico de la variedad Icta-Frit

Cuadro 17 Análisis de varianza de para la variedad Icta-Frit

Análisis de la varianza

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Longitud de brotes (	28	0.59	0.47	58.72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23.16	6	3.86	4.95	0.0027
tratamiento	23.16	6	3.86	4.95	0.0027
Error	16.37	21	0.78		
Total	39.53	27			

En ésta variedad se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos evaluados ubicando al tratamiento testigo y el tratamiento 2 en el primer grupo, sugiriendo una igualdad estadística entre los resultados obtenidos con una media superior a los 2 cm de longitud en los brotes. En el análisis de medias con Tukey todos los demás tratamientos se ubican el grupo B.

Cuadro 18 Análisis Tukey para la variedad Icta-Frit.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.03141

Error: 0.7794 gl: 21

tratamiento	Medias	n		
T1	2.88	4	A	
T2	2.38	4	A	
T3	1.78	4	A	B
T5	1.70	4	A	B
T6	1.23	4	A	B
T4	0.33	4		B
T7	0.25	4		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

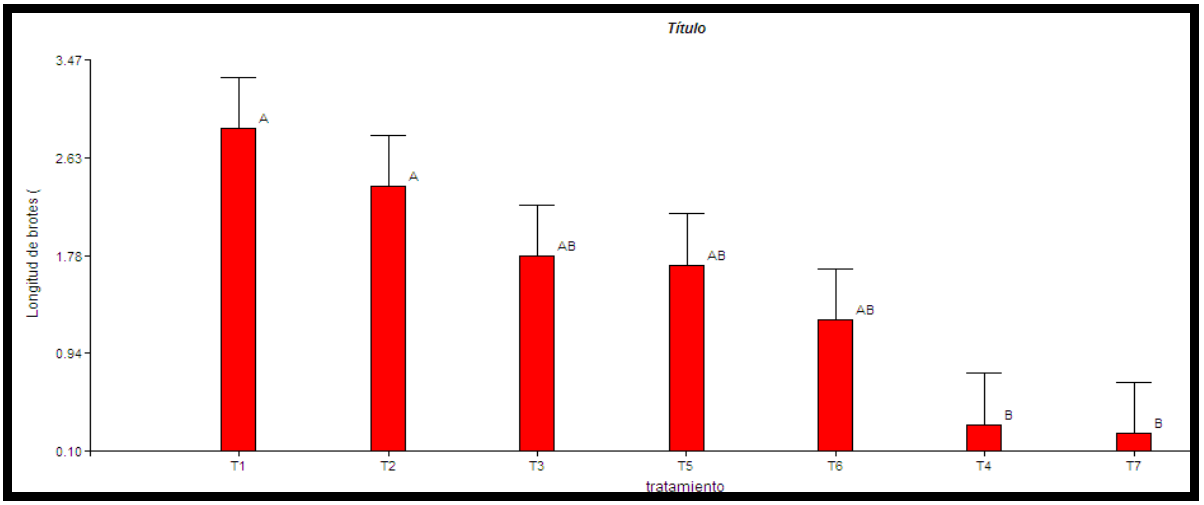


Figura 32 Longitud de brotes de la variedad Icta-Frit

Para esta variedad se pudo observar que los brotes que eran generados por los esquejes de papa lograban una longitud máxima de 4 cm, esto para la última fecha de lectura que fue el 1 de marzo de 2009.

El promedio de longitud alcanzado de todos los tratamientos para esta variedad fue de 1.50 cm. Sin embargo la mayor longitud alcanzada para este clon fue la del tratamiento 1 (testigo) con 4 cm de longitud de brotes que corresponde a 0 mg/lt de citocinina con 0 mg/lt de auxina, y un promedio de 2.87 cm, ya que favoreció a una mayor producción de longitud de brote, notándose se así que no hay también necesidad de utilizar hormona de crecimiento citocinina, simplemente basta con el medio M.S al 100% (Medio Murashige y Skoog) para esta fase Aun asi también se puede decir que la menor longitud fue la que presento el tratamiento 7 que corresponde a 3.0 mg/lt de citocinina y 3.0 mg/lt de auxina con 0.25 cm.

Figura 33 Crecimiento del esqueje.

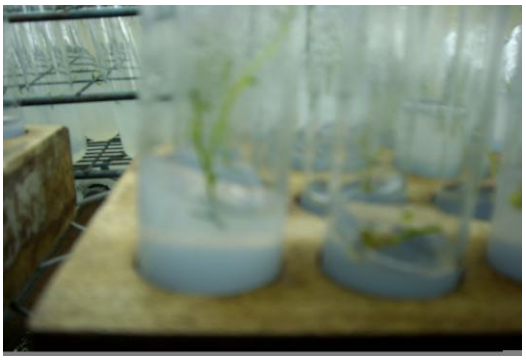


Figura 34 Desarrollo de brote y raíz

2.6.2 Fase III Enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase II

Los resultados obtenidos en la tercera fase de la investigación nos muestran que los esquejes no produjeron la cantidad de raíces esperada. De todas unidades experimentales únicamente el 40% de los esquejes produjeron raíces en todas las variedades en los 7 tratamientos utilizados.

En los cuadros anexados se puede observar que la variedad loman fue la que produjo mejores resultados en comparación a las otras tres variedades, y dentro de esta variedad los mejores resultados en cuanto a producción de raíces fue el tratamiento 3 (3.0 citocinina, 1.0 auxina) con una media de 1.63 cm de longitud en las raíces producidas. Sin embargo, la variedad tollocan presento como longitud máxima la del tratamiento 4 (3.0ax, 3.0cit) con una media de 0.68 cm en la longitud de raíces. Lo cual nos indica que esta variedad no tiene resultados satisfactorios para la propagación *In Vitro.*

2.7.2.1 Discusión de Análisis

Con el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos se determino que no hay diferencia significativa en la utilización de los tratamientos para el enraizamiento de los esquejes. Esto nos indica que la auxina (ácido naftalenacético) no tuvo resultados satisfactorios que demostraran el punto ideal para la aplicación de una concentración especifica para la inducción de raíces de plantas *In Vitro* por medio de la utilización de esquejes con nudos de papa, observándose así que los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos testigos.

2.7.2.2 Efecto fisiológico de las hormonas en los explantes

Jiménez, Chaparro, Blanco indican que tanto la inducción de callo como la regeneración de brotes requiere la presencia de concentraciones y combinaciones apropiadas de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Se ha demostrado que los requerimientos hormonales para que la organogénesis *in vitro* se lleve a cabo eficientemente son altamente dependientes del genotipo realizaron una evaluación utilizando diferentes concentraciones de Auxinas a saber, 0.0, 0.02 y 0.2 ANA (mg/L) en la que determinaron que el nivel de ANA fue el único factor que mostró influenciar el número de brotes producidos por explante.

Se observó que altas concentraciones de auxina disminuyeron notablemente el potencial organogénico de los callos, los pocos que iniciaron formación de brotes lo hicieron en un número muy bajo. Una concentración baja, o la ausencia de esta hormona, dieron lugar a un buen número de brotes por cada callo. Aunque la ausencia de auxina demostró ser favorable para la obtención de un número más alto de regenerantes por explante, ésta ejerce una influencia negativa sobre los procesos de callogénesis y regeneración.

Jones, indica que las citocininas que con frecuencia mas se utilizan es la 6-bencilaminopurina (BAP), esta se emplea con frecuencia debido a su gran actividad y su bajo costo. Generalmente las citocininas se emplean en dosis muy débiles en los medios de enraizamiento porque presenta un efecto inhibidor sobre la rizogénesis.

2.8 CONCLUSIONES

Las respuestas obtenidas permiten afirmar que estadísticamente no se necesita la utilización de ningún regulador de crecimiento, en este caso para la propagación masiva In vitro de los cuatro genotipos de papa (Loman, Icta-Frit, Tollocan, Atlantic). Es suficiente con el medio M.S. al 100%.

En la fase de inducción de brotes (fase II) se logro un mejor resultado en los tratamientos testigos de 3 genotipos de papa (Loman, Atlantic, Icta-Frit), no así en el genotipo Tollocan, que se vio un desarrollo lento, pero casi no respondió.

Las concentraciones de Auxinas aplicadas a los esquejes de papa, no presentaron mayores avances en el crecimiento de raíces, excepto en el tratamiento testigo siendo este quien presento los mejores resultados.

La etapa post-laboratorio ha evidenciado que si se obtienen plantas con calidad fitosanitarias, esta etapa ya no fue realizada debido a que en su momento las condiciones en que se encontraban los invernaderos de la Facultad de Agronomía, no eran las ideales para las plantas que se obtuvieron del laboratorio.

2.9 RECOMENDACIONES

1. Para la propagación masiva, se recomienda la no utilización de reguladores de crecimiento, solamente utilizando un medio M.S. al 100%, es suficiente para generar brotes y crecimiento de raíces.

2. Si se utilizan reguladores de crecimiento se recomienda utilizar concentraciones bajas de (Citocininas y Auxinas) para la propagación masiva ***in vitro,*** debido a que altas concentraciones inhiben el crecimiento de brotes así como el de raíces.

3. Se recomienda la utilización de las variedades Loman, Atlantic, Icta-Frit para la propagación masiva ***in vitro.***

4. La variedad Tollocan, es poco recomendable debido a que tiene un crecimiento lento, como lo indican los análisis estadístico, se sugiere hacer evaluaciones con diferentes dosis de reguladores de crecimiento.

2.10 Bibliografía

1. Christiansen JA; Vargas Mechuca, R. 1980. La papa: su utilización. Guatemala, ICTA-PREDECODEPA. 50 p.

2. EDIFARM Internacional Centroamericana, GT. 2007. Manual de hortalizas. Guatemala. 522 p.

3. Espinosa, N; Lizarraga, R; Siguenas, C; Buitrón, F; Dodds, JH. 1991. Cultivo de tejidos: micro propagación, conservación y exportación de germoplasma de papa: guía de investigación CIP 1. Perú, Centro Internacional de la Papa. Lima. 19 p.

4. Galindo, B. 1980. El cultivo de la papa en el municipio de Santa Cruz Balanyá, departamento de Chimaltenango. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 45 p.

5. Golmirzaie, AP. 2005. Producción de tubérculos-semillas de papa: manual de capacitación. Perú, Centro Internacional de la Papa. Fascículo 4.2, p. 7.

6. Gómez Delgado, EE. 2003. Efecto de medios de cultivo y tipos de recipientes en la tuberización *in vitro* de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 73 p.

7. Gonzáles, S. 2008. Medios de cultivo (en línea). Cuba. Consultado 11 oct 2008. Disponible en bio.uh.cu/webfv/docencia/tema%205.doc

8. Gudiel, VM. 1987. Manual agrícola Superb. 6 ed. Guatemala, Productos Superb. 256 p.

9. Henkes, R; Dunn, N. 1981. Aumenta el consumo de papa con nuevas variedades y nuevos métodos de producción, el cultivo de papa puede extenderse a un número mayor en regiones. El Surco no. 3:1-12.

10. IDC (Inversiones y Desarrollo de Centro América, GT). 2000. Diagnostico del sector de la papa en Guatemala. Guatemala. 52 p.

11. Jiménez, JP; Chaparro, A; Blanco, J. 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales (en línea). Colombia. Consultado 29 mar 2010. Disponible en www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/.../12282

12. Jones, SB. 1988. Sistemática vegetal. Trad. por Maria de Lourdes Hesca Tapia. 2 ed. México, MacGraw-Hill. 539 p.

13. Montesdeoca, M; Narvez P, G; Mora C, E; Benitez B, J. 2006. Manual de control interno de calidad (CIC) en tubérculo - semilla de papa. Quito-Ecuador, INAIP / COSUDE / PAPANDINA. 35 p.

14. Rivera Franco, J. 2002. Manual de el cultivo de la papa en Guatemala (*Solanum tuberosum* L.). Guatemala, ICTA. 39 p.

15. Salazar, L.F. 1997. Identificación y control de enfermedades virales y fitoplasmas de la papa. *In* Simposium Internacional de la Papa (1997, MX). Metepec, México, s. e. 10 p.

16. Soberón, JR; Quiroga, EN; Sampietro, AR; Vattuone, MA. 1998 Cátedra de fitoquímica. San Miguel de Tucumán, Argentina, Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Instituto de Estudios Vegetales “Dr. AR Sampietro”. 512 p.

CAPITULO III

INFORME DE SERVICIOS REALIZADOSEN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS FACULTAD DE AGRONOMIA, UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

3.1 ANTECEDENTES

Por los antecedentes que se tienen de El Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales que se encuentra en el Edificio T-8 de la Facultad de Agronomía, USAC. No tiene un buen rendimiento, asi como también la falta de conocimiento por parte de los estudiantes, esto se debe a que el laboratorio ha tenido muy poco seguimiento, lo que hace que el estudiante tenga poco conocimiento sobre lo que es el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, asi como también el poco servicio que presta el laboratorio.

Debido a tales problemas el laboratorio presenta condiciones tanto de infraestructura como de material y equipo, mano de obra muy reducido, lo que viene a dar como resultado un bajo rendimiento de producción, así como un falta de conocimiento por parte de los estudiantes debido al poco seguimiento interno que se tiene dentro de la facultad, para que las actividades sean eficientes y así poder aumentar el rendimiento en la producción de servicios del laboratorio, para que se tenga un buen funcionamiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Vegetales conjuntamente con los docentes del área que son también parte fundamental del mismo.

3.2 PROYECTOS

3.2.1 Realización del Manual de Prácticas de Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

3.2.1.1 Definición

En la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, existe un laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. El laboratorio es poco conocido por los estudiantes de la facultad, de tal forma que esto hace que sea poco utilizado por los estudiantes, así mismo no se cuenta con una base de datos donde se de a conocer los diferentes trabajos que el laboratorio a originado, siendo estos investigaciones de tesis.

Debido a tal problema se elaboro un documento sobre las diferentes especies forestales y vegetales que se han trabajo en el laboratorio.

3.2.1.2 Actividad

Se realizo una serie de actividades, tales como entrevistas con los profesionales de dicha área, así como revisión de literatura en la biblioteca de la facultad, con el fin de recabar toda la información posible que tuviera relación con el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

3.2.1.3 Objetivo

- Establecer una base de datos escrita con resultados obtenidos de las diferentes especies vegetales que se han trabajado en el Laboratorio de Cultivo de Vegetales, tomando como base la información obtenida en revistas, manuales, folletos, trifoliares obteniendo como producto un documento que muestre todo lo que se ha hecho en el laboratorio.

3.2.1.4 Meta

Que al final del documento elaborado quede registrado lo que se ha hecho y la metodología que se puede usar para el micro propagación de las diferentes especies vegetales.

3.2.1.5 Metodología

Los trabajos de elaboración de documento consistieron en entrevistar e ir a revisar trifoliares, tesis sobre las diferentes especies vegetales que se han trabajado en el laboratorio durante años anteriores. Se hizo una revisión minusiosa de todo la información que se tiene existente en la biblioteca, posteriormente con ayuda de una computadora se procedió a elaborar dicho documento.

3.2.1.6 Resultados

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
AREA TECNOLÓGICA
SUBÁREA MANEJO Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS
LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
Con énfasis en especies forestales.

Ing. M.Sc. Domingo Amador Pérez
Octubre de 2007

TÉCNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*.

INTRODUCCIÓN

Desde que se inventó la agricultura, para proporcionar los alimentos necesarios para la subsistencia de los seres humanos, la manera tradicional de reproducir las plantas era partir de la germinación de sus semillas. Sin embargo, en la actualidad ya no es necesario disponer de semillas para obtener plantitas hijas suficientes, para sembrar en los campos. Lo anterior ha sido posible gracias al empleo de técnicas desarrolladas recientemente, que permiten desarrollo de cualquier parte de una planta, hasta un organismo completo, a partir de una célula, bajo condiciones artificiales *in vitro.* A este conjunto se técnicas se les ha denominado: Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*.

Las técnicas de cultivo de Tejidos Vegetales son una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos (investigación bioquímica, genética, fisiológica, molecular, estructural, etc) y aplicados en la biología vegetal (propagación conservación y manipulación *in vitro* de material vegetal). Estas se basan en el empleo de medios de cultivos semisólidos que contienen agar, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) y sacarosa como fuente de carbono.

Dentro de este conjunto de técnicas se encuentra la denominada: micropropagación. Un término empleado para describir a la propagación asexual de plantas. Es una de las técnicas más utilizadas, debido a su enorme productividad al compararse con las técnicas tradicionales de propagación de plantas vía semillas o propagación vegetativa. La micropropagación, de una especie, permite a partir de diversos explantes (embriones, cotiledones, raíz, hipocotilo, epicotilo, tallos, hojas), regenerar plantas completas idénticas en mayor cantidad y calidad a las obtenidas a partir de semillas. Este tipo de técnicas, son de gran utilidad para la conservación de especies en peligro de extinción o para la propagación de especies vía semillas, en los que los porcentajes de germinación son bajos o cuya viabilidad es muy corta (chile habanero). Permitiendo solucionar así la disponibilidad de material vegetal

La micropropagación de cualquier especie vegetal, consta de 5 etapas básicas:

Etapa 0. Selección de las plantas madres.

Es una etapa preparativa en la cual se seleccionan y acondicionan las plantas madres que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*. Si se parte de una planta con mejores características deseables superiores al promedio, las plantas regeneradas tendrán un alto valor.

Etapa 1. Establecimiento de los cultivos axénicos.

La etapa consiste en la selección del explante y la asepsia del mismo para iniciar el cultivo. La elección del explante, depende de la especie y del sistema de proliferación en la etapa 2 Es una etapa crucial, ya que la introducción de explantes obtenidos a partir de plantas adultas, está limitado por problemas de contaminación por hongos o bacterias. Motivo por el cual se prefiere iniciar el establecimiento del cultivo a partir de semillas asépticas germinadas *in vitro*, facilitándose así la obtención de los explantes asépticos (raíz, tallos u hojas). En esta etapa en muy común emplear medios de cultivos diluídos y libres de reguladores de crecimiento.

Etapa 2. Multiplicación del tejido.

Esta etapa es realmente donde se realiza la micropropagación, ya que es donde se obtienen un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de los explantes. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: organogénesis (formación de órganos) y embriogenesis (formación de embriones) y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos. Para favorecer esta etapa se emplean medios de cultivos con reguladores de crecimiento: como las citocininas y auxinas

Etapa 3. Elongación y enraizamiento.

En general, lo que se obtiene en la Etapa 2, son pequeños brotes, en la mayoría de los casos carentes de raíz y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. Esta etapa consiste en lograr que los brotes se elonguen y formen su sistema radical al mismo tiempo, para facilitar su manipulación y adaptación al medio externo. Para favorecer la elongación se emplean medios de cultivos suplementados con citocininas o libre de reguladores de crecimiento, mientras que para el enraizamiento de los brotes se emplea las auxinas.

Etapa 4. Adaptación al medio externo.

Las plantas enraizadas *in* vitro presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo. Entre estas características se encuentran: la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las plantas generadas *in vitro* carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (cutícula poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado). Las plantas generadas no realizan una fotosíntesis normal, ya que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que la anatomía de las hojas difieren de las plantas que crecen *in vivo*, siendo mas delgadas y con menor contenido de clorofilas. Por lo que es necesario desarrollar en forma paulatina su autofrofía, para adaptarlas al medio externo con éxito. Como son cultivos libres de patógenos, las

plantas no han activado sus mecanismos de resistencia naturales, por lo que es recomendable trabajar en las condiciones más higiénicas posibles.

Esta etapa, es crucial, ya que de nada sirve tener un sistema de proliferación muy productivo, si el porcentaje de plantas que sobreviven en esta etapa es muy bajo, debido a la contaminación por bacterias u hongos. Esto es muy común, cuando las raíces no son adecuadamente lavadas con agua para eliminar los remanentes del medio de cultivo (agar).

Ventajas de la micropropagación:

1. Es un sistema ideal para la manipulación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes.
2. El proceso se realiza en laboratorio y bajo condiciones controladas, por lo que es independiente de las condiciones externas.
3. El número de plantas que se pueden obtener es ilimitado. El límite es la capacidad del laboratorio.
4. El espacio requerido es mínimo y el tiempo en el que se realiza el proceso es relativamente corto.
5. Las plantas obtenidas están libres de patógenos (bacterias, hongos o virus), por lo que se pueden exportar fácilmente.

Desventajas de la micropropagación:

1. Costo inicial del laboratorio
2. Requerimiento de personal especializado
3. Costos de producción

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

Dado que la micropropagación es un proceso productivo con un potencial económico muy amplio, si estamos interesados en micropropagar una especie con fines comerciales, es necesario tomar en cuenta otras consideraciones además de las estrictamente científicas. Entre estas: El costo de las plantas obtenidas por los métodos tradicionales. Cuales y que tan alejados están los centros de producción. Cual es el mercado potencial de la especie. Que porcentaje está cubierto por los sistemas tradicionales de propagación. Si las variedades están patentadas. Si el sistema de micropropagación puede competir en el mercado, introduciendo la producción fuera de temporada, o con la introducción de nuevas variedades, etc.

En los sistemas de micropropagación, la mano de obra representa entre el 60-80% del costo final de las plantas. Y aunado a ello, siempre será necesario contar con la asesoría de

personal capacitado dedicado a la investigación, ya que durante el desarrollo de los sistemas de micropropagación, se presentan problemas de contaminación vitrificación, pérdida de vigor, etc. y que habrá que resolver durante el proceso.

EXPLOTACIÓN COMERCIAL

La micropropagación ha dado origen a una industria de gran importancia en varios países del mundo, por lo que ha desplazado en muchos casos los sistemas tradicionales de producción de plantas, vía germinación de semillas. En la década pasada, por ejemplo en Europa, países como Holanda, Francia, Italia, Bélgica, Alemania, España e Inglaterra, produjeron en conjunto más de 216 millones de plantas/año. Entre estas y en orden de importancia, destacan, las ornamentales de macetas, flores para corte, frutales, ornamentales de bulbo, orquídeas y especies forestales. En Asia (Japón, Tailandia, Singapur y Malasia) se produjeron entre 65-86 millones de plantas (año, entre las cuales 38 millones son orquídeas. Mientras que en los Estados Unidos se reportó una producción de 65 millones de plantas anuales, principalmente de especies ornamentales, forestales, frutales y orquídeas.

PERSPECTIVAS

El establecimiento de protocolos de micropropagación eficientes para una determinada especie, solucionan el problema de la baja disponibilidad de plantas. Pero en forma adicional, son la base para su posible mejoramiento genético, empleando las técnicas de la ingeniería genética, ya que estas últimas técnicas, permiten la manipulación de genes, y su introducción en una especie vegetal y con los cuales se les puede conferir características nutricionales adicionales (mayor contenido de vitamina A o de hierro, etc.) o mejorar sus características agronómicas, como son la resistencia: a sequía, salinidad, metales pesados, insectos o patógenos, etc.

.PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PINABETE (*Abies guatemalensis* Rehder.) POR MEDIO DE LA MULTIPLICACIÓN DE APICES DE BROTE

Jairo Daniel Monzón Ostorga, Guatemala, 2005

Colecta del material vegetal

Se recolectan los materiales que presentan un buen estado fisiológico. La parte de la planta que se emplea es el ápice meristemático, para lo cual se cortan brotes no mayores de 5 cm de longitud, utilizándose una navaja debidamente desinfectada en una solución de methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamato (Benomyl WP (50%) a 0.1%.

En esta solución, el material vegetal cortado se sumerge para su transporte al laboratorio.

Desinfección del material vegetal

Dentro del laboratorio los brotes permanecen un tiempo más en la solución de fungicida-bactericida y antioxidantes para eliminar la contaminación y prevenir tempranamente el ennegrecimiento de los explantes, los cuales completan un tiempo de 24 horas de contacto con la solución a una temperatura de 5°C.

Luego el material pasa por una batería de desinfección compuesta por: alcohol etílico al 70% durante 2 minutos. Luego los brotes se transfieren a una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, en cada pasó se agita con una pinza esterilizada para uniformizar el proceso de desinfectación. Posteriormente se realizaron 3 lavados al material vegetal con agua destilada estéril, luego el material vegetal se sumerge en una solución de ácido cítrico a 100 ppm esterilizado.

Disección y extracción del explante

En la cámara de flujo laminar, en cajas de petrí esterilizadas, pinzas y bisturies y con 3-5 ml de ácido cítrico a 150 ppm, se procede a la disección del explante, para lo cual se elimina todo tipo de envoltura que recubre y protege el ápice meristemático.

Prueba de antioxidantes

Los ápices de brote de pinabete *Abies guatemalensis* Rehder utilizados como explantes responden al control de la oxidación, utilizando en el medio de cultivo Wody Plant Médium, suplementado con carbón activado a una concentración de 0.25%.

Medio de cultivo WPM Lloyd & McCown (1981)

Macroelementos (mg/l)

- NH_4NO_3 400
- $Ca(NO_3)_2 . 2H_2O$ 556
- $CaCl_2 .2H_2O$ 96
- $MgSO_4 . 7H_2O$ 370
- $KH_2 PO_4$ 170

Microelementos (mg/l)

- $MnSO_4 \quad 4H_2O$ 22.3
- $ZnSO_4 . 7H_2O$ 8.6
- H_3BO_3 6.2
- $CuSO_4 . 5H_2O$ 0.25
- $NaMoO_4 . 7H_2O$ 0.25
- $FeSO_4 . 7H_2O$ 27.8
- $Na_2 EDTA. 2H_2O$ 37.3

Respuestas del pinabete al cultivo de tejidos

Los ápices de brote del pinabete (Abies guatemalensis) responden bien a la formación de brotes adventicios en cultivos *in vitro* en el medio de cultivo Word Plant Media de Lloyd y McCown (1981) suplementado con 3 mg/L bencilaminopurina + 0.1 - 0.5 mg/L ácido naftalenacético.

El tratamiento con el suplemento de 0.5 – 1.5 mg/L bencilaminopurina + 0.1 - 0.5 mg/L ácido naftalenacético puede ser útil en la elongación de los brotes.

MICROPORPAGACIÓN DE MORA SILVESTRE (*Rubus hadrocarpus* forma *adenophorus* Standl. & Steyerm., f. nov.)

Silvia García Canté

La mora (*Rubus sp*.) es un producto no tradicional, que ha tenido desde hace quince años, aceptación en el mercado nacional y demanda en el mercado internacional. Se cultiva principalmente en la zona central de Guatemala en una extensión aproximada de 200 ha., destinando 625 toneladas métricas de producción a la exportación. Los principales mercados a nivel internacional son Estados Unidos y la Unión Europea.

Explante: yemas axilares de plantas sanas.

Tratamiento: La planta seleccionada se propaga por el método de siembra de plántulas enraizadas en condiciones de invernadero y se someten a tratamientos fitosanitarios. Se escogen las yemas axilares de las partes medias de las ramas (según análisis previos éstas resultaron ser las más apropiadas para la micropropagación, ya que son menos susceptibles a la oxidación y son más fáciles de manipular). Los explantes se colocan en una solución de antibióticos y antioxidantes por espacio de dos horas (de acuerdo a investigación previa, tiempos menores no hace efecto sobre eliminación de microorganismos y tiempos mayores produce la oxidación de los explantes)
.
En la cámara de flujo laminar se lavan los explantes con agua destilada estéril durante 5 minutos (3 veces), para eliminar el exceso de la solución de antibióticos y antioxidantes. Para completar su esterilización se colocan los explantes en alcohol a 95% por espacio de un minuto, un lavado posterior elimina el alcohol, para finalizar la esterilización con hipoclorito de sodio al 2% por un espacio de 3 minutos (concentraciones y tiempos mayores producen la oxidación del explante). Por último se eliminan los residuos de hipoclorito de sodio con agua destilada estéril y se colocan los explantes, en una solución 150 ppm de ácido cítrico (antioxidante), mientras se procede a la siembra.

En la cámara de flujo laminar se eliminan las espinas y hojas que recubren la yema axilar y se siembra el explante en el medio de cultivo para la inducción de brotes. Para evitar la

contaminación del propágulo se realizó la siembra cerca de la flama del mechero y con instrumentos estériles, desinfectados con alcohol y calor.

Finalmente se colocan los explantes en el cuarto de crecimiento por espacio de mes y medio. Se realiza una visita semanal al cuarto de crecimiento para cuidar que la contaminación u oxidación no afecten el proceso de desarrollo del explante.

Medio de cultivo: Medio básico de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración, suplementado con bencilaminopurina y ácido giberélico.

Los tratamientos con bencilaminopurina y ácido giberélico en las proporciones de 3:1 ppm y 5:1 ppm son los más indicados para la propagación de *Rubus hadrocarpus* forma *adenophorus*, debido a que produce en promedio un brote por tratamiento. Estos brotes presentan desarrollo superior en cuanto a altura y número de hojas. Estos tratamientos inducen además un número aceptable de nudos, los cuales presentan longitud adecuada para la micropropagación.

Los niveles altos de bencilaminopurina (7ppm) y bajos de ácido giberélico (0.1ppm, 0.5ppm y 1ppm) producen mayor número de brotes, pero de escaso crecimiento en longitud.

En cuanto al testigo los resultados son aceptables, ya que la planta tiene cantidades suficientes de reguladores de crecimiento en forma endógena para su propio desarrollo.

La planta también posee los reguladores de crecimiento suficientes para inducir enraízamiento en los explantes, sin embargo el tiempo de desarrollo de la raíces fue prolongado (2 meses), por lo que es recomendable la aplicación de bencilaminopurina (0.5 y 1.0 ppm) para acelerar el proceso.

Condiciones de luz y temperatura: intensidad lumínica: 1,000 lux. Fotoperíodo: 16 horas luz por 8 de oscuridad. Temperatura: ± 25 °C.

PROPAGACIÓN DE HELECHOS: CALAHUALA (Phlebodium psedoaureum (Cav.) Lellinger

La calahuala es un helecho epífito con rizoma rastrero. Por sus propiedades medicinales los colectores han ejercido presión sobre el bosque al extraerla para su comercialización intensiva, lo cual provoca sobreexplotación de la misma de tal manera su extinción.

Explante: esporas. Las esporas de los helechos, que son bastante pequeñas pueden ser esterilizadas y manejadas de la misma manera como las semillas de las orquídeas. Las esporas de los helechos pueden ser germinadas *in vitro*, si con colocadas en un medio

semisólido, conteniendo una baja concentración de sales, y si con convenientemente sembradas en tubos de ensayo.

Tratamiento: De plantas establecidas en invernadero y tratadas con Sistemin y Azufre se cortan frondes y se envuelven en papel toalla húmeda con agua destilada estéril y estas se transportan en bolsas plásticas previamente desinfectadas con etanol al 70%. En el laboratorio se extraen los soros sobre papel encerado los cuales se colocan en bolsitas de papel filtro, simulando bolsas de té. Estas bolsitas se desinfectan con una solución de etanol al 70% por 2 minutos, luego se enjuaga con agua destilada estéril, y se sumergen nuevamente las bolsitas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos. Finalmente se retira el hipoclorito de sodio en la campana de flujo laminar con 3 lavados de agua destilada estéril.

Licuado de los prótalos: A los 90 días de sembrados los soros se procede a realizar un licuado de los prótalos formados. Esta actividad se realiza con el objeto de provocar una mayor fecundación de los anteridios con los arquegonios y así obtener la mayor cantidad posible de esporofitos. Luego de la operación anterior se procede a dispersar el licuado en los frascos conteniendo el medio de cultivo para obtener esporofitos jóvenes

Medio de cultivo: Se utiliza el medio de Murashige y Skoog (1962) con concentración de sales reducidas al 50%, obteniendo esporofitos jóvenes a los 200 días aproximadamente. Al medio se agrega sacarosa a razón de 30 mg/L. No se requiere del uso de reguladores del crecimiento.

Condiciones de luz y temperatura en el cuarto de incubación: Las condiciones de incubación son luz blanca proveniente de lámparas de neón, con una intensidad de 1,000 a 3,000 lux aproximadamente y temperatura media de 20ºC y 18 horas de luz / 8 horas de oscuridad.

MICROPROPAGACIÓN DE PAPA (*Solanum tuberosum*)

Debido a que la papa (*Solanum tuberosum*) es muy atacada por enfermedades, la técnica de cultivo de tejidos es una forma ideal para multiplicar lotes libres de enfermedades. El mejor método de micropropagación es por propagación de nudos. El establecimiento del explante primario requiere 8 semanas, aproximadamente. La tasa de multiplicación por nudos varía de variedad a variedad y de línea a línea (una línea esta constituida por aquellas plantas provenientes de un tubérculo único). Con el medio particular dado aquí, las raíces desarrollarán de los brotes, y por lo tanto un medio de enraizamiento particular no es necesario. La transferencia al suelo es realizado en una mesa con niebla o un toldo húmedo.

Explante: Yemas apicales o axilares de tubérculos brotados.

Tratamiento: Sumergir los brotes en alcohol al 70%. Agitar en blaqueador 1/10 + Tween 20 =.1% por 10 minutos. Lavar tres veces en agua destilada estéril. Estar seguro de suministrar oxígeno a los cultivos.

Medio de cultivo: Sales MS con inositol, tiamina, cinetina y GA_3.

Luz: 300 f.c. (pies candela) de luz fluorescente blanco-frío, 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.

MICROPROPAGACIÓN DE BANANO (*Musa* sp.) Enano ecuatoriano (AAA).

Establecimiento del cultivo libre de patógenos.

La primera fase tiene como objetivo principal la obtención del material vegetativo estéril, el cual es utilizado APRA la posterior siembre in Vitro. El proceso incluye la selección de plantas en el campo y la posterior desinfección y establecimiento de las mismas bajo condiciones asépticas.

Como material inicial se utilizan hijuelos del cultivar de banano Enano Ecuatoriano (AAA) subgrupo Cavendish.

En el campo las plantas se seleccionan de acuerdo a su estado morfológico (grosor del tallo, número de hojas, apariencia fitosanitarias, etc) y productivo, preferiblemente plantas con racimo bien desarrollado.

Una vez extraídos los hijuelos o yemas laterales, con ayuda de cuchillos se procede a eliminar las pacas exteriores de los cormos que recubren las yemas apicales y meristemos, hasta lograr un tamaño del cormo de 5-7 cm de altura y 10 cm de diámetro, luego se introducen inmediatamente en agua destilada para evitar la oxidación de las paredes del cormo.

Procedimiento de laboratorio.

Establecimiento de los explantes.

El material extraído en el campo se lava con detergente común y es enjuagado con agua destilada para eliminar los residuos de detergentes y otros materiales contaminantes de la superficie de los cormos.

Una vez lavado el material se practica una primera desinfección con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% durante 10 minutos.

Con cuchillos esterilizados se eliminan las vainas foliares del cormo hasta lograr un tamaño de 2 – 3 cm, teniendo este tamaño el material se lleva a la cámara de flujo laminar, la que es desinfectada previamente con luz ultravioleta durante 15 minutos y alcohol al 70%.

En la cámara de flujo laminar con ayuda de escalpelos y pinzas esterilizadas se eliminan las últimas capas que recubren la yema apical, dejando el explante listo para la siembra de un tamaño de 0.5 – 1.0 cm de altura. Finalmente se efectúa la segunda desinfección, esta vez con peróxido de hidrógeno (H2O2) al 5% durante 10 minutos, enjuagando abundantemente con agua destilada estéril para eliminar los residuos de esta sustancia.

Inmediatamente después de la segunda desinfección se procede a efectuar la siembra o implantación en tubos de ensayo de 14.5 x 2.5 cm conteniendo 10 ml del medio de cultivo en estado líquido y utilizando papel filtro como soporte del explante.

Los medios de cultivo se preparan y esterilizan previo a la siembra en autoclave a temperatura de 121ºC y 1.5 atmósferas de presión durante 25 minutos. El medio de cultivo básico utilizado es el MS, suplementado con 0.3 mg por litro de ácido indol butírico (IBA) solamente en la etapa de establecimiento.

Después de la siembra los ápices son trasladados a un cuarto de crecimiento donde se establecen bajo condiciones externas reguladas con temperaturas de 25 ± 1ºC, intensidad lumínica de 2,000 lux por un período de seis semanas hasta lograr diferenciar una planta de cada ápice establecido.

Procedimiento de micropropagación o multiplicación de brotes..

En la segunda fase se utilizan diferentes niveles de reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas) y consistencia del medio de cultivo semisólido y líquido durante tres subcultivos, a fin de obtener la combinación de estos factores que conduzcan a la óptima proliferación de hijos y el menor riesgo de variabilidad somaclonal.

Se puede probar niveles de ácido indol acético (AIA) entre 0 y 1 mg/L combinado con niveles de bencil amino purina (6.BAP) entre 5 y 10 mg/L. La consistencia del medio de cultivo puede ser medio semisólido y medio líquido.

En esta fase se detrmina los medios de cultivo (tratamientos) que mejor respuesta tienen sobre la ópitma proliferación de hijos en el cultivar de banano, considerando la influencia de la consistencia física del medio de cultivo, la combinación y concentración de reguladores del crecimiento y el número de subcultivos.

Para el inicio del estudio se utilizan las plántulas obtenidas en la fase anterior, seleccionando los explantes con mejor apariencia. Estas plántulas son limpiadas de tejidos necrosados y reducidas de tamaño hasta 0.5 y 1.0 cm de altura; este proceso se realiza en la cámara de flujo laminar con ayuda de pinzas y escalpelos esterilizados.

Una vez preparados los explantes, éstos son establecidos en el medio de cultivo basal al cual se adicionan los niveles de reguladores del crecimiento para cada tratamiento o variante de cultivo en estudio. La siembra se realiza en frascos de 10 cm de altura por 8 cm de

diámetro conteniendo 30 ml del medio en estado semisólido y 15 ml en el caso del medio líquido.

El medio basal empleado es el de Murashige & Skoog (1962), denominado en los sucesivo medio MS.

Para la micropropagación *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA), se recomienda el empleo de concentraciones de &.BAP de 7 mg/L o menores, y el uso de medio de consistencia semisólidos, sin la adición de AIA cuando el propósito sea la multiplicación de los explantes.

El tratamiento de 7 mg/L de 6.BAP presenta una tasa estimada de proliferación de 3.6 hijos por explante.

Los medios de cultivo de consistencia líquida deben emplearse tanto en la etapa de establecimiento de los explantes así como durante el acondicionamiento de los mismos para su traslado a condiciones ambientales normales.

Para trabajos de propagación comercial no se recomienda el uso de medios de cultivo que generan altas tasas de proliferación, ni mantener los explantes en cultivo durante largos períodos de tiempo.

PROGACIÓN *IN VITRO* DE LA ESPECIE TRES PUNTAS (Neurolaena lobata L.) POR MEDIO DE LOS APICES LATERALES

Roy Walter Villacinda Maldonado, 1994

Objetivo del trabajo: Evaluar la respuesta de la especie Tres puntas (Neuro laena lobata L.)

La especie Neurolaena lobata L., es conocida comúnmente en Guatemala como Tres puntas o mano de lagarto.

Es una planta que pertenece a la familia asteraceae, es una hierba o arbusto, las ramas son poco densas, comúnmente con tallo erecto, planta medicinal ya que se le atribuyen propiedades antimalàricas e hipoglicemiante, virtudes que han sido comprobadas a través de la investigación.

Se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, el Petén, el Progreso, Quetzaltenango, San Marcos.

Explante: Se seleccionaron las plantas mas tiernas, verdes y sanas. La parte de la planta que se emplea son los ápices laterales de la planta en estado de madurez.

Medio de cultivo: Se utilizó como medio basal en el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 0.5 mg/L. de ácido giberélico (GA_3) y diferentes concentraciones de bencil aminopurína (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB).

Resultados: Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de la especie a la inducción de plantas a través de éste cultivo está condicionada por la oxidación del explante.

Existieron ciertos factores que limitaron el crecimiento del meristemo, en algunos se observó la formación de callo, situaciones atribuidas a la oxidación del material vegetal.

Existieron 3 tipos de respuestas: (A) Oxidación tempranas y muerte del meristemo: aquellos que murieron en el inicio, luego de ser inoculados en el medio de cultivo, a consecuencia de la severa oxidación del tejido. (B) Oxidación y formación de callo: aquellos tratamientos en los que el explante no mostró crecimiento del meristemo, existió oxidación, pero algunas porciones del tejido formaron callo.(C) Crecimiento inicial y posterior formación del callo: El meristemo tuvo crecimiento inicial y formación de hojas verdaderas, pero, al cabo de 20 días estas hojas se curvaron hacia el medio de cultivo (epinastía), y formaron callo, se observó en el 8.2% de los explante.

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE DOS CULTIVARES DE AGUACATE Persea americana Mill. FUERTE Y BOOTH 7, POR MEDIO DE YEMAS AXIALRES

Carlos Moisés Hernández González, 1999

Objetivo del trabajo: Estudiar la respuesta de las yemas axilares del aguacate Persea americana Mill., cultivares Fuertey Booth 7, al cultivo in Vitro; utilizando el medio basal de cultivo Murashige y Skoog (MS), suplementado con distintas concentraciones de auxinas, citocininas y giberelinas.

Poblaciones silvestres de *Persea americana* Mill., se encuentran desde México hasta Colombia y de ellas podrían originarse quizás en domesticaciones separadas, los tipos cultivados. De éstos se reconoció desde el tiempo de los primeros cronistas, que podrían separarse en res grupos: La raza guatemalteca, la raza mexicana y la raza antillana.

En Guatemala cuyo sustento económico es la activad agrícola, es de esperarse que la Biotecnología alcance una gran aplicación, sustentado principalmente en el mejoramiento genético de cultivos de exportación, basándose principalmente en las técnicas más sencillas y de menores volúmenes de inversión como el cultivo *in Vitro* de puntas meristemáticas, yemas axilares y hojas.

Explante: Yemas axilares de *Persea americana* Mill, de los cultivares Fuerte y Booth 7, germinados *in Vitro.*

Medio de cultivo: Basal líquido, descrito por Murashigue y Skoog (MS) con puentes de papel filtro, (para reducir la oxidación), con los macronutrientes reducidos al 50%, más 3.7 g/l de polyvinylpyrolidone (PVP) (antixioxidante).

Y el medio basal MS sólido, con los macronutrientes reducidos al 50%, adicionándole 3.7 g/l polyvinylpyrolidone (PVP), 250 mg/l de carbón activado (absorvente), y conteniendo diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, para la inducción y crecimiento de brotes adventicios.

Resultados: Los explantes expelieron alrededor de su base, compuestos producto de la degradación del tejido y en casos más severos en todo el medio.

La oxidación del explante, siendo severa, no permitió que las yemas axilares absorvieran los nutrientes necesarios, para la adaptación y crecimiento posteriores.

Los explantes pueden a veces producir pigmentos (rosados, rojo, café, rojizo, negro o azul), a veces después de la extracción, o los cultivos pueden dar esto durante el crecimiento subsecuente. En algunos casos, la formación en este estado, es debido a daño o senescencia de algunas células, causados por un inapropiado medio de cultivo. La secreción de substancias en cultivos establecidos, no afecta el crecimiento cuando la decoloración ocurre en forma mínima después del aislamiento, pero cuando esto ocurre, el crecimiento es generalmente impedido.

Resultados: Para el clon Gran Enano puede ser micro propagado utilizando 4.3 mg/l de BAP. Para el clon Williams se recomienda utilizar 6.3 mg/l de BAP para su micropropagación.Para el clon Valery se recomienda utilizar 5.6 mg/l de BAP para su propagación *in Vitro.*

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

Edwin enrique Gómez Delgado 2003

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

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

Objetivo del Trabajo: Determinar la respuesta de los clones Loman e Ictafrit de papa *(Solanum tuberosum L.)* a la técnica de tuberización *in Vitro.*

Explante: Micro tubérculos.

Medios:

a. KO= Medio tuberizador desarrollado por Ken Okabe (1,998)
b. W-H= Medio tuberizador desarrollado por Po-Jen Wan Y Ching – Yeu Hu (1,982).
c. M-S= Medio tuberizador desarrollado por Murashige y Skoog (1,984) modificado.
d. KIM= Medio tuberizador desarrollado por Y.C Kim (1,982)
e. H-S= Medio tuberizador desarrollado por Hussey]G. y Stacey (1,984)
f. P-S=Medio tuberizador desarrollado por Palmer y Smith (1,969).

Resultados:

Para el clon Ictafrit, en recipientes Magenta, el medio H-S, favoreció la producción de un mayor número promedio de micro tubérculos, el medio KO, produjo micro tubérculos de mayor peso promedio en miligramos.

Para el clon Loman, en recipientes Magenta; el medio H-S, favoreció la producción de un mayor promedio de micro tubérculos; el medio M-S produjo micro tubérculos de mayor peso promedio en miligramos y micro tubérculos de mayor tamaño.

Para el clon Ictafrit, en recipientes Gerber; el medio H-S, fue el medio productor de un mayor número promedio de micro tubérculos y el medio P-S, el que produjo micro tubérculos promedio de mayor peso promedio en miligramos y de mayor tamaño promedio, respecto al diámetro promedio en miligramos y longitud promedio en miligramos de los micro tubérculos.

Para el clon Loman, en recipientes Gerber; el medio KIM, fue el medio productor de un mayor numero promedio de micro tubérculos, el que produjo micro tubérculos promedio de mayor peso miligramos y de mayor tamaño en términos de diámetro promedio en miligramos, la formación de micro tubérculos con brotes, no fue determinante.

Para el clon Ictafrit en Tubos de cultivo; los dos mejores medios fueron: P-S, que produjo dos micro tubérculos por explante y por cultivo; el otro medio fue KIM que de igual forma produjo dos micro tubérculos por explante.

Para el clon Loman en Tubos de Cultivo; el mejor medio en términos generales, fue el medio de KIM, que favoreció la formación de dos micro tubérculos por explante y por tubo de cultivo.

Unas de las principales causas de la inducción al brotamiento es la hiperhidracidad causada por la acumulación de etileno.

EFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA PROLIFERACION DE BROTES *in vitro* DE TRES VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Mak Mílan Cruz Sic 2004

Objetivo del Trabajo: Establecer un método para la obtención de brotes de caña de azúcar *in vitro* de las variedades CP 722086, SP 792233 y PR 872080.

El medio más utilizado par las etapas metodológicas de iniciación, brotación y regeneración, consiste en las sale de Murashige & Skoog con ligeras modificaciones en macro elementos, vitaminas y fithormonas también con algunas mejoras actuales como: el uso de medio líquido para la etapa de iniciación más un antioxidante para reducir la fenolización, como Polivinilpyrrolidone (PVP) o ácido cítrico. El carbón activado se puede agregar al medio sólido en la etapa de iniciación. El pH del medio debe estar comprendido entre 5.6-5.8; la esterilización se ejecuta a 110°C por un espacio de tiempo de 15 minutos a 15 libras/pulgadas^2 equivalente a 1.2 atmósferas/cm^2 de presión.

Explante: ápice meristemático.

Medios:

A. Medios de cultivo para el establecimiento de explantes de tres variedades de caña: Se tomo como base la preparación de un litro de medio, para lo cual se procedió de la siguientes manera: en un con capacidad de un litro, con un volumen de 500 ml de agua destilada se mezclaron las soluciones concentradas del MS con sus respectivos componentes de reactivos y reguladores del crecimiento.

"RESPUESTA DEL PINABETE *Abies guatemalensis* Rehder A LA PROPAGACIÓN IN VITRO UTILIZANDO EMBRIONES CIGÓTICOS COMO TEJIDO INICIAL"

Heisler Alexander Gomez Mendez 2004

Objetivo del Trabajo: Establecer un procedimiento par la propagación in vitro del Pinabete *Abies guatemalensis* Rehder.

El pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) es una especie nativa, cuya madera es preferida entre otras coníferas debido a su suavidad y a su utilidad en construcciones y como combustible.

El *Abies guatemalensis* Rehder, es conocido también como romerillo y pashqué.

Ha sido considerado una especie en peligro de extinción, por la reducida viabilidad de la semilla, la cual es un factor intrínseco que permite a la semilla conservar su capacidad de germinación, por ello las posibilidades de germinación del pinabete son bajas. Es una

especie que presenta dificultades en su propagación por medio de semilla botánica por registrar porcentajes muy bajos de germinación.

Explante: Estróbilos de los cuales se obtuvo el embrión.

Medio: Las soluciones patrón se hicieron para cada uno de los grupos que conforman el medio de Renfroe & Berlin.

Resultados: El estudio se llevó a cabo extrayendo el embrión proveniente de conos inmaduros, lo que aseguraba la inocuidad y viabilidad. Se extrajeron semillas de los conos y posteriormente se les extrajo el embrión cigótico para usarlos como explante en el medio de cultivo.

A los cinco días de sembrados los embriones se empezó a observar la respuesta de los mismos hacia el medio, y en un amplio rango de tratamientos hubo respuesta, manifestándose la respuesta en un evidente cambio de coloración de los embriones, pero al tomar la primera lectura a los cinco días de sembrados empezaron a tornarse de un color verde tierno con lo cual demuestran una fase inicial de respuesta al romper su estado latente iniciando la germinación.

- Formación de masa embriogénica.

Al tomar la lectura a los veinte se observo una masa cristalina en la parte del embrión que estaba en contacto con el medio, lo cual se le denominá masa embriogénica, esta masa es la respuesta de los embriones en estado dominante a la estimulación por reguladores de crecimiento.

El cultivo de embriones cigóticos en los medios nutritivos responden a la propagación in vitro diferenciándose los embriones en hojas cotiledonares asciculiformes, formando masa embriogénica y brotes adventicios-axilares.

RESPUESTA DEL IZOTE PONY (*Beaucarnea recurvada R.*) A LA PROPAGACIÓN *In Vitro* UTILIZANDO TEJIDO DE SEMILLA BOTÁNICA COMO EXPLANTE

Byron enrique Alvarado López 2004.

Objetivo del Trabajo: Evaluar la respuesta del izote pony (*Beaucarnea recurvada* R.) a la micro propagación.

El izote pony (Beaucarnea recurvada) es una especie endémica en peligro de extinción, debido a extracción y exportación en altos volúmenes. Además de esto en su reproducción se tienen problemas de baja germinación y contaminación por patógenos de las nuevas plantas.

En las plantas de pony se presenta la dificultad de obtener semilla con buen porcentaje de germinación, según productores de semilla el porcentaje de germinación esta entre 40% y 50%. Por otro lado, los productores de semilleros tienen el problema, de desconocer el origen y pureza de la semilla.

Las plantas utilizadas para la producción de pony para exportación provienen generalmente de plantas encontradas en forma silvestre o en su defecto de una reproducción asexual del material, ya sea por hijuelos o por estacas.

Explante: Semillas de izote pony.

Medio: Las concentraciones fueron elaboradas con base en las concentraciones descritas para el medio basal MS. De estas soluciones se extrajeron los volúmenes deseados para la elaboración del medio de acuerdo la concentración del regulador AG_3. Se filtró por medio de una bomba de vacío.

De igual manera se manejo para el regulador ANA.

Resultados:

A partir de la semilla pueden ser obtenidas plantas y posteriormente ser reproducidas in Vitro, esto es práctico y aceptable. Puede ser elegidos materiales adaptados a la zona de producción y obtenerse resultados altamente satisfactorios que llegan a superar a los que se producen en el campo de forma convencional.

Si hubo respuesta de l os explantes de izote pony Beaucarnea recurvada a producir brotes bajo condiciones in Vitro con la aplicación de bencilaminopurina en concentraciones de 0.25, 0.5 y 0.75mg/l y ácido giberélico en concentraciones de 0.05, 0.01 y 0.15mg/l.

Los mejores resultados obtenidos en la producción de brotes y raíces fue en las dosis de 0.5 de BAP Y 0.062 DE ANA respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cutz Tax, JA. 2004. Respuesta de tres variedades de arándano (*Vaccinium asheí)* a la propagación por cultivo de tejidos utilizando hojas y microesquejes como explantes. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 31 p.

2. García Canté, SE. 2004. Respuesta de la mora (*Rubus hadrocarpus*, forma *adenophorus* Standl. & Steyerm., f. nov.) a la micropropagación. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 40 p.

3. Gómez Culajay, JH. 2006. Producción de plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose) utilizando embriones inmaduros como explante. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 51 p.

4. Gutiérrez Barrera, J. 1996. Micropropagación *in vitro* del clon de banano (*Musa* sp.) enano Ecuatoriano (AAA). Tesis Ing. Agr. Nicaragua, UNA, Facultad de Agronomía. 86 p.

5. Hernández González, CM. 1999. Respuesta de los cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro* de yemas axilares. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 31 p.

6. Izaguirre Hernández, DE. 2000. Efecto de la bencilaminopurina (BAP) sobre la propagación *in vitro* de tres clones de banano (*Musa acuminata* Colla). Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 20 p.

7. Kyte, L; Kleyn, J. 1996. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. Oregon, US, Timber Press. 240 p.

8. Monzón Ostorga, JD. 2005. Propagación *in vitro* de pinabete (*Abies guatemalensis* rehder.) por medio de la multiplicación de ápices de brote. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 85 p.

9. Ortega Orellana, EA. 2001. Prueba preliminar de propagación *in vitro* de shate, *Chamaedorea elegans* Matrius, mediante embriones cigóticos. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 19 p.

10. Reinert, J; Yeoman, MM. 1982. Plant cell and tissue culture: a laboratory manual. Berlin, Springer-Verlag. 83 p.

11. Roca Canet, CE. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explante de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *i vitro*. Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 48 p.

12. Villacinda Maldonado, RW. 1994. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurolaena lobata* L.) a la propagación *in vitro.* Diagnostico EPSA. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 37 p.

3.2.2 Apoyo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos sirviendo como facilitador para la realización de las diferentes prácticas y mantenimiento del laboratorio

3.2.2.1 Actividad

Se estuvieron dando algunos laboratorios tanto a los estudiantes de la Facultad de Agronomía, como también a los estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Además se colaboro con mantener ciertas especies vegetales como papa, tomate, aguacate, así como ornamentales entre las que podemos destacar anturios, orquídeas, crisantemos entre otras.

3.2.2.2 Objetivo

Servir como facilitador en las diferentes practicas de laboratorio, así como en el mantenimiento y atención a las diferentes entidades que lo visiten.

3.2.2.3 Meta

La satisfacción de los estudiantes y los docentes para el buen desenvolvimiento de los laboratorios y del laboratorio.

3.2.2.4 Metodología

Se planificó para mantener en optimas condiciones el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, con la colaboración del Ing. Agr. Mack Milan Cruz, así mismo se desarrollaron algunas actividades entre las cuales podemos mencionar impartir algunos laboratorios, y recibimiento de estudiantes de otros departamentos.

3.2.2.5 Resultados

Figura 35 Impartición del Curso de Biotecnología

Figura 36 Colaboracion con estudiantes de la Facultad deFarmacia

Figura 37 Equipo de Trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales