

Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Laboratorio de Fitobiotecnología

**Regeneración *in vitro*, a partir del cultivo de meristemas, de papa andina
(*Solanum tuberosum* L.) cultivar Plancheta**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo especial de grado para optar por el título de

Licenciada en Biología

Br. Mayelin Lacruz

Tutor: MSc. Carle Valecillos

Octubre de 2019

Mérida -Venezuela

Reconocimiento-No comercial- Compartir igual

Dedicatoria

A mis padres

Y

Mi hermana

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

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

A mis padres, por haberme motivado a conseguir mis objetivos profesionales y motivarme a culminar mis estudios, gracias por el apoyo.

A mi hermana, por ser motivo de inspiración, por brindarle alegría a mi vida y motivarme para ser un buen ejemplo.

A la ilustre Universidad de Los Andes, quien se convirtió en mi casa de estudios y por brindarme el conocimiento que necesitaba para formarme como profesional.

A la MSc. Carle Valecillos por brindarme su conocimiento y cuestionamiento para un mejor desarrollo de esta investigación, y por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su tutoría.

Al profesor Guillermo Bianchi, por dedicar parte de su tiempo para asesorarme con la culminación de este trabajo.

A la Sra. Auxiliadora Olivo por brindarme su apoyo incondicional, atención y disposición durante este tiempo.

Gracias a todos mis amigos, en especial a Rosa, Jesús, Erika, Marcela, Yussmery y Edwin, que hicieron que este instante de mi vida estuviera lleno de tantos logros, siempre los tendré en mi corazón.

Gracias por tanto cariño.

Resumen

Se evaluó la regeneración *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., cultivar Plancheta, a partir del cultivo de meristemas en medio basal Murashige y Skoog, 1962 (MBMS) suplementado con diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA). Para ello, se utilizaron tubérculos con brotes, los cuales fueron sembrados en arena estéril para el desarrollo de vástagos. El material fue cortado en segmentos nodales, de los cuales se extrajo la yema apical y axilar. Éstos fueron lavados y desinfectados con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 2 %. Bajo cámara de flujo laminar y lupa se aislaron los meristemas y se sembraron en MBMS suplementado con diferentes concentraciones de BA (0,3 mg/L; 0,4 mg/L; 0,5 mg/L; 0,6 mg/L y 0,7 mg/L). Las condiciones de incubación fueron: temperatura 23°C, fotoperiodo 1200 lux, 16 h luz / 8 h oscuridad. Se observó la respuesta morfogénica de los explantes durante 87 días, midiendo la longitud (cm) de los vástagos semanalmente. La regeneración *in vitro* de vástagos se obtuvo en todos los medios MBMS + BA evaluados, siendo estadísticamente significativa la concentración 0,5 mg/L de BA, concentración sugerida para una regeneración exitosa como paso fundamental en la micropropagación de este cultivar.

Palabras clave: Regeneración *in vitro*, organogénesis, meristema, Murashige y Skoog, BA, *Solanum tuberosum* L, papa andina.

Índice

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VIII
Introducción.....	1
<i>Solanum tuberosum</i> L.....	1
Origen.....	1
Clasificación taxonómica.....	1
Descripción Botánica.....	2
Papas Andinas.....	4
Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	5
Regeneración <i>in vitro</i>	6
Factores que influyen en la regeneración <i>in vitro</i>	7
Cultivo de meristemas.....	10
El problema.....	15
Planteamiento del problema.....	15
Justificación.....	15
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Materiales.....	17
Material vegetal.....	17
Metodología.....	17
1. Siembra de tubérculos y crecimiento de vástagos del cultivar Plancheta.....	17
2. Medio de cultivo.....	18
3. Aislamiento y establecimiento de meristemas.....	20
4. Variables a evaluar.....	22
5. Análisis estadístico.....	23
6. Micropropagación de vástagos regenerados a partir del cultivo de meristemas.....	23
Resultados.....	24

Regeneración de Vástagos a partir del cultivo de meristemas.....	24
Efecto de la citoquinina 6-Benciladenina (BA) en la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas	29
Formación de raíces adventicias.....	35
Oxidación de explantes cultivados.....	35
Porcentaje de contaminación durante el ensayo.....	36
Otras respuestas en vástagos regenerados a partir de meristemas.....	37
Micropropagación de segmentos nodales.....	38
Discusión.....	39
Conclusiones.....	50
Recomendaciones.....	51
Bibliografía.....	52
Anexos.....	66

www.bdigital.ula.ve

Índice de figuras

Figura 1. La planta de papa y sus partes.....	3
Figura 2. Morfología del tubérculo de papa.....	4
Figura 3. Esquema de regeneración <i>in vitro</i> por diferentes vías organogénicas (directa e indirecta).....	6
Figura 4. Componentes básicos del medio de cultivo Murashige y Skoog (MBMS).....	8
Figura 5. Meristema en una dicotiledónea.....	11
Figura 6. Esquema de las zonas localizadas en un meristema.....	12
Figura 7. Capas de células en el meristema apical de una planta.....	12
Figura 8. Tubérculos del cultivar Plancheta.....	17
Figura 9. Vástagos entre 20-30 cm del cultivar Plancheta en cuarto de crecimiento bajo condiciones físicas controladas (25±1)°C a los 14 días de sembrados.....	18
Figura 10. Lupa marca ZEISS Stemi 2000-C.....	20
Figura 11. Desinfección del material vegetal en cámara de flujo laminar.....	21
Figura 12. Establecimiento de meristema en MBMS suplementado con diferentes concentraciones de BA.....	22
Figura 13. Evaluación de plantas regeneradas.....	22
Figura 14. Segmentos nodales de papa.....	23
Figura 15. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en el grupo control durante 87 días de cultivo.....	25
Figura 16. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,3 mg/L de BA (Tratamiento 1) durante 87 días de cultivo.....	25
Figura 17. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,4 mg/L de BA (Tratamiento 2) durante 87 días de cultivo.....	26
Figura 18. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,5 mg/L de BA (Tratamiento 3) durante 87 días de cultivo.....	27
Figura 19. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,6 mg/L de BA (Tratamiento 4) durante 87 días de cultivo.....	27
Figura 20. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,7 mg/L de BA (Tratamiento 5) durante 87 días de cultivo.....	28
Figura 21. Comparación de longitud en cm y respuesta de regeneración <i>in vitro</i> entre los diferentes tratamientos evaluados transcurridos 60 días de cultivo.....	29

Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de BA en la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas de <i>S. tuberosum</i> L., cultivar Plancheta	32
Figura 23. Raíces adventicias en los diferentes tratamientos.....	35
Figura 24. Meristemas de <i>S. tuberosum</i> L. cultivar Plancheta sembrados en MBMS con respuesta de oxidación.....	36
Figura 25. Contaminación por hongos en medio de cultivo con primordio de vástago.....	36
Figura 26. Hojas cloróticas en vástagos regenerados.....	37
Figura 27. Micropropagación a partir de segmentos nodales que se regeneraron de meristemas de <i>S. tuberosum</i> L., cultivar Plancheta.....	38
Figura 28. Curva sigmoidea de crecimiento vegetal ideal.....	45

Índice de tablas

Tabla 1. Composición básica del medio Murashige y Skoog, 1962, MBMS.....	18
Tabla 2. Tratamientos evaluados para el establecimiento de los meristemas de <i>S. tuberosum</i> L. cultivar Plancheta.....	19
Tabla 3. Longitud (cm) de los vástagos regenerados <i>in vitro</i> al cabo de 60 días de cultivo para los diferentes tratamientos.....	30
Tabla 4. Longitud (cm) de los vástagos regenerados <i>in vitro</i> al cabo de 87 días de cultivo para los diferentes tratamientos.....	31
Tabla 5. Subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de medidas repetidas.....	34
Tabla 6. Número de explantes oxidados en los diferentes tratamientos aplicados a los meristemas de <i>S. tuberosum</i> L. cultivar Plancheta.....	35
Tabla 7. Porcentaje de contaminación durante la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas en los diferentes tratamientos evaluados.....	37
Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA).....	66

Introducción

La Papa, *Solanum tuberosum* L.

Origen

La papa, es una planta originaria de América del Sur, y es posible encontrarla a través de gran parte del territorio Suramericano. El centro de origen de la papa se ubica entre Perú y Bolivia en los alrededores del lago Titicaca, entre los 1200 – 1000 A.C. (Morales, 2007), de donde se extendió a Chile, Argentina, Ecuador, Colombia y Venezuela (Rodríguez, 2010). Fue domesticada hace 7000 años por los habitantes de la región Andina que la usaban en su dieta diaria como fuente de carbohidratos, los españoles la llevaron a Europa como una curiosidad botánica y con el paso del tiempo se volvió popular en todo el mundo (Morales, 2007).

Aún persisten muchas preguntas sin resolver en relación con cuándo, dónde, cómo, por qué y cuántas veces ocurrió su domesticación; cuáles fueron sus progenitores silvestres, cómo y cuándo se diferenciaron de ellos, y cuáles fueron los procesos selectivos asociados al desarrollo de los cultivares modernos (Spooner *et al.*, 2007). Sin embargo, de acuerdo a un rastreo genético realizado por el botánico Spooner (2005), la papa es oriunda de Perú, él identificó a un ancestro con origen único en el sur del Perú. De ese modo, todas las variedades de papa cultivadas actualmente se remontan a esa única fuente (Morales, 2007).

Clasificación taxonómica

El término “Papa”, hace referencia a aquellas plantas pertenecientes al género *Solanum* (Van den Berg y Groendijk, 2014) y se encuentra dentro de la sección *Petota* (Ovchinnikova *et al.*, 2011), la cual cuenta según Spooner *et al.*, (2007) y Rodríguez, (2010) con aproximadamente 104 especies, de las cuales 100 son silvestres y cuatro cultivadas, estas últimas son:

- *Solanum ajanhuiri* Juz. *et* Bukasov: Cultivada en Perú y Bolivia Central, diploide.
- *Solanum juzepczukii* Buk.: Cultivada en Perú y Bolivia Central, triploide.
- *Solanum curtilobum* Juz. *et* Bukasov: Cultivada del norte de Perú a Bolivia Central y Argentina, pentaploide.

- *Solanum tuberosum* L.: Cultivada desde el occidente de Venezuela hasta Argentina, en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y en las tierras bajas de Chile (Rodríguez, 2010); y se divide en dos grupos: Grupo Andigenum de genotipos andinos de tierras altas que contienen diploides, triploides y tetraploides, y el Grupo Chilotanum de variedades locales tetraploides de tierras bajas (Spooner *et al.*, 2007).

La clasificación taxonómica actualmente presentada para *S. tuberosum* L. de acuerdo al Centro Nacional para la Bioinformática (NCBI, por sus siglas en inglés), corresponde a:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Subgénero: *Potatoe*

Sección: *Petota*

Especie: *Solanum tuberosum* L.

Descripción Botánica

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una planta herbácea, perenne de tallo erecto que alcanza hasta 1 metro de altura (Moreno, 2012). La planta (figura 1) posee un tallo aéreo y tallos subterráneos, el primero lo compone el vástago, mientras que los subterráneos son los estolones que posteriormente desarrollarán los tubérculos o tallos de almacenamiento (Rodríguez, 2010). Posee un sistema radical fibroso, originado a partir de los primordios radicales de los brotes que emergen del tubérculo madre (Morales, 2007). Las hojas son compuestas, alternas e insertas a los nudos del tallo en disposición espiral; las flores son bisexuales con cáliz, corola, androceo y gineceo, que en conjunto forman una inflorescencia cimosa (Rodríguez, 2010), el color de la flor puede ser blanco, lila, morado e incluso violeta, presentando distintas intensidades según la variedad. Los frutos son bayas con numerosas semillas, y los tubérculos son tallos modificados que constituyen los principales órganos de almacenamiento (Zepeda y Menjvar, 2016).

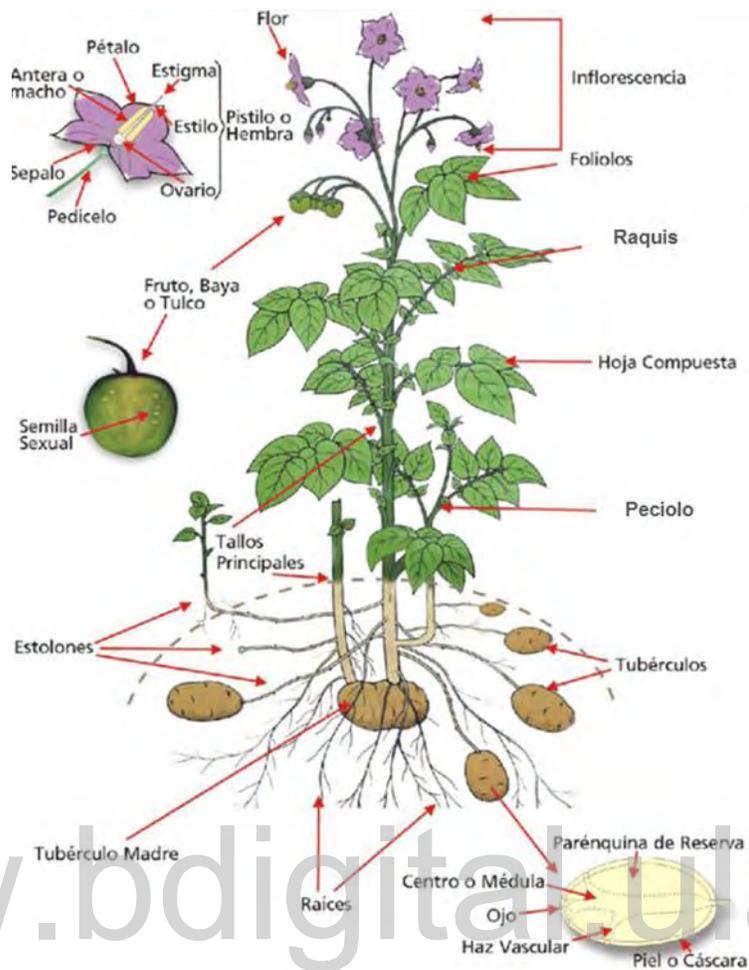


Figura 1. La planta de papa y sus partes.

Imagen adaptada de Huarte y Capezio (2011).

Generalmente se le llama tubérculo-semilla al tubérculo seleccionado o destinado para la siembra directa en campo, llamado reproducción asexual o vegetativa; pero la semilla sexual es formada en la baya (Huarte y Capezio, 2011). Por esto, se dice que la reproducción de la papa puede ser sexual y asexual, la primera se da a partir de la semilla que se encuentra en las bayas, mientras que la segunda se da a partir del tubérculo-semilla. Las ventajas que provee tener ambos tipos de reproducción es que la reproducción sexual permite el aumento de la variabilidad dentro de la población, mientras que la reproducción asexual permite la rápida multiplicación de genotipos adaptados al ambiente y estabilidad genética (Hawkes, 1958; Purves *et al.*, 2002).

Los tubérculos (figura 2) pueden presentar una forma alargada o redondeada y el color puede ser blanco, amarillo, violeta, rojizo, entre otros dependiendo de la variedad. El tubérculo tiene dos extremos: el basal, ligado al estolón, llamado talón, y el extremo opuesto que se llama extremo apical o distal. Los ojos del tubérculo que corresponden a los nudos de los tallos, son pequeños puntos huecos que se distribuyen sobre la superficie del tubérculo siguiendo una espiral y se concentran hacia el extremo apical (Moreno, 2012).

De acuerdo con Moreno (2012), morfológicamente los tubérculos presentan “ojos y cejas”, las cejas representan las hojas, y los ojos representan las yemas axilares, (figura 2). El número de ojos de un tubérculo varía dependiendo de la variedad, tamaño del tubérculo y condiciones de crecimiento (Moreno, 2012). Las características físicas como la forma y el color de las diferentes variedades de papa, están directamente relacionadas con los aspectos de producción y rendimiento (Lizarazo *et al.*, 2015).

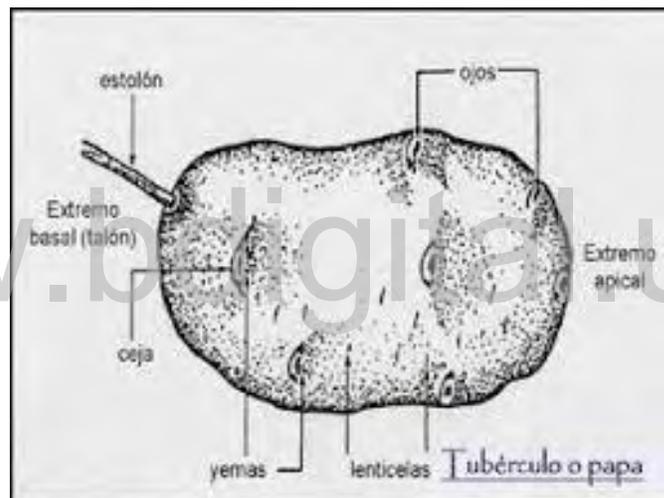


Figura 2. Morfología del tubérculo de papa.

Adaptado de:

http://papasantiguasdecanarias.org/variedades_sistematica.php

Papas Andinas

Las papas nativas o andinas originarias de los Andes son producto de la domesticación, selección y conservación realizada por nuestros antepasados, debido a la resistencia a plagas y enfermedades, así como tolerancia a factores abióticos como heladas (Moreno, 2012). En Los Andes venezolanos, las papas andinas, llamadas también “papas negras o papas de año” fueron desplazadas por la llamada “papa blanca” o papa mejorada, las cuales son el resultado de programas de

mejoramiento del rubro, lo que derivó en una pérdida de la diversidad del cultivo en esta zona (Romero, 2003). En el estado Mérida, los productores de papa siembran principalmente las variedades mejoradas y en menor proporción las variedades andinas (Romero, 2007), debido en parte al desconocimiento de su existencia y largos periodos productivos (Monteros *et al.*, 2010). En la zona andina venezolana existen diferentes variedades de papa andina, entre las principales se encuentran la Arbolona negra, rosada y Plancheta; Plancheta es una variedad de papa andina cultivada por algunos productores en Mucuchíes-Estado Mérida.

A causa del desplazamiento y del desconocimiento por parte de algunos productores y consumidores, algunas variedades andinas están en peligro de extinción mientras que otras ya definitivamente se han perdido (Cuesta *et al.*, 2010), lo que ha traído como consecuencia que no se aproveche el potencial que posee este germoplasma andino para la mejora del cultivo mediante genes de resistencia a enfermedades, programas de mejoramiento, propiedades nutritivas (contenido de minerales y proteínas) y características culinarias (Huamán, 1986; Van den Berg y Groendijk, 2014; Machida-Hirano, 2015).

Afortunadamente para el mantenimiento y la conservación de germoplasma se ha empleado la biotecnología vegetal mediante las técnicas de cultivos *in vitro* las cuales permiten propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en un corto tiempo, conservando su potencial genético y calidad sanitaria y multiplicando material vegetal como mecanismo de seguridad para especies en peligro de extinción (Alcántara *et al.*, 2017).

Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos, es un conjunto de técnicas, que consisten esencialmente en aislar una porción de la planta llamada explante y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991). El cultivo de tejidos aplica el principio de la totipotencia celular descrito por Haberlandt en 1902, para regenerar plantas a partir de células aisladas no diferenciadas, órganos u otros tejidos vegetales, recurriendo a la capacidad de éstos para desdiferenciarse, diferenciarse y rediferenciarse nuevamente hasta regenerar una planta entera (Diazgranados y Chaparro (2007).

El cultivo *in vitro* incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar material vegetal en condiciones controladas y asépticas (Abdelnour *et al.*, 2006), entre estas técnicas se

encuentran principalmente, la propagación, la embriogénesis somática, la organogénesis, el cultivo de anteras y el cultivo de meristemas, las cuales pueden ser utilizadas para llevar a cabo el cultivo de diferentes partes de la planta para regenerar y propagar una planta completa (Alcántara *et al.*, 2017).

Regeneración *in vitro*

El cultivo de tejido *in vitro*, engloba un grupo de técnicas mediante las cuales un explante (fragmento de órgano separado de un organismo vegetal) se cultiva en un medio de composición definida y bajo condiciones de incubación controladas (García, 2013). En la regeneración *in vitro* es de gran importancia la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta y la formación de raíces o brotes adventicios en los explantes cultivados *in vitro*; ésto puede ocurrir en forma directa (a partir de células, tejidos u órganos) o de forma indirecta a partir de callo (Pérez *et al.*, 2008) (figura 6). La regeneración de plantas a partir de células diferenciadas cultivadas *in vitro*, es una clara demostración de la plasticidad de las células vegetales en respuesta a señales ambientales específicas; donde las células adquieren competencias para cambiar el destino que llevan mediante el proceso de dediferenciación seguido por la aplicación de una nueva vía de desarrollo (Gamarra, 2014).



Figura 3. Esquema de regeneración *in vitro* por diferentes vías organogénicas (directa e indirecta).

Adaptado de Ureta (2014).

Además, Pérez y Gómez en 2012, enfatizan que dentro de las ventajas y usos complementarios asociados con la regeneración *in vitro* de plantas, además de la posibilidad de la producción clonal masiva de plantas, encontramos la posibilidad de: incrementar la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma. Y según Torres *et al.*, (2016), es necesario establecer un sistema eficiente de regeneración para poder aplicar biotecnologías dirigidas a células y obtener plantas adultas a partir de las mismas.

Factores que influyen en la regeneración *in vitro*

La regeneración *in vitro* de plantas se ve influenciada por diversos factores, entre los principales se encuentran: material vegetal, medio de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones físicas y químicas, tales como: luz, temperatura y pH (Gamarra, 2014).

Material Vegetal

La selección de un explante adecuado es el primer paso para el establecimiento de cultivos *in vitro*, esta elección se hace en base al objetivo a estudiar y la especie vegetal involucrada (Roca y Mroginski, 1991). El tamaño del explante puede determinar la respuesta *in vitro* (Yildiz, 2012), los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja además de que son dañados fácilmente (Gamarra, 2014).

Medio de cultivo

Existen diversos medios de cultivo, algunos específicos para un tipo de tejido o especie vegetal y otros de manera generalizada (García, 2013); el medio de cultivo más comúnmente utilizado para el cultivo de tejidos vegetales es el medio basal Murashige y Skoog (MBMS) propuesto por los mismos autores en 1962 (Murashige y Skoog, 1962).

Como bien afirma Gamarra (2014), los medios de cultivo usados para el cultivo *in vitro* de plantas están compuestos por 5 componentes básicos: elementos esenciales o iones minerales, suplementados como una mezcla compleja de sales; suplementos orgánicos, suplementados con vitaminas y/o aminoácidos; una fuente fija de carbono, usualmente un azúcar; agente gelificante y fitorreguladores, como se muestra en la figura 4. Los suplementos orgánicos lo constituyen los macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio y azufre) y los micronutrientes (yodo,

cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro y zinc), los primeros son aquellos elementos que las plantas requieren en grandes cantidades y los últimos, se requieren en menor cantidad para el crecimiento y desarrollo de la planta (Smith, 2012).



Figura 4. Componentes básicos del medio de cultivo Murashige y Skoog (MBMS).

Adaptado de Morales *et al.*, (2016).

Suplementos orgánicos como las vitaminas y los aminoácidos, son esenciales para el crecimiento y funcionamiento de las plantas en el cultivo *in vitro*, proveen una fuente para la reducción de nitrógeno e iones de amonio, disminuyendo la acidificación de los medios. Las plantas cultivadas *in vitro* no son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, la sacarosa es el azúcar que más se utiliza, debido a que es económica, se encuentra fácil, es asimilable y relativamente estable (Roca y Mroginski, 1991; Gamarra, 2014).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y tejidos en medios de cultivo *in vitro*; las auxinas, las citoquininas, las giberelinas y el etileno, entre otros son de gran importancia en cultivos *in vitro*; sin embargo, el tipo de regulador y la concentración dependerán principalmente de la especie, el tejido u órgano a ensayar y el objetivo del experimento (Abobkar *et al.*, 2012)

➤ Auxinas

Es un grupo de reguladores caracterizado por estimular la elongación de las células, las auxinas regulan una gran cantidad de funciones fisiológicas, como: mitosis (cariocinesis), alargamiento celular, formación de raíces adventicias, dominancia apical, gravitropismo, abscisión, diferenciación de xilema y regeneración de tejido vascular en tejidos dañados (Lallana y Lallana, 2004). Esta hormona se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo (Guevara, 2004). El ácido indolacético, AIA es la auxina natural más importante, se sintetiza en meristemas, hojas jóvenes, frutas y semillas en desarrollo (Taíz y Zeiger, 2003), sin embargo existen auxinas sintéticas como el ácido Naftalenacético, ANA; ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2, 4- D; entre otras (Gamarrá, 2014).

➤ Citoquininas

Las citoquininas fueron descubiertas en la búsqueda de factores que estimularan a las células vegetales a dividirse (Taíz y Zeiger, 2003). Estas hormonas vegetales, están encargadas de procesos de división celular que incluyen formación de brotes axilares y diferenciación celular (Gamarrá, 2014), además de una gran variedad de procesos fisiológicos de la planta como: retardar senescencia de hojas y movilización de nutrientes, entre otros (Taíz y Zeiger, 2003). Según el origen se pueden distinguir dos tipos de citoquininas: naturales (Zeatina e isopentiladenina) y sintéticas (Benciladenina y Kinetina) (Jordán y Casaretto, 2006). Gamarrá (2014), sugiere que la Benciladenina (BA) es una citoquinina sintética de primera generación, encargada del crecimiento de las plantas y las respuestas de desarrollo, el establecimiento de flores y estimulación de la generación de frutos a través de la estimulación de la división celular; y la aplicación de citoquininas, estimula la progresión del ciclo celular en primer lugar, a nivel de la fase G1, las citoquininas más otras hormonas (auxinas), inducen la acumulación de ciclinas, y por tanto, promueven un nuevo ciclo celular (Smith y Atkins, 2002). Las citoquininas, también estimularán la entrada a la fase M, probablemente por activación de una fosfatasa (Jordán y Casaretto, 2006).

➤ Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Guevara, 2004). La síntesis de GAs ocurre en varios lugares, sin considerar la situación específica en semillas de cereales. En plántulas, la síntesis y presencia de altos contenidos de estas hormonas se detecta

en hojas y yemas en activo crecimiento y en material adulto a nivel de frutos, y en menor medida en raíces (Jordán y Casaretto, 2006). Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis, aunque generalmente inhiben la diferenciación algunas veces estimulan la formación de yemas y en un medio basal se puede lograr la elongación de hojas y entrenudos (Roca y Mroginski, 1991).

➤ Etileno

El etileno, es una hormona gaseosa producida por todos los órganos de la planta, y es sintetizada por las flores en su proceso de maduración. El etileno en la atmósfera puede originarse de fuentes naturales como plantas, de emanaciones de fruta, hortalizas y microorganismos, o puede derivarse de instalaciones industriales así como de la combustión de gasolina, propano, entre otros (Verdugo *et al.*, 2003). Es la molécula más simple y sus efectos en las plantas se desencadenan a bajas concentraciones, afectando todas las etapas del desarrollo; desde la germinación de las semillas hasta la maduración de los órganos y su senescencia, y estimula la expresión de genes que codifican las enzimas relacionadas con los cambios durante la maduración y/o senescencia (Saldívar, 2017).

Condiciones físicas y químicas del cultivo de tejidos vegetales

La luz, la temperatura y el pH son factores que afectan el crecimiento adecuado en los cultivos *in vitro* (Gamarra, 2014); la luz es esencial para la morfogénesis involucrando factores como intensidad, fotoperiodo y calidad (García, 2013). El pH del medio es importante ya que regula un amplio rango de reacciones bioquímicas que ocurren en el cultivo de tejidos, e indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia (Gamarra, 2014), determinando varias características en la estructura y actividad de las biomoléculas y, por tanto, del comportamiento de células y organismos. Y finalmente la temperatura es un factor que podría variar de acuerdo a la especie cultivada (García, 2013).

Cultivo de meristemas

Los meristemas (figura 5) son un grupo de células en división activa que forman tejido nuevo y se encuentran en las partes terminales de las raíces, tallos y en las yemas axilares de las plantas (Fontúrbel *et al.*, 2007), el término meristema proviene del griego *merizo* que significa dividir, e indica la actividad característica de las células del meristema (Roth, 1976). De acuerdo con Abdelnour *et al.*,

(2006), los meristemas son grupos de células responsables del crecimiento permanente de las plantas debido a que tienen una alta capacidad de división celular y posterior diferenciación.

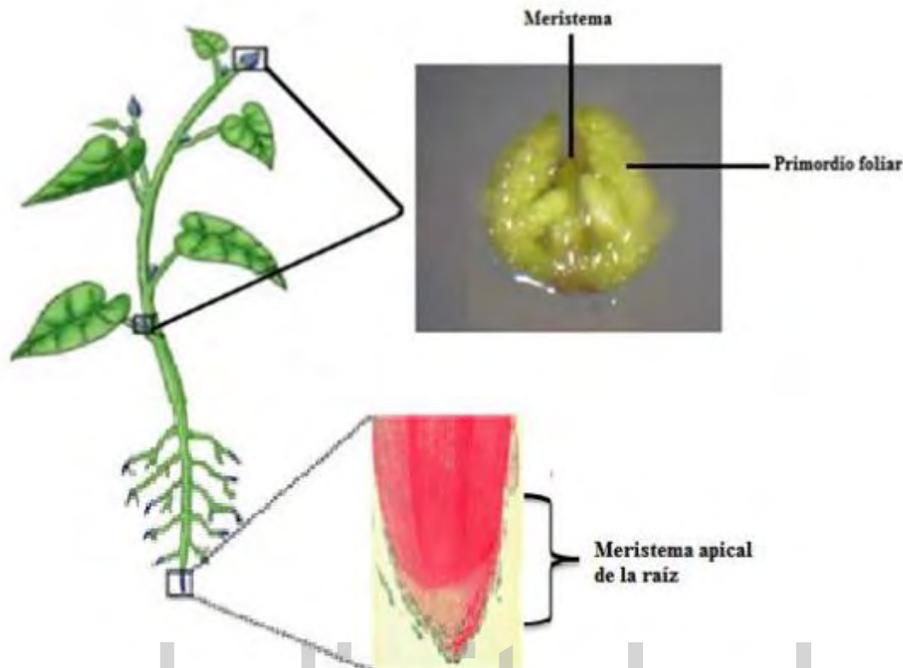


Figura 5. Meristema en una dicotiledónea.

Adaptado de <https://es.slideshare.net/VidalBanez/byg-1bach-uni9-tejidos-y-rganos-vegetales>,
modificado por Lacruz, 2018

Se han utilizado dos conceptos diferentes para definir las zonas y capas del meristema, Medford (1992), indica que el meristema se divide en tres regiones o zonas, de acuerdo con análisis histológicos definidas por las densidades citoplasmáticas y las tasas de división celular (figura 6):

- Zona Central (ZC): ubicada en el extremo distal del domo meristemático, presenta células vacuoladas y núcleos prominentes, ocurren menos divisiones celulares que el resto.
- Zona Periférica (ZP): rodea a la zona central, presenta índices más elevados de división celular, su función principal es la formación de órganos laterales.
- Zona medular (ZM): Situada en la base del meristema, las células que origina son la parte central del tallo y los tejidos vasculares.

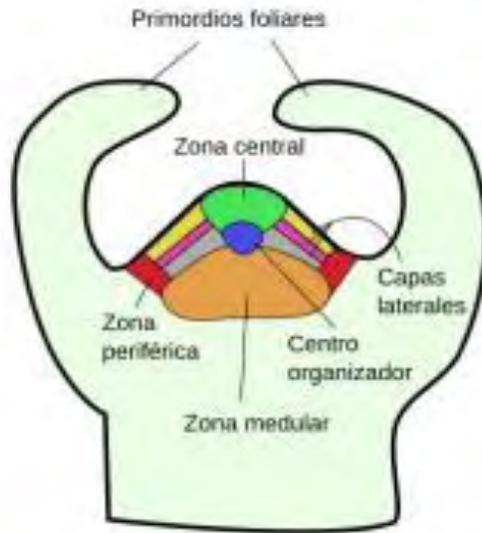


Figura 6. Esquema de las zonas localizadas en un meristema.

Adaptada de Megías *et al*, 2017

Mientras, Bowman y Eshed (2000), han sugerido que el meristema se divide en capas de células distintas entre sí, llamadas o definidas como L1, L2 y L3 (figura 7); la capa L1 de células es la más externa, y las divisiones celulares en esta capa están restringidas al plano anticlinal (perpendicular a la superficie), esta capa forma la epidermis en partes diferenciadas del brote. Las células en la segunda capa o L2 se dividen predominantemente en el plano anticlinal, pero cuando se forman los órganos se dividen en el plano periclinal (paralelo a la superficie). Las células en la tercera capa de la superficie o L3, se dividen en los planos anticlinal y periclinal y proporcionan células para la porción interior de los órganos y los tallos.

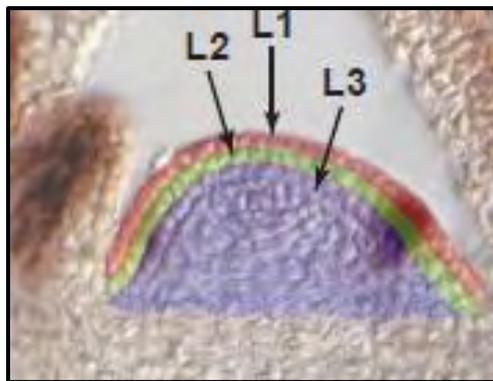


Figura 7. Capas de células en el meristema apical de una planta.

Adaptado de Bowman y Eshed, 2000.

En la regeneración de plantas *in vitro*, el cultivo de meristemas es una técnica ampliamente utilizada, ésta consiste en la disección e incubación del meristema apical y/o axilar de una planta en condiciones asépticas (García *et al.*, 2001). De acuerdo con Fontúrbel *et al.* (2007), se denomina “cultivo de meristemas” al conjunto formado por el meristema más la región adyacente que incluye a uno o dos primordios foliares; y la dificultad de esta técnica, dependerá del método que se emplee durante la extracción del meristema, ya que es la parte más importante a la hora de realizar dicho procedimiento (Alcántara *et al.*, 2017).

El cultivo de meristemas tiene numerosas aplicaciones, como la regeneración de plantas y la obtención de plantas libres de patógenos en un alto porcentaje (90-95%), ya que esta zona de tejido generalmente no es afectada por patógenos vegetales (Patti, 2013) y como bien afirma Lizárraga *et al.* (1991), se desconoce la razón exacta por lo que esto sucede, sin embargo, se cree que uno o todos de los siguientes factores son responsables de ello: 1. Alta actividad metabólica en las células meristemáticas: los virus no pueden tomar el control de la maquinaria biosintética del mismo. 2. Carencia de tejido vascular: los virus se diseminan a través del sistema vascular. 3. Alta concentración de auxinas: pueden inhibir la multiplicación de los virus.

Esposito *et al.*, (1986) indica que los meristemas son el material de partida ideal debido a que tienen dos características favorables: el meristema aislado se desarrolla en cultivo en una forma genéticamente estable (este no es el caso, por ejemplo, de los cultivos de callos que muestran grandes irregularidades genéticas) y reduce el nivel de infección viral en el tejido. Es por esto que se han generado varias inquietudes que han orientado al surgimiento de diversas investigaciones, tales como:

- Badoni y Chauhan en 2009, estudiaron el efecto de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de meristema apical y multiplicación *in vitro* de papa, cultivar Kufri Himalini. Cultivaron meristemas apicales en diferentes concentraciones de hormonas (Giberelinas, auxinas y citoquininas), después de transcurridos 40 días de cultivo, se midió la altura del brote, la longitud de raíz y el peso fresco del brote/raíz. El resultado mostró que una concentración de 0,01 mg/L de ANA (auxina) con 0,25 mg/L de GA3 (ácido giberélico) fue la mejor combinación hormonal para el desarrollo de plántulas completas y su propagación.
- Yasmin *et al.* en 2011, evaluaron el efecto de 4 diferentes reguladores de crecimiento en 2 combinaciones en el medio de cultivo de meristemas apicales de dos variedades de papa (Desiree y Patrones), la primera combinación fue bencilaminopurina (BA) con ácido naftalenacético (ANA) y la segunda combinación fue ácido giberélico (GA3) con ácido pantoténico. La mejor regeneración se obtuvo cuando el medio MS se suplementó con 1mg/L

de ácido pantoténico más 0,5 mg de GA3, presentando también menor tiempo para la regeneración de múltiples brotes y raíces de la variedad Desiree específicamente.

- Ebad *et al.* (2015), cultivaron meristemas apicales de *S. tuberosum* de 4 cultivares, Lady Rosetta, Jaerla, Cara y Hermis en medio MS sin reguladores de crecimiento. Los resultados mostraron que el medio MS con vitaminas se puede usar para la propagación masiva de plantas libres de patógenos bajo condiciones de cultivo optimizadas.

Desafortunadamente, en Venezuela, se han realizado pocos estudios empleando la técnica de cultivo *in vitro* de meristemas y más aún en papa andina, sin embargo, se ha hecho uso de otras técnicas de cultivos *in vitro*, como la micropropagación con segmentos nodales para investigaciones sobre la propagación *in vitro* de la papa.

Entre los pocos estudios que se han reportado cabe destacar a Escala y García (1981), quienes cultivaron *in vitro* meristemas apicales y laterales de *S. tuberosum* L. cultivar “Arbolona Negra” proveniente de Los Andes venezolanos, para la obtención de plantas completas libres de virus, así como para la determinación de un balance óptimo de reguladores de crecimiento que permitiera lograr el mejor desarrollo de explantes; en la investigación lograron obtener un 100% de plantas libres de contaminación viral.

Planteamiento del problema

Las papas andinas presentan diversidad de formas, colores y características agronómicas de interés como el sabor y la textura, lo que las convierte en candidatas potenciales para programas de mejoramiento genético, el rescate y la conservación de dicho germoplasma, el cual es diverso genéticamente con una alta variabilidad. Sin embargo, en Venezuela en los estados andinos (Táchira, Mérida y Trujillo), el cultivo de estas papas ha sido desplazado principalmente por cultivos mejorados, los cuales poseen ciclo de crecimiento menor a las papas andinas y con un alto rendimiento productivo lo que ha llevado a una pérdida de diversidad genética de las papas andinas venezolanas.

Por lo tanto, en esta investigación se propone que mediante el cultivo de meristemas *in vitro* de la variedad “Plancheta”, regenerar plantas con altos porcentajes de sanidad. Estos resultados permitirán incorporar el conocimiento generado a los objetivos planteados en el establecimiento de una colección de germoplasma (rescate y conservación) de papas andinas en el laboratorio de Fitobiotecnología de la Universidad de Los Andes, además de disponer de este material para futuros estudios.

Justificación

El rescate y conservación de germoplasma *in vitro* de las papas andinas venezolanas, son los primeros pasos para evitar la desaparición de dicho germoplasma y aprovechamiento del rubro en cuanto a mejoras convencionales a través de programas biotecnológicos que podrían incluir cruces convencionales, obteniendo posibles genotipos resistentes a enfermedades. Y al mismo tiempo, tener a disposición este germoplasma para investigadores, agricultores y/o empresas, mediante el cultivo de meristemas, el cual es de gran utilidad, ya que es una técnica eficiente y reproducible, que permite la obtención de altos porcentajes de plantas libres de patógenos.

Hipótesis

Si a partir del cultivo de meristemas *in vitro* en un medio basal MS suplementado con BA se pueden regenerar plantas completas, entonces se podría establecer un medio de cultivo con una concentración de BA conocida para regenerar *in vitro* plantas del cultivar Plancheta con un alto porcentaje de sanidad.

Objetivo General

Evaluar la regeneración *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., cultivar “Plancheta” a partir del cultivo de meristemas bajo diferentes concentraciones de BA..

Objetivos específicos

- Aislar meristemas de vástagos del cultivar “Plancheta”.
- Evaluar la regeneración *in vitro* mediante la longitud (cm) del vástago regenerado a partir de los meristemas.
- Establecer un medio de cultivo con concentraciones conocidas de BA (citoquinina) para la regeneración *in vitro* a partir de meristemas.
- Micropropagar el material vegetal a partir de segmentos nodales de las plantas regeneradas.

Materiales y Métodos

Materiales

Material Vegetal: Se utilizó tubérculo-semilla con brotes (yemas) de 1 o 2 cm de la papa andina venezolana, cultivar “Plancheta”, provenientes del caserío de Misintá-Mucuchíes, Municipio Rangel, Mérida-Venezuela y donadas por el señor Onías Rivera, de la granja Agroecológica “Santa Ana”.

Metodología

1. **Siembra de tubérculos y crecimiento de vástagos del cultivar Plancheta** (Comunicación personal con el Laboratorio de Fitobiotecnología, Profe Carle Valecillos):

Siembra de los tubérculos: se utilizó como sustrato arena, la cual fue lavada previamente con agua de chorro, dejándola secar en estufa a 150 °C, y luego, esterilizada 3 días consecutivos en una autoclave a 120°C a 113 libras de presión durante 1 hora. Posteriormente, en recipientes plásticos de 1 Kg con un trozo de papel absorbente en el fondo del mismo, se vertió la arena con ayuda de una espátula estéril y se sembraron los tubérculos cubriendo completamente con arena (figura 8). Los tubérculos fueron regados con agua y se fertilizaron con una solución N:P:K (18:18:18) a los 7 días de sembrados.



Figura 8. Tubérculos del cultivar “Plancheta”.

Foto: Lacruz, 2018.

Crecimiento de vástagos: Transcurridos 22 días en cuarto de crecimiento a 25 ± 1 °C, los tubérculos sembrados en la sección anterior desarrollaron vástagos entre 20 a 30 cm (figura 4), material vegetal que sirvió para la obtención de los segmentos nodales, a partir de los cuales se extrajeron los meristemas.



Figura 9. Vástagos entre 20-30 cm del cultivar “Plancheta” en cuarto de crecimiento bajo condiciones físicas controladas (25 ± 1 °C) a los 14 días de sembrados. Foto: Lacruz, 2018

2. Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo básico Murashige y Skoog (MBMS) propuesto por los mismos autores en 1962 (Tabla 1).

Tabla 1. Composición básica del medio Murashige y Skoog, 1962, MBMS.

Compuesto	mg / L	Concentración molar (M)
NITRATOS		
NH ₄ NO ₃	1650	2,06
KNO ₃	1900	1,88
SULFATOS		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	$1,5 \times 10^{-3}$
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	1×10^{-5}
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	3×10^{-5}
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	1×10^{-7}
HALUROS		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2×10^{-3}
KI	0,83	5×10^{-6}
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	2×10^{-7}
MICRONUTRIENTES		
KH ₂ PO ₄	170	1×10^{-3}

H3BO3	6,2	1×10^{-4}
Na2MoO4.2H2O	0,25	1×10^{-4}
Fe-EDTA		
FeSO4.7H2O	27,8	1×10^{-5}
Na2EDTA	37,3	1×10^{-5}
VITAMINAS		
Myo-inositol	100	5×10^{-4}
Ácido nicotínico	0,5	4×10^{-6}
Piridoxina	0,5	2×10^{-6}
Tiamina	0,1	3×10^{-7}
Glicina	2	3×10^{-5}
Sacarosa 30 gr (3%)		
Agar 8 gr (8%)		
pH 5,7-5,8		

Preparación del medio de cultivo y tratamientos a ensayar: Se prepararon previamente las soluciones “stock” o “madres” que componen el MBMS (ver tabla 1). Luego, se preparó la cantidad correspondiente de medio de cultivo para cada tratamiento con diferentes concentraciones de BA (ver tabla 2). Posteriormente, se agregó la fuente de carbono (60 g de azúcar de mesa) y se llevó a volumen (2000 ml) en un cilindro graduado. Se ajustó el pH del medio de cultivo (pHmetro marca ORION model 410A). Se añadió agente gelificante (agar) al medio de cultivo y se vertió finalmente el medio en tubos de ensayo de 15x2,5 cm con tapa previamente esterilizada, rotulando previamente cada tubo para cada tratamiento a evaluar. Los tubos con medio de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 113 libras de presión durante 20 minutos (Trigiano y Gray, 1953).

Tabla 2. Tratamientos evaluados para el establecimiento de los meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta.

Tratamiento	Composición del medio	Concentración de hormona BA (M)
Control	MBMS + 0 mg/L BA	0
1	MBMS + 0,3 mg/L BA	$1,33 \times 10^{-6}$
2	MBMS + 0,4 mg/L BA	$1,78 \times 10^{-6}$
3	MBMS + 0,5 mg/L BA	$2,22 \times 10^{-6}$
4	MBMS + 0,6 mg/L BA	$2,66 \times 10^{-6}$
5	MBMS + 0,7 mg/L BA	$3,11 \times 10^{-6}$
Se preparó un Stock de 20mg/20ml. PM BAP = 225, 25		

Las concentraciones de BA fueron fijadas de acuerdo a ensayos previos realizados en el laboratorio de Fitobiotecnología-ULA, con el cual se han obtenido resultados en la regeneración de otros cultivares de papa andina (comunicación personal con el laboratorio de Fitobiotecnología, datos no publicados).

Diseño experimental: contó con 20 réplicas independientes por tratamiento, la variable respuesta considerada para el estudio fue la longitud del vástago expresada en centímetros (cm), siendo un factor fijo la concentración del regulador de crecimiento con 5 niveles (Tabla 2). La Variable intra sujeto fue el tiempo (días en los que se efectuó la evaluación) y presentó 13 niveles, a saber: 0, 9, 16, 24, 31, 38, 45, 52, 60, 67, 74, 80 y 87 días (asesoría en la facultad de Ciencias ULA por el profesor Guillermo Bianchi).

3. Aislamiento y establecimiento de meristemas

Durante la extracción y establecimiento de los meristemas en los medios de cultivo y tratamientos a evaluar, la asepsia se mantuvo durante toda la experiencia. La cámara de flujo laminar fue previamente limpiada con una solución diluida de cloro y alcohol antes de su uso. Se utilizó agua destilada estéril (120°C, 113 libras de presión por 30 minutos). El equipo estereoscópico (lupa) utilizados para la extracción de los meristemas fue marca ZEISS Stemi 2000-C, con objetivo 10X y aumento 0,65X (figura 10).



Figura 10. Lupa marca ZEISS Stemi 2000-C. Foto: Lacruz, 2018.

Los vástagos de 20-30 cm fueron cortados en segmentos de unos 5 o 7 cm, tomando por cada vástago de 2 o 3 segmentos nodales y dejando el pecíolo con hojas y la yema apical y/o axilar, dichos segmentos fueron trasladados al cuarto de cultivo en un recipiente estéril con tapa, y bajo cámara de flujo laminar, los vástagos fueron cortados en segmentos nodales y lavados con agua destilada estéril, eliminando las hojas con ayuda de un bisturí sobre una cápsula de Petri.

Los segmentos fueron sumergidos en una solución de etanol al 70% durante 2 minutos, con agitación constante, posteriormente se lavaron 3 veces con abundante agua destilada estéril. Seguidamente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (a partir de una solución de cloro comercial 5%) más 2 gotas de tween 20 durante 7 minutos, agitando varias veces (figura 11). Se realizaron 3 lavados con abundante agua destilada estéril, para eliminar los restos de hipoclorito y a partir de estos segmentos se aislaron los meristemas (Comunicación personal con el Laboratorio de Fitobiotecnología, Profe Carle Valecillos):



Figura 11. Desinfección del material vegetal en cámara de flujo laminar. Foto: Lacruz, 2018

El aislamiento del meristema se realizó sobre una cápsula de Petri estéril y con ayuda de una pinza, que sostuvo la base del tallo, se procedió a cortar con un bisturí los primordios de vástagos exteriores cuidando no dañar el domo meristemático y sólo dejando dos primordios foliares, es decir, “desnudando” con mucho cuidado el domo meristemático. El corte se realizó perpendicular al eje del meristema, entre 0,1 y 0,2 mm aproximadamente por debajo de la superficie del domo. El explante se transfirió con ayuda de una pinza estéril al medio de cultivo previamente preparado con los diferentes tratamientos, ver figura 12.

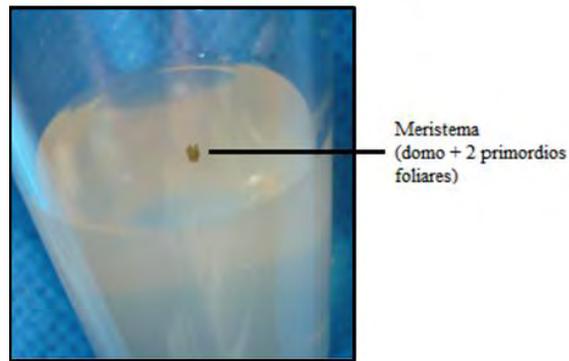


Figura 12. Establecimiento de meristema en MBMS suplementado con diferentes concentraciones de BA. Foto: Lacruz, 2018.

Las condiciones de incubación fueron: 1200 Lux, 16h luz/8h oscuridad y 23 °C.

4. Variables a evaluar:

Para evaluar la regeneración *in vitro* a partir del cultivo de los meristemas en los diferentes tratamientos planteados, se midió la longitud del vástago en centímetros (cm) de manera directa sobre el tubo de ensayo (figura 14), las medidas se tomaron desde la base del explante hasta meristema apical de las plantas regeneradas, semanalmente, durante 87 días (12 semanas). Además, se evaluó la presencia de contaminantes (hongos, levaduras y/o bacterias) en los medios de cultivo y/o explantes, mediante observación directa, también el número de explantes oxidados, esta observación está definida por el oscurecimiento del explante (marrón-café) en el medio de cultivo.

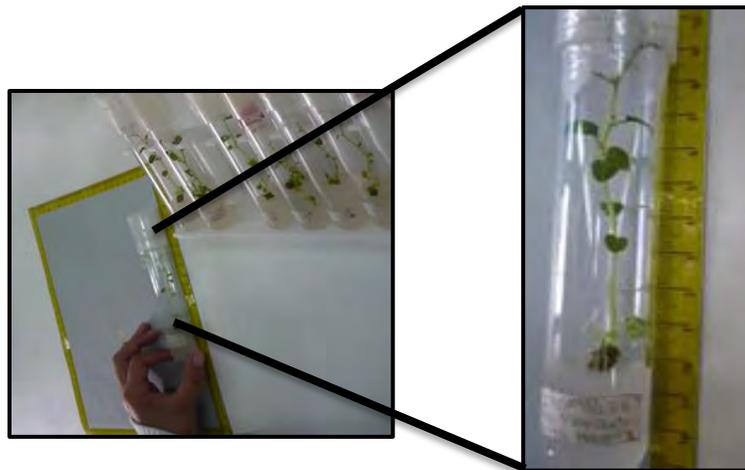


Figura 13. Evaluación de plantas regeneradas.

Foto: Lacruz, 2018

5. Análisis Estadístico

Para determinar diferencias estadísticas significativamente entre los promedios de la variable longitud del vástago (cm) obtenida en los diferentes tratamientos, se realizó la prueba de Análisis de Varianza de medidas repetidas con un factor de efecto fijo, mediante el uso del programa IBM SPSS Statistics 19 y se aplicó la prueba de Duncan.

6. Micropropagación de vástagos regenerados a partir del cultivo de meristemas

Una vez regeneradas las plantas a partir de los meristemas en los diferentes medios de cultivo se procedió a realizar la micropropagación, para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Se cultivaron segmentos nodales de los vástagos regenerados *in vitro* a partir del cultivo de meristemas, los cuales fueron cultivados en medio de propagación (MBMSO) para papa establecido en el Laboratorio de Fitobiotecnología – ULA por Vielma y Olivo, 2009 (datos no publicados). Con mucho cuidado, sobre una cápsula de Petri y bajo cámara de flujo laminar, se tomaron los vástagos y se cortaron segmentos nodales (explante). Se sembraron dos explantes por tubo para un total de 50 tubos (figura 13). Las condiciones de incubación fueron: 23°C, 16 horas luz/8 de oscuridad y se observó la regeneración durante 15 días de cultivo.



Figura 14. Segmentos nodales de papa.

Foto: Lacruz, 2018

El cultivo *in vitro* de meristemas es una técnica que ha sido utilizada con éxito desde hace muchos años en la biotecnología vegetal. Esta técnica ha permitido la colección y conservación de germoplasmas, la producción y saneamiento de una gran cantidad de plantas (Cañal *et al.*, 2001), así como, la regeneración *in vitro* de plantas completas en corto tiempo bajo condiciones físicas y químicas controladas (luz, temperatura, pH) (Valderrama *et al.*, 2011).

En la presente investigación se evaluó la regeneración *in vitro* de *S. tuberosum* L. cultivar “Plancheta” a partir del cultivo de meristemas en MBMS con diferentes concentraciones conocidas de citoquinina (BA). Los tratamientos evaluados arrojaron los siguientes resultados:

Regeneración de Vástagos a partir del cultivo de meristemas

Los meristemas aislados a partir de las yemas apicales y axilares de los vástagos de la planta de papa, mostraron una respuesta de regeneración mediante el crecimiento de vástago (longitud) a lo largo de 87 días de cultivo.

Las respuestas observadas de manera general fueron: A los 16 días de cultivo, se observó que los meristemas en todos los grupos evaluados, no presentaron cambios de coloración. Transcurridos 24 días de cultivo se observaron primordios de vástagos emergentes, luego de 38 días estas estructuras se presentaron como vástagos incipientes con primordios de hojas. Mientras que al día 60 de cultivo, los vástagos alcanzaron un desarrollo diferenciado al igual que las hojas. Finalmente, a los 87 días se observó la regeneración *in vitro* de vástagos totalmente diferenciados.

La regeneración vía organogénesis directa, estuvo caracterizada por el crecimiento longitudinal de los vástagos, con el paso de los días, no solo aumentó el tamaño, sino que además cambiaron la forma y la estructura hasta alcanzar la diferenciación de vástagos. La formación de primordios de vástagos y la diferenciación fue variable en cada uno de los tratamientos, en cuanto al tiempo de respuesta de regeneración, longitud, grosor y presencia de raíces adventicias en el vástago.

En el grupo control hubo regeneración de vástagos a partir del día 38 en el medio de cultivo. Por otra parte, los explantes tratados con BA presentaron características morfológicas en cuanto a mejores

respuestas de regeneración dependiendo de la concentración de la hormona, como el desarrollo de vástagos vigorosos con hojas de mayor tamaño (datos no mostrados) al grupo control.

A continuación, se describe la regeneración en cada tratamiento:

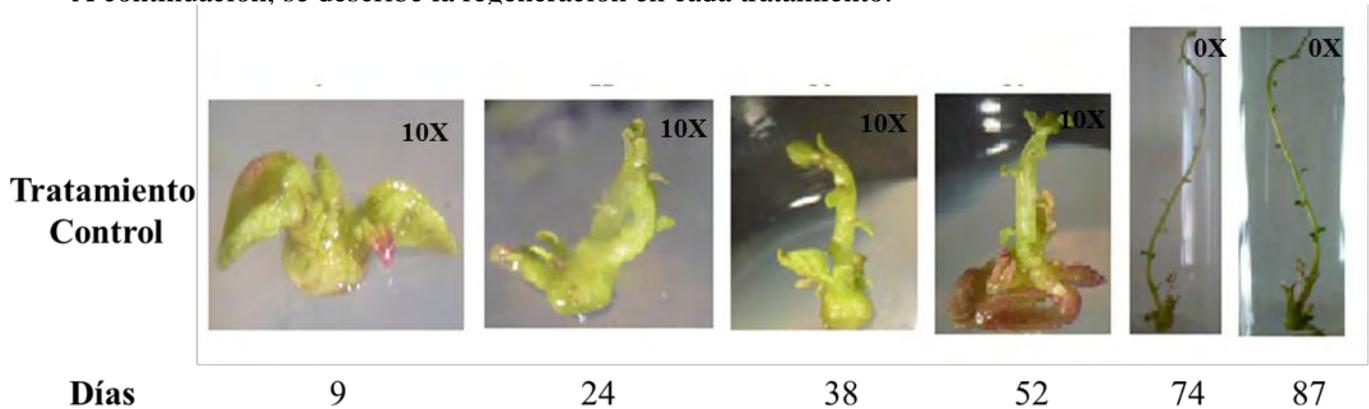


Figura 15. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en el grupo control durante 87 días de cultivo.

En la figura 15 se muestra la regeneración *in vitro* del meristema en el grupo control. A los 24 días de cultivo, el meristema inició la diferenciación morfológica de primordios de vástago. Posteriormente, a los 38 días de cultivo, se observó vástagos bien diferenciados y finalmente a partir de los 74 días el crecimiento del vástago. El tejido basal de los meristemas a los 52 días de cultivo se tornó de color café-marrón (ver figura 15). Los vástagos diferenciados presentaron crecimiento de raíces adventicias y un gran número de nudos en los vástagos con una corta distancia entre estos (datos no registrados).

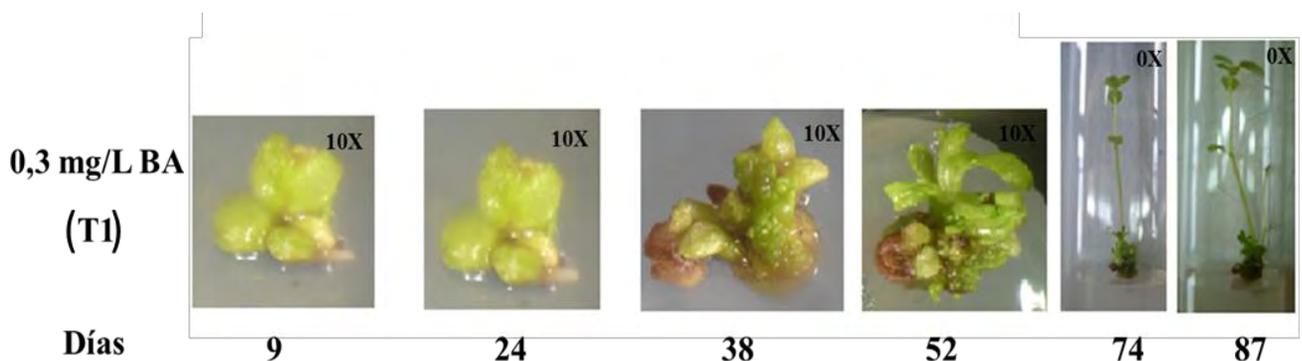


Figura 16. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,3 mg/L de BA (Tratamiento 1) durante 87 días de cultivo.

El tratamiento 1 (T1), correspondiente a MBMS + 0,3 mg/L BA (figura 16), mostró una respuesta de regeneración diferente al control. A los 24 días de cultivo, el explante no cambio de forma y color, transcurridos los 38 días hubo un cambio de forma y oscurecimiento en el meristema, pero sin estructuras diferenciadas aparentes. En el día 52, se observó la diferenciación de primordios de vástagos y múltiples brotes sobre la base del explante cultivado, mientras que a los 74 días se pudo apreciar la diferenciación de vástagos, cuyo grosor fue mayor que el grupo control y el número de nudos fue menor con una larga distancia entre estos (datos no registrados). En este tratamiento no se desarrollaron raíces adventicias.

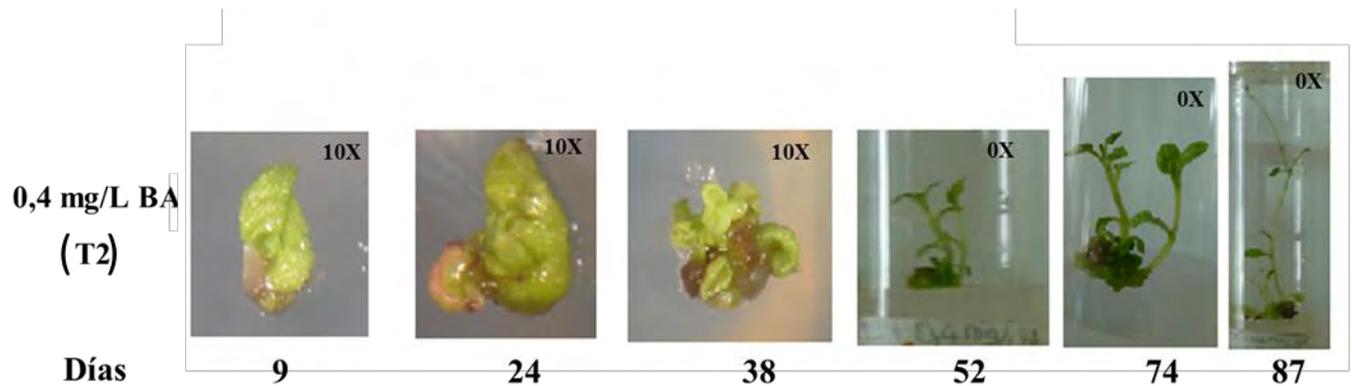


Figura 17. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,4 mg/L de BA (Tratamiento 2) durante 87 días de cultivo.

Los meristemas cultivados en el T2, mostraron un cambio de forma y primordios de vástagos sobre la base del explante a los 38 días. Pasados 52 días, se observó en 3 de los 20 meristemas cultivados la formación de 2 vástagos de menor tamaño con primordios de hojas, a diferencia del control, en el cual solo se desarrolló un vástago por explante. A los 87 días la diferenciación de vástagos en aquellos explantes donde hubo desarrollo de 2 vástagos, uno de ellos presentó mayor longitud (> 2 cm) que el otro (ver figura 17). Los vástagos eran de mayor grosor que el grupo control, así como el número de nudos fue menor con una larga distancia entre estos (datos no registrados). En este tratamiento no se desarrollaron raíces adventicias.

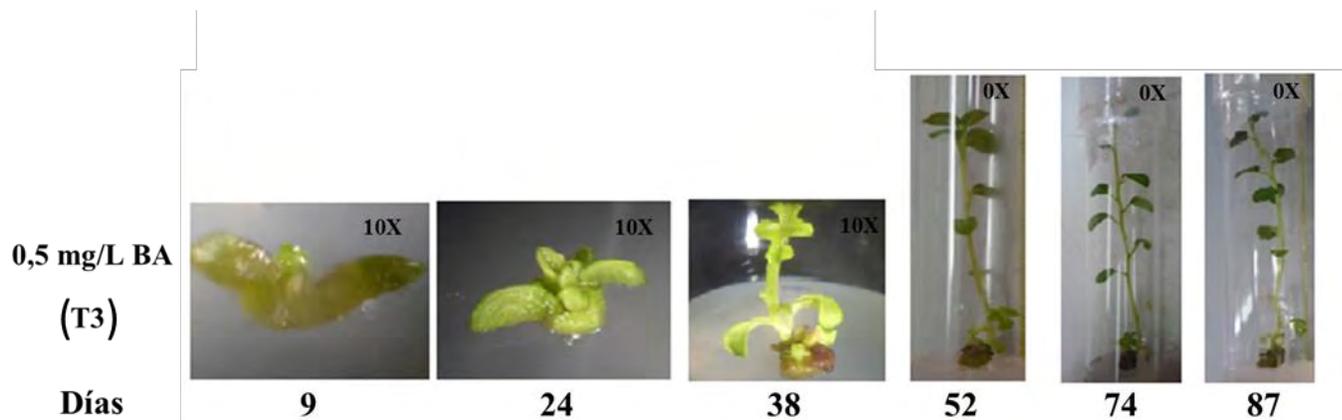


Figura 18. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,5 mg/L de BA (Tratamiento 3) durante 87 días de cultivo.

La regeneración de vástagos en el T3, fue similar a la del tratamiento control (ver figura 18). Durante los primeros días de cultivo (9 y 24 días), se observó un ligero cambio de forma caracterizada por el inicio de la diferenciación de primordios de vástago. En el día 38 el tejido basal del explante tomó una coloración café - marrón y hubo diferenciación de un primordio de vástago, mientras que al cabo de 52 días, la diferenciación de vástagos con hojas desarrolladas de mayor tamaño (datos no registrados) se hizo más evidente y la longitud de estos vástagos aumentó considerablemente (> 3 cm), en comparación al control y a los demás tratamientos evaluados. Al igual que en T1 y T2, en este tratamiento el grosor de los vástagos fue mayor, el número y distancia entre nudos se vio disminuida (datos no registrados). En este tratamiento no se desarrollaron raíces adventicias.

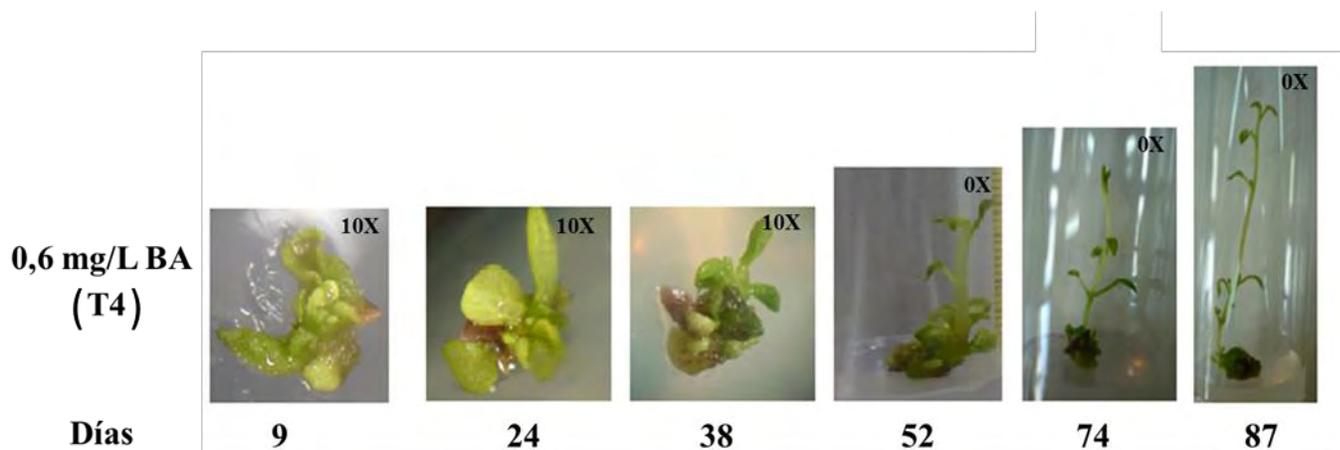


Figura 19. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,6 mg/L de BA (Tratamiento 4) durante 87 días de cultivo.

En el T4 se observó un ligero cambio de forma transcurridos 9 días de cultivo, el cual se presentó mediante el crecimiento de estructuras no diferenciadas. El inicio de la formación de primordios de vástagos fue notable a los 38 días, mientras que a los 52 días de cultivo se pudo apreciar la diferenciación de un pequeño vástago con hojas, cuyo grosor fue mayor que en el grupo control (datos no registrados). En el día 74, el vástago mostró un cambio en longitud, siendo esta mayor al cabo de 87 días de cultivo (figura 19). El número de nudos y la distancia entre estos fue menor en comparación al grupo control. En este tratamiento no se desarrollaron raíces adventicias.

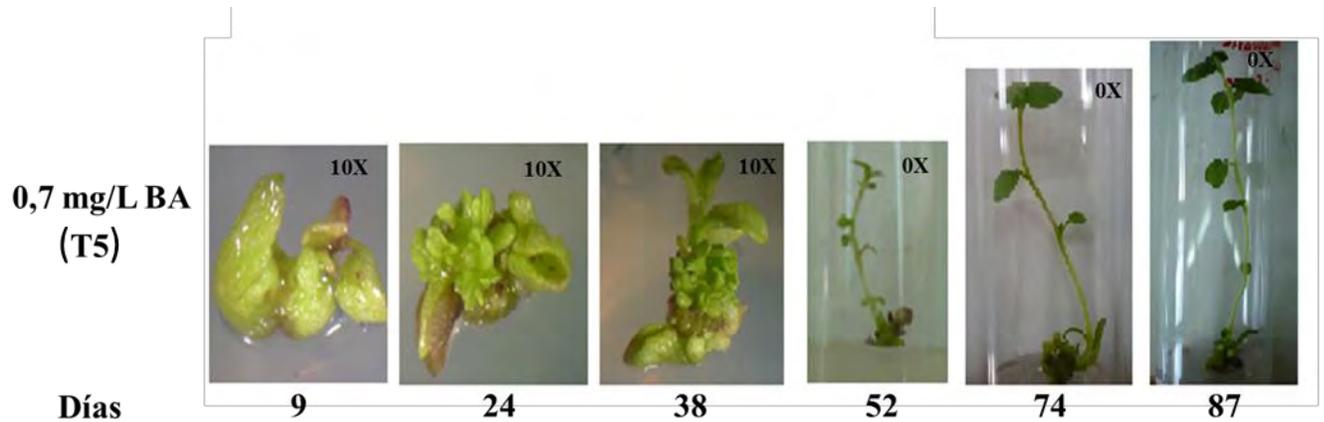


Figura 20. Regeneración de vástagos a partir de meristemas en 0,7 mg/L de BA (Tratamiento 5) durante 87 días de cultivo.

La respuesta de regeneración observada en el T5 (figura 20) fue similar morfológicamente en algunos de los meristemas cultivados al grupo control, sin embargo difieren en el desarrollo de hojas y la longitud de los vástagos. A los 24 días, se observó la formación de pequeñas estructuras no diferenciadas sobre el explante, y al cabo de 38 días la formación de un primordio de vástago, el cual se diferenció en un vástago el día 52. El número de nudos fue menor en comparación al control, así como la distancia entre éstos, aunque las hojas desarrolladas en este tratamiento presentaron mejor apariencia en cuanto a color y tamaño (datos no registrados, solo observación). A los 87 días, el vástago presentó un aumento de tamaño y la aparición de nuevas hojas sobre éste.

Aunque en todos los explantes hubo diferenciación de vástagos, como se mencionó anteriormente, el inicio de esta respuesta varió entre los tratamientos evaluados. En el tratamiento control, se observó la diferenciación de vástagos y raíces adventicias a los 38 días de cultivo, observaciones que difirieron con los tratamientos T2, T4 y T5, donde ésta fue a los 52 días, mientras que en el T1, esta respuesta

tuvo un retraso de 8 días con respecto a los demás tratamientos. En cuanto al T3, la diferenciación fue a los 38 días de cultivo al igual que el grupo control, sin embargo en este tratamiento no se desarrollaron raíces adventicias.

Efecto de la citoquinina 6–Benciladenina (BA) en la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas

Al cabo de 60 días de cultivados los meristemas en los diferentes tratamientos con BA, se observó la regeneración de vástagos con mayor diámetro aparente (datos no registrados), hojas de color verde oscuro, y mayor longitud (cm) con respecto al tratamiento control (figura 21). Estas diferencias fueron observadas mediante los resultados obtenidos:



Figura 21. Comparación de longitud (cm) y respuestas de regeneración *in vitro* entre los diferentes tratamientos evaluados, transcurridos 60 días de cultivo.

Foto: Lacruz, 2018.

Los vástagos regenerados en el grupo T3 fueron los que presentaron mayor longitud, seguidos del control, T1, T5, T4 y T2, en la tabla 3 se muestra la longitud promedio de los vástagos para cada tratamiento a los 60 días de cultivo.

Tabla 3. Longitud (cm) de los vástagos regenerados *in vitro* al cabo de 60 días de cultivo para los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Media \pm Desviación estándar (cm)
Control	1,13 \pm 1,46 ^a
T1	0,91 \pm 0,90 ^a
T2	0,38 \pm 0,35 ^a
T3	2,99 \pm 2,04 ^b
T4	0,71 \pm 0,85 ^a
T5	0,78 \pm 1,40 ^a
Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$	

Además se encontró para este momento, que el número y la distancia entre los nudos fueron más cortos en el grupo control con respecto a los tratamientos con BA, donde la distancia entre nudos fue más larga y el número de nudos menor.

En la tabla 4 se muestra la altura promedio de los vástagos de acuerdo a cada tratamiento al cabo de 87 días de cultivo. En el caso de T1, T3, T4 y T5 (0,3; 0,5; 0,6 y 0,7 mg/L de BA) la altura (cm) fue superior (3,32; 6,13; 2,69 y 2,20 cm, respectivamente) con respecto al grupo control, mientras que el T2 presentó una altura de 1,42 cm, que correspondió a la menor altura registrada en el ensayo para los tratamientos evaluados (figura 20).

Tabla 4. Longitud (cm) de los vástagos regenerados *in vitro* al cabo de 87 días de cultivo para los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Media \pm Desviación estándar (cm)
Control	1,81 \pm 2,11 ^a
T1	3,32 \pm 3,51 ^c
T2	1,42 \pm 1,97 ^a
T3	6,13 \pm 3,43 ^b
T4	2,69 \pm 2,60 ^a
T5	2,20 \pm 2,67 ^a

Letras diferentes indican que hay diferencias significativas y letras iguales indican que no hay diferencias significativas,
 $p < 0,05$

Para fundamentar estadísticamente la respuesta de regeneración que induce las diferentes concentraciones de BA en la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas se realizó un análisis estadístico usando los datos de la longitud de vástago registrados durante los días de cultivo, obteniendo el siguiente resultado:

El aumento progresivo de la longitud (cm) media alcanzada por los vástagos regenerados durante 87 días (12 semanas) de cultivo en medios suplementados con diferentes concentraciones de BA se muestra en la figura 22. El grupo control (curva azul), presentó una longitud media de 4 cm, transcurridos 74 días, el crecimiento de estos vástagos fue lento durante los primeros 38 días, ya que a partir del día 45, la longitud aumentó de forma exponencial hasta alcanzar 4 cm, longitud que se mantuvo hasta los días 80 y 87, respectivamente, cuando se registró un aumento de aproximadamente 0,5 cm de longitud.

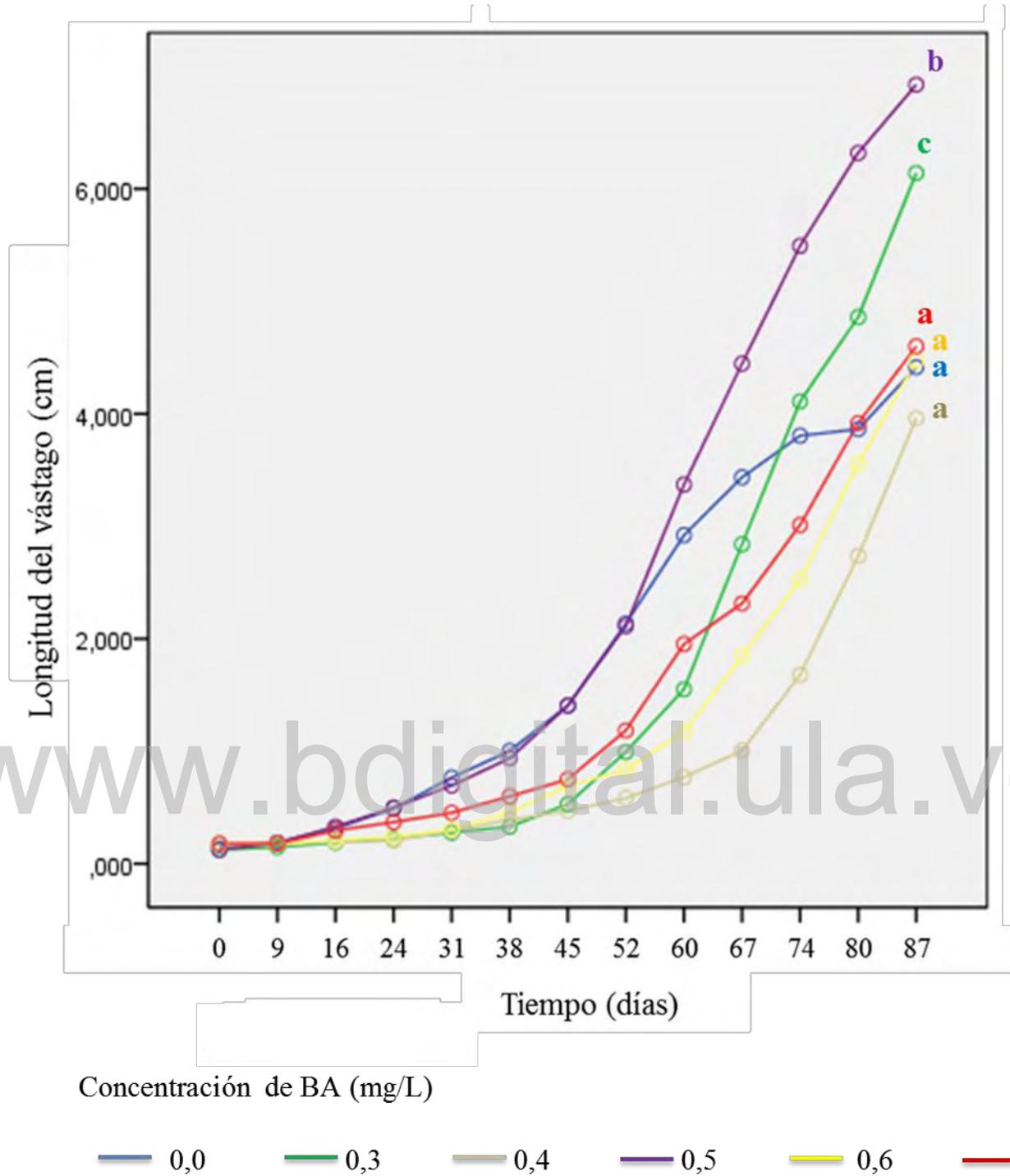


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de BA en la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas de *S. tuberosum* L., cultivar Plancheta. La regeneración *in vitro* fue determinada a los 87 días de cultivo mediante la longitud del vástago (cm). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

Cabe destacar que el tratamiento con mayor longitud de vástago transcurridos 87 días de cultivo fue el T3 (curva morada), con una longitud mayor a los 6 cm, seguido por el T1 con aproximadamente 6 cm (curva verde); mientras que T5, T4 y T2 (curvas roja, amarilla y marrón, respectivamente) presentaron una longitud media de 4 cm aproximadamente. El T3 respondió de manera similar al grupo control durante las primeras 8 semanas (52 días), luego, a partir de 60 días el crecimiento fue más lento en el control, mientras T3 presentó un aumento en longitud. Este resultado podría sugerir que en el MBMS, los meristemas se diferencian a vástagos, y que al cabo de 52 días, estos vástagos podrían ya subcultivarse por la longitud y entre nudos desarrollados en un medio MBMS para su propagación.

También se observó que los meristemas del T1, T2, T4 y T5 dieron su primera respuesta de crecimiento a partir del día 45 de cultivo. El T2 presentó una respuesta y/o velocidad de crecimiento tardía o menor en comparación al resto de los tratamientos. Los explantes cultivados en T2 presentaron una respuesta de oxidación en su mayoría y la regeneración no fue exitosa con respecto a T1 y T3. Aunque las curvas son similares, no son paralelas, lo que indica que cada una tiene un comportamiento distinto y que la concentración de BA tuvo un efecto en la regeneración de vástagos. Los diferentes tratamientos respondieron a distintas velocidades de crecimiento, teniendo que el control junto con T3 durante las primeras 8 semanas presentaron mayor velocidad de crecimiento que los otros tratamientos. Las letras (a, b y c) sobre cada gráfica representan aquellos tratamientos donde hubo diferencias significativas respecto al control con un nivel de significancia de 0,05 ($p < 0,05$).

De acuerdo con el análisis de varianza se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (anexos, tabla 8). La interpretación de los resultados de dicha tabla está determinado por el valor del estadístico de contraste de igualdad de tratamiento, $F = 4,523$ deja a su derecha un p de 0,002 menor que el nivel de significancia de 0,05, por lo que se puede decir que la longitud del vástago es diferente en al menos uno de los tratamientos y que ésta depende de la concentración de BA y su interacción con otros factores como luz, temperatura y otros componentes del medio.

Con respecto a los resultados obtenidos por la prueba de Duncan (Montgomery, 2004), la cual permitió comparar las medias de la variable longitud del vástago para los diferentes tratamientos ensayados (tabla 5), se observa la formación de tres grupos, los cuales de acuerdo con el programa estadístico utilizado, SPSS, se clasifican en 3 subconjuntos homogéneos basados en las medias

observadas. Así, en el subconjunto 1, están incluidos los tratamientos T2, T4, T5 y grupo control, cuyas medias no difieren significativamente ($p=0,103$, mayor que el nivel de significación $0,05$); en el subconjunto 2, están incluidos los grupos T4, T5, T1 y control, cuyas medias tampoco difieren significativamente ($p=0,164$), y en el subconjunto 3 están incluidos el T1, T3 y control, aquí se muestra como el T3 es el que presenta diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos evaluados ($p=0,057$), en este tratamiento se observa un efecto positivo al adicionar BA en el medio de cultivo para la regeneración eficiente de vástagos a partir del cultivo de meristemas.

Tabla 5. Subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de medidas repetidas.

Concentración de BA mg/l	N	Subconjunto			
		1	2	3	
Duncan ^{a,b,c}	0,4	5	1,41638 ^a		
	0,6	10	2,68789 ^a	2,68789 ^{ab}	
	0,7	6	2,19763 ^a	2,19763 ^{ab}	
	0,0	10	1,81071 ^a	1,81071 ^{ab}	1,81071 ^{abc}
	0,3	7		3,32473 ^b	3,32473 ^{bc}
	0,5	15			6,13176 ^c
Sig.			0,103	0,164	0,057

Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas. Alfa=0,05

El valor resaltado en la tabla 5, corresponde al T3 cuya concentración fue 0,5 mg/L de BA, correspondiente al T3 y en el cual se observó mayor longitud media del vástago (6,13 cm), la menor longitud fue con 0,4 mg/L BA (1,42 cm), lo que sugiere que la concentración de BA con mejor respuesta de regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta es 0,5 mg/L BA, seguido por 0,3 mg/L BA.

Formación de raíces adventicias

La formación de raíces adventicias fue una respuesta observada durante la respuesta de regeneración. En la figura 23 se observa que a los 22 días de cultivo, el vástago regenerado en el grupo control presentó formación de raíces adventicias con una longitud mayor a 4 cm, mientras que en los tratamientos con BA (figura 23: T1, T2, T3, T4 y T5) no se observó la formación de raíces en los vástagos regenerados.



Figura 23. Raíces adventicias en los diferentes tratamientos. (Objetivo 10X y aumento 0,65X)

Oxidación de explantes cultivados

El cambio de color en los explantes de verde a café- marrón (oscurecimiento) fue observado en el ensayo a los 9 días de cultivo, siendo total a los 24 días. Dichos explantes no mostraron respuesta de regeneración.

Tabla 6. Número de explantes oxidados en los diferentes tratamientos aplicados a los meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta.

Tratamientos	Explantes oxidados
Control	5
T1	7
T2	8
T3	2
T4	7
T5	8

Los tratamientos con concentraciones menores (0,3 y 0,4 mg/L de BA) y mayores (0,6 y 0,7 mg/L de BA) a 0,5 mg/L de BA presentaron mayor número de explantes con aparente oxidación (tabla 6), notando que a una concentración de 0,5 mg/L de BA en el medio de cultivo se obtuvo un menor número de explantes oxidados. En la figura 24 se muestra la oxidación en meristemas.

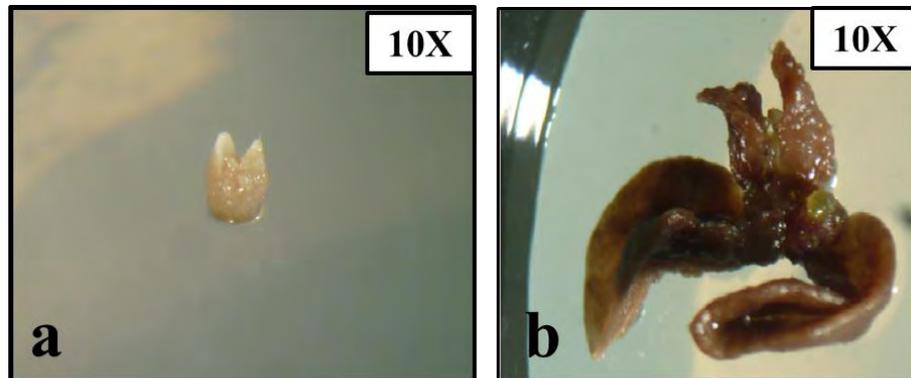


Figura 24. Meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta sembrados en MBMS con respuesta de oxidación. (a) Explante a los 9 días de cultivo y (b) explante a los 24 días de cultivo. (Aumento 0,65X). Foto: Lacruz, 2018.

Porcentaje de contaminación durante el ensayo

Se obtuvo a lo largo del ensayo bajo porcentaje de contaminación (3%) (Tabla 7). Se observó durante la evaluación del ensayo de forma directa la presencia de hongo en medio de cultivo a los 9 días de cultivo (figura 25).

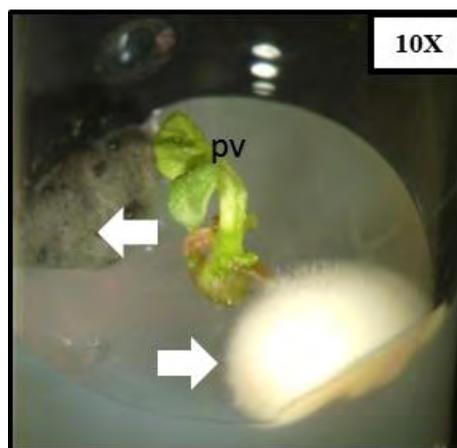


Figura 25. Contaminación por hongos en medio de cultivo con primordio de vástago. Regeneración de primordio de vástago (pv), flechas blancas señalan la contaminación observada. (Objetivo 10X, aumento 0,65X). Foto: Lacruz, 2018.

Tabla 7. Porcentaje de contaminación durante la regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas en los diferentes tratamientos evaluados

N° de Explantes cultivados	N° de explantes y/o medio contaminados	Porcentaje de contaminación
120	3	2,5%

Otras respuestas en vástagos regenerados a partir de meristemas

Se observó la presencia de hojas cloróticas (hojas con coloración amarillo-beige) en los tratamientos evaluados. En el grupo control las hojas de la parte basal y apical mostraron esta respuesta a los 45 días de cultivo, mientras que en tratamientos con BA sólo las hojas en la parte basal de los vástagos a los 77 días (figura 26). Transcurridos 94 días el grupo control presentó mayor número de dichas hojas (datos no registrados, sólo observación).



Figura 26. Hojas cloróticas en vástagos regenerados. (a) Tratamiento control a 45 días de cultivo. (b) T3 a 77 días de cultivo. Flechas blancas señalan hojas cloróticas. Foto: Lacruz, 2018

Micropropagación de segmentos nodales

Para garantizar la micropropagación de las plantas regeneradas a partir del cultivo de meristemas, se empleó dicha técnica (micropropagación de segmentos nodales), ya que se debe contar con un proceso de regeneración para futuros estudios que incluyen la obtención de material vegetal, que formará parte de la colección de germoplasma de papa andina venezolana en el laboratorio de Fitobiotecnología. Se utilizaron como explantes segmentos nodales (un nudo) de las plantas obtenidas a partir de meristemas. A los 15 días de cultivados los explantes se observó el alargamiento de la yema axilar y diferenciación de vástagos nuevos con raíces adventicias; la longitud de los vástagos nuevos fue mayor a 6 cm (datos no publicados), obteniéndose así, una micropropagación uniforme del cultivar Plancheta (figura 27).



Figura 27. Micropropagación a partir de segmentos nodales que se regeneraron de meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta.

Foto: Lacruz, 2018.

Las respuestas morfogénicas tales como diferenciación y regeneración de vástagos a partir del cultivo de meristemas de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta fue exitoso. Resultados similares han sido obtenidos por diversos autores como Vega *et al.* (2015) y Abdelnour *et al.* (2006), quienes usaron los meristemas como explantes para la regeneración *in vitro* de Cebolla (*Allium cepa*) y Chayote (*Sechium edule*), respectivamente. En 1997, Clark indicó que la formación, posición e identidad de los órganos de una planta se produce a partir de un grupo de células madre, denominadas meristema, que se establece durante la embriogénesis, y de acuerdo con Smith *et al.* (1992), los tejidos meristemáticos demuestran tener mayor capacidad de regeneración debido a que son zonas de intensa división celular.

Huala en 1993, informó que el crecimiento por sí solo no produce un cuerpo organizado, para que éste se desarrolle es necesario que la células se especialicen y lleguen a ser estructural y funcionalmente diferentes. En este sentido, la diferenciación celular consiste en el conjunto de cambios que hacen posible la especialización celular (Sussex, 1989), proceso que es regulado genéticamente y ocurre en respuesta a señales internas y externas. Hartmann y Kester (1997) asocian la respuesta de diferenciación a la formación de órganos nuevos mediante organogénesis directa.

A medida que el meristema crece las células cambian continuamente sus posiciones para posteriormente dividirse, diferenciarse o permanecer como están (Bowman y Eshed, 2000). Los nuevos órganos laterales (primordios foliares) se forman a partir de células reclutadas de la zona periférica del meristema, mientras que el tejido del tallo se deriva de células de la zona medular, y la zona central actúa como un reservorio de células madre, que repone tanto las zonas periféricas como la zona medular, además de mantener la integridad de la zona central, y los cambios en su patrón de expresión que indican el inicio de la diferenciación (Bowman y Eshed, 2000; Huala, 1993); todo esto demuestra que evidentemente la posición y la identidad celular dentro del meristema originará un nuevo órgano de la planta por diferenciación.

Las células en división activa del meristema utilizan señales hormonales y las interacciones célula-célula (comunicación celular) como guías durante la diferenciación de nuevos órganos y tejidos, además estas señales dan como resultado la activación e inactivación de genes en un conjunto de células, dando inicio al patrón de diferenciación específico (Wyrzykowska *et al.*, 2006 y Medford, 1992).

En el caso del inicio de un nuevo primordio foliar, éste está marcado por cambios en el plano de división celular del meristema en lugar de un aumento en la tasa de división (Sussex, 1989). Por lo general, una división periclinal en la capa celular L1 o L2 de la túnica del meristema representa el primer indicio de que se está formando un nuevo órgano. La posición en el que aparece el siguiente primordio en el meristema en relación con las hojas (filotaxis) determina en gran medida el patrón de los órganos laterales del brote (Kerstetter, 1997).

El tamaño del explante es un factor determinante en la regeneración *in vitro*, en este estudio experimental se utilizó meristemas axilares y apicales de 0,1 a 0,3 mm de longitud. Se ha encontrado que los explantes grandes poseen un potencial regenerador considerablemente mayor con respecto a los de menor tamaño, los cuales presentan una viabilidad y capacidad regenerativa más baja (Smith *et al.*, 1992), lo que ha sido informado por estudios como el de García *et al.*, (2001), quienes estudiaron tres rangos de tamaños de meristemas (0,3 a 0,2 mm; 0,2 a 0,1 mm y 0,1 a 0,06 mm) con el objetivo de obtener plantas de papa libres de virus, obteniendo un 96,6% de sanidad cuando se utilizó el rango de tamaño de meristemas entre 0,1 a 0,06 mm, pero los porcentajes de regeneración de plantas, a partir de los meristemas, disminuyeron a medida que el rango de tamaño fue menor.

Es importante resaltar que el tamaño del meristema dependerá de la especie y de los objetivos de la investigación, tales como la obtención de plantas libres de virus o la regeneración de plantas completas. En algunos casos, del cultivo de meristemas se obtienen plantas a partir de domos meristemáticos solamente, mientras en otros, se necesitan por lo menos que el domo esté acompañado de un primordio foliar. Adicionalmente, se debe considerar la posición del meristema en la planta donadora, de acuerdo a Quispe, (2007), los meristemas apicales muestran un mejor desarrollo respecto a las partes basal y media, esto debido a que los explantes de la parte apical poseen mayor potencial para la división celular, sin embargo, en la experiencia no se tomó en cuenta la posición del explante para corroborar este resultado.

Uno de los principales factores que influyen en la respuesta morfogénica de los explantes es la composición del medio. Al aislar un meristema para colocarlo en un medio artificial se le priva de la mayoría de los nutrientes minerales y orgánicos que reciben de otros órganos de la planta, por lo que para que su potencia continúe al cultivarlo *in vitro*, es necesario suministrarle los nutrientes necesarios y un adecuado suministro exógeno de hormonas de manera equilibrada (Sakakibara, 2006). El medio básico Murashige y Skoog, MBMS (1962) ha sido el más utilizado por su composición (macronutrientes, micronutrientes y vitaminas) (Rodríguez *et al.*, 2014).

El MBMS está compuesto por una alta concentración de nitrógeno (Sakakibara, 2006), el cual cumple una función importante en las plantas en cuanto a la formación de proteínas que intervienen en todos los procesos enzimáticos y en la producción de clorofila al estimular la producción de auxinas para luego formar la lignina (González *et al.*, 2012). Además, en la nutrición mineral de la planta, el nitrógeno es el principal nutriente que afecta el incremento del volumen de los brotes y la ganancia en peso de los tallos y hojas, este nutriente puede ser absorbido en las formas de nitrato o amonio. Cuando se absorbe como el primero de ellos, las plantas deben reducirlo a amonio, a un costo energético elevado, el cual una vez absorbido es metabolizado inmediatamente (González *et al.*, 2012).

Las fuentes de nitrógeno inorgánico, como el nitrato, son un factor importante que regula la expresión génica de la adenosina fosfato isopenteniltransferasa (IPT), una enzima clave de la biosíntesis de las citoquininas y el sistema especializado de transporte y distribución (Sakakibara, 2006; Hirose *et al.*, 2007). La citoquinina es una sustancia de señalización fundamental que le indica a la planta el estado de los nutrientes del nitrógeno desde la raíz hasta el brote a través de los vasos del xilema (Sakakibara, 2006). Y como sugiere Hirose *et al.* (2007) las plantas detectan constantemente el estado de los nutrientes, modulan sus actividades metabólicas y su programa de desarrollo para adaptarse de manera eficiente al entorno nutricional.

Por otra parte, la fuente de carbono (sacarosa) en el medio es importante e indispensable para el desarrollo de la planta, en esta investigación se empleó azúcar comercial como sacarosa, ésta es la molécula principal de transporte de carbono en las plantas, sucede pues que, las células del tejido meristemático importan hexosas y los meristemas requieren invertasas extracelulares que hidrolicen al disacárido (sacarosa) (Garza *et al.*, 2014). Los azúcares presentan un efecto regulador sobre el ciclo celular, sin embargo no es claro, si dicho efecto se debe a una simple disponibilidad de energía, o si la concentración del azúcar *per se* es traducida como una señal (Harting y Beck, 2006), evidentemente su presencia en el medio es indispensable para permitir la regeneración de vástagos.

La variación en la longitud promedio de los vástagos obtenidos, puede ser debido al grado de sensibilidad de las células hacia el regulador de crecimiento, la cual depende de los niveles hormonales en la planta y la influencia de la citoquinina presente en el medio (Mujica y Mogollón, 2004). Los resultados evidenciaron el papel del regulador de crecimiento BA, que promueve la inducción y crecimiento de brotes en los meristemas cultivados (Singh *et al.*, 2017), permitiendo la diferenciación y elongación de los vástagos. Garza *et al.* (2014), indican que las citoquininas tienen una función en el control de la proliferación del meristema y se requieren para mantener el ciclo de división celular, pero también pueden participar en la transición de la indiferenciación de células a su diferenciación.

El efecto de la citoquinina, podría estar relacionado con la división celular al incrementar la síntesis de proteínas y actividad metabólica, afectando los procesos de diferenciación celular (Villanueva *et al.*, 2013; Masekesa *et al.*, 2016).

Diversos trabajos, informan que las citoquininas participan en la regulación de la expresión de genes del ciclo celular y su progresión (Garza *et al.*, 2014) y se conocen algunas funciones de éstas durante diferentes fases del ciclo celular: a nivel de la fase G1, induciendo la acumulación de ciclinas y estimulando la entrada a fase M, probablemente por activación de una fosfatasa (Jordán y Casaretto, 2006), acelera la entrada y progresión de la fase S y la falta de ésta, detiene la fase G2 del ciclo celular (Werner *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2008).

Las respuestas morfogénicas inducidas por BA en el medio de cultivo han sido demostradas por varios autores, como Sarker y Mustafa (2002), quienes reportaron que con la citoquinina BA se obtiene una respuesta exitosa en términos de brotes por explantes, longitud de brotes, número de nudos y hojas en la variedad de papa Lal Pari. Motallebi *et al.* en 2011, mostraron que el suministro exógeno de BA en el medio de cultivo aumenta la producción de brotes en un cultivar comercial de papa; Molla *et al.*, (2011) también estudiaron el efecto de BA en la regeneración directa de la papa, obteniendo que con 3 mg/L de BA en el medio MS había regeneración de plantas de papa; y Bhuiyan en 2013, mostró que con BA en el medio se obtiene mayor número y longitud de brotes por explante, los resultados obtenidos en el ensayo también coinciden con los informes de Hoque *et al.* (1996) y Mila (1991) para otras variedades de papa.

En esta investigación el éxito obtenido en la regeneración de vástagos *de novo* se vio influenciado por diversos factores, incluida la interacción entre el regulador de crecimiento suministrado al medio y los componentes de éste. Y de acuerdo con Hirose *et al.* (2007) existe una evidencia creciente de regulación complementaria entre macronutrientes y citoquininas para la adquisición y distribución de nutrientes dentro de la planta en respuesta a factores ambientales. Estudios previos en la regeneración *in vitro*, han demostrado que los cultivos requieren de una cantidad apropiada de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, solas o en combinación entre sí en el medio Murashige y Skoog (MS) (Garza *et al.*, 2014). Sin embargo, en la práctica, esto difiere en gran medida debido a las variaciones en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento existente en los explantes (Kumlay y Ercisli, 2015).

Según Santos *et al.* (2017), generalmente, cuando se emplean meristemas para el establecimiento *in vitro* de los cultivos no se adicionan auxinas al medio aunque estas puedan

estimular el crecimiento, debido a que los ápices meristemáticos son zonas de síntesis de auxinas y su concentración en éstos es alta en comparación a otros órganos de la planta. Se han publicado muchas investigaciones sobre la regeneración de brotes a partir de la combinación e interacción entre los reguladores de crecimiento, donde proponen que la diferenciación del tejido de cultivo depende de la proporción de auxina y citoquinina en el medio, y que se requiere una baja proporción de auxina a citoquinina para el desarrollo de brotes (Ahiyoshi *et al.*, 1983; Taylor y Veilleux, 1992; Mahmoud *et al.*, 2012).

Recientemente, se ha demostrado que reguladores de crecimiento como las citoquininas y las auxinas interactúan durante importantes procesos de desarrollo, incluidos el posicionamiento, la adquisición de identidad y el mantenimiento de los centros de organización de meristemas, la regulación del equilibrio entre la división y diferenciación celular y la organogénesis (Pernisová *et al.*, 2011).

La cantidad de citoquinina endógena en los meristemas es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que en estos casos la adición exógena de citoquinina en los medios de cultivo es una práctica generalizada y gran parte de la regeneración de plantas ocurre en presencia de niveles apropiados de citoquininas versus auxinas (Vásquez, 2016). Entonces se puede decir que la incorporación de citoquinina puede afectar el nivel de auxina endógena (Mahmoud *et al.*, 2012), además las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas, en este caso endógenas también estimularían el crecimiento en forma indirecta (Jordan y Casaretto, 2006).

Siguiendo la línea, Jiménez (1998) indica que los meristemas apicales, son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena es alta y al emplear ápices no se adicionan auxinas al medio de cultivo aunque estos pueden estimular el crecimiento, pero cuando se emplean meristemas es frecuente que no exista suficiente auxina endógena siendo necesaria la adición exógena (Solis *et al.*, 2011). Mesa *et al.*, 2002, planteó que aunque las citoquininas ejercen un papel determinante en la fase de diferenciación, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. La interferencia de citoquinina / auxina es evidente en varios niveles (es decir, metabolismo, señalización, transporte, expresión génica y estabilidad de la proteína) y depende de sus concentraciones, las citoquininas y la auxina regulan mutuamente sus niveles endógenos, pero hasta el momento se sabe poco sobre los mecanismos moleculares de estas interacciones (Pernisová *et al.*, 2011).

Por otra parte, la actividad de las citoquininas está finamente controlada por factores ambientales como la luz, fotoperíodo y temperatura (Sakakibara, 2006) y según George *et al.*, (2008), la acción de las citoquininas va proporcionalmente con la luz.

La intensidad de luz juega un papel fundamental en el desarrollo de las plantas, aparte de su efecto sobre la acumulación de biomasa a través de la fotosíntesis, la intensidad y la calidad de la luz determinan la forma y el tamaño de la planta (Sánchez y Calderón, 2014), sin embargo, las células meristemáticas contienen proplastos que carecen de la estructura tilacoide organizada de los cloroplastos funcionales, además estas células no contienen clorofila ni expresan la variedad de productos genéticos necesarios para la fotosíntesis, aunque hay que tomar en cuenta que una vez que las células son desplazadas del meristema, adquieren la capacidad de ser fotosintéticas, y al mismo tiempo que ésta aumenta las células se agrandan a través de la vacuolación (Fleming, 2005).

La cantidad de luz durante las primeras 4 semanas de cultivo fue de 1200 watts, pero debido a inconvenientes no controlables (cortes/bajas de luz y pérdida de bombillos), ésta fue disminuyendo, teniendo al cabo de 94 días 700 watts, en consecuencia, la intensidad de luz se vio afectado, lo que podría explicar, el retraso en el desarrollo de algunos vástagos, ya que la cantidad y la calidad de luz puede alterar la morfología de las plántulas debido a que ésta es la radiación electromagnética que causa reacciones fotoquímicas en las plantas (Seabrook, 2005).

La temperatura es un factor importante en el cultivo *in vitro*, ya que controla el crecimiento y desarrollo de las plantas, específicamente en su actividad enzimática (Afanador, 2005), estos eventos se pueden ver afectados si la temperatura varía entre sus extremos (bajas y/o altas temperaturas), evidenciándose que las temperaturas bajas como los 6°C, pueden reducir significativamente la tasa de crecimiento, mientras que las altas como 30°C pueden inhibir la multiplicación de brotes (Afanador, 2005). Se debe considerar que utilizar una misma temperatura durante los períodos de luz (generalmente, 16 horas) y oscuridad (8 horas) favorece la organogénesis (Sakakibara, 2006). De igual manera, la temperatura influye sobre el desarrollo del explante *in vitro*, en la regeneración de vástagos, durante el ensayo ésta se mantuvo en 23°C. Según los informes de Hussey y Stacey (1981) establecieron que los valores de temperatura de 15 a 25°C son los óptimos para el cultivo *in vitro* de papa comercial, por consiguiente, la temperatura a la cual se expusieron los meristemas de la papa andina se encontraba dentro del rango óptimo informado.

En la regeneración *in vitro* de *S. tuberosum* L. a partir de meristemas, se compararon cinco tratamientos de BA más un grupo control y se observó diferencias significativas entre éstos. Las curvas obtenidas a partir del análisis estadístico (figura 22), se ajustaron a las primeras fases de una curva sigmoidea de crecimiento (figura 28). Los resultados evidenciaron un crecimiento lento en la longitud de vástagos las primeras 7 semanas (52 días), con un crecimiento lineal a partir de la semana 8 (60 días) hasta la semana 12 (87 días) de evaluación donde éste fue lento. Ello debido según Lallana y Lallana, (2004) a que toda curva sigmoidea de crecimiento tiene tres fases características, la fase inicial donde predomina la división celular y la relación entre áreas meristemáticas y el resto del cuerpo vegetal es alta, ya que hay un aumento de peso durante las primeras semanas de crecimiento. En esta fase la velocidad de crecimiento es lenta al comienzo, aparentemente debido a la existencia de un número bajo de células en división. El número de células con capacidad de crecimiento va aumentando en forma exponencial.

La fase lineal es característica de los aumentos de longitud, volumen, peso y número de las células de estructura cilíndrica o filamentosa, en las cuales las áreas meristemáticas permanecen constantes en tamaño (ej. crecimiento del tubo polínico, de la raíz principal y de los tallos con entrenudos). En esta fase a períodos iguales de tiempo corresponden aumentos iguales de crecimiento, en forma independiente del tamaño del sistema considerado. Finalmente, la última fase de crecimiento es la de envejecimiento o senescencia, ésta es lenta en crecimiento o crecimiento desacelerado y en su transcurso el sistema se vuelve cada vez menos efectivo hasta que aquel cesa totalmente. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos.

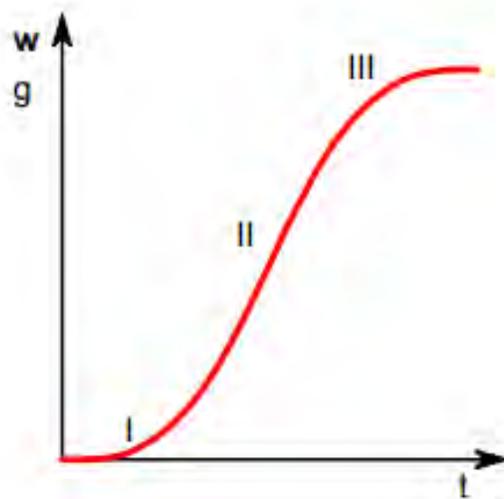


Figura 28. Curva sigmoidea de crecimiento vegetal ideal. Adaptado de Lallana y Lallana, (2004).

Las condiciones experimentales a las cuales fueron sometidos los meristemas, permitieron a los tejidos manifestar su potencialidad morfogénico, logrando la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de *S. tuberosum* L. cultivar Plancheta. Los resultados sugieren que la concentración óptima para la regeneración *in vitro* de este cultivar es 0,5mg/L de BA.

Formación de raíces adventicias

Los vástagos diferenciados en el grupo control presentaron crecimiento de raíces adventicias, resultados que se relacionan con los obtenidos por Soto *et al.*, (2013), quienes lograron ver el desarrollo de raíces en plantas de soya después de 7 a 15 días en un medio MS sin reguladores de crecimiento, a partir de nudos cotiledonales. En la experiencia, se usaron meristemas como explante y de acuerdo a Jiménez (1998), esta respuesta morfogénica es debido a que los ápices y meristemas que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro* son áreas de síntesis de auxinas, por lo que, la concentración endógena es alta y éstas permiten la formación de raíces adventicias. Aunque las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, una mayor concentración se encuentra en las regiones que están en crecimiento activo como los meristemas, esto permite la regeneración de raíces adventicias (Solis *et al.*, 2011).

En los tratamientos suplementados con BA, no se observó formación de raíces adventicias. Según Martínez *et al.*, (2016) en el cultivo *in vitro* de papa, la presencia de BA en el medio, inhibe el desarrollo de raíces e inducen la formación de órganos iniciando el desarrollo de yemas, lo que ha sido informado por autores como:

Motallebi *et al.* (2011), quienes afirman que en la micropropagación de un cultivar comercial de papa el porcentaje máximo de formación de raíces se obtuvo en medios sin BA. Por su parte, Kazemiani *et al.*, (2018), encontraron que el BA tiene un efecto negativo en el número de raíces desarrolladas, ya que dicha hormona induce brotes; mientras que Werner *et al.*, (2001) sugieren que las citoquininas tienen una función reguladora negativa en el crecimiento de la raíz y concluyen que la actividad de las células del meristema de la raíz está regulada por un mecanismo que es sensible a las citoquininas. Y según George *et al.*, (2008), las altas concentraciones de citoquinina entre 0,5-10 mg /L generalmente inhiben o retrasan la formación de raíces, evitando su crecimiento y los efectos promotores de auxinas en la iniciación de la raíz.

Respuesta de Oxidación en los explantes

El oscurecimiento observado en los meristemas cultivados en los diferentes tratamientos se podría atribuir a diversos factores ambientales como intensidad de luz, reguladores de crecimiento, patógenos, lesiones y sustancias como el cloro o etanol, siendo estos últimos desencadenantes del estrés oxidativo (Azofeifa en 2009). Además, esta respuesta de oxidación se sugiere que pueda estar determinada por la presencia de compuestos fenólicos oxidados como lo informa Borges *et al.*, (2004) en sus trabajos. Los compuestos fenólicos liberados en la oxidación durante el ensayo causaron inhibición del crecimiento y posterior muerte del meristema, como lo han informado numerosos autores, la respuesta de oxidación en los explantes pudiera disminuirse utilizando compuestos antioxidantes en el medio de cultivo (Borges *et al.*, 2004 y Azofeifa, 2009).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración 0,5 mg/L de BA fue la concentración a la cual se observó menor número de explantes con oxidación, lo que sugiere que esta concentración pudiera disminuir dicha respuesta en el cultivo de meristemas de papa causada posiblemente por los distintos factores nombrados anteriormente e incluso ante las lesiones implícitas en el proceso de aislamiento del meristema. Wilson *et al.*, 2008, proponen que las citoquininas activan la defensa antioxidante y retrasan el daño oxidativo durante la senescencia, debido a que permiten el desarrollo de cloroplastos (con formación de granas) en oscuridad, reemplazando parcialmente la demanda de luz (Jordan y Casaretto, 2006).

Según Borges *et al.*, 2004, la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo son con frecuencia inhibidores del crecimiento y constituyen uno de los problemas más frecuentes asociados con la micropropagación, ya que alteran y deterioran la composición química del medio de cultivo causando progresivamente la muerte del material vegetal. Por su parte, Van Staden *et al.* (2006) señalan que un desbalance hormonal debido al tipo, combinación y concentración de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo puede generar un estrés oxidativo, de tal manera, que se alteran diferentes vías metabólicas y respuestas fisiológicas del explante.

Además de acuerdo con Azofeifa (2009) en el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo y en la etapa de establecimiento *in vitro* luego de ser

cortados muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento (Van Staden *et al.*, 2006).

Porcentaje de contaminación

La contaminación por posibles agentes no deseados fue baja durante el ensayo experimental, corroborando con estos resultados que el procedimiento de asepsia empleado garantizó satisfactoriamente el cultivo, y por consiguiente, la regeneración. Cuando se trabaja con cultivos *in vitro* se debe tener en cuenta la presencia de contaminantes en instrumentos y áreas de trabajo que podrían contaminar el medio y el explante como lo indican Hartmann y Kester, (1997); donde los contaminadores externos se encuentran presentes en el aire, superficie de las plantas, mesas y manos. Cabe mencionar que las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire y para controlarlos se debe desinfectar los explantes, las herramientas y las áreas de trabajo (Quispe, 2007).

El proceso de asepsia del material vegetal y los ambientes de trabajo se llevó a cabo con cloro comercial (NaClO 3%), el mecanismo de acción de dicho desinfectante/detergente permite el daño de la membrana celular de los microorganismos, inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas, originando así, la lisis del microorganismo.

Borges *et al.*, en 2009, encontraron que explantes nodales sumergidos en hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración mayor o igual a 2% durante 10 min, disminuye el porcentaje de contaminación pero la muerte de los explantes aumenta, en la experiencia se pudo constatar que los meristemas sumergidos en NaClO al 2% durante 7 minutos, disminuye el porcentaje de contaminación y se obtiene una alta respuesta de regeneración. Según Sánchez y Sáens (2005), el cloro y el etanol destruyen los tejidos meristemáticos; el etanol posee una baja tensión superficial y puede fácilmente humedecer el tejido, mientras que el cloro afecta la permeabilidad celular del microorganismo y de las células vegetales impidiendo el adecuado desarrollo celular de las células meristemáticas y por lo tanto no permite la regeneración.

Otras respuestas en vástagos regenerados

La clorosis en hojas, es uno de los síntomas de daño por el etileno (Arias *et al.*, 2009), esta respuesta depende de la concentración de etileno en el recipiente. El desarrollo y las características fisiológicas y morfológicas de las plantas obtenidas *in vitro* están influenciados por el ambiente físico,

químico y gaseoso de los recipientes de cultivo. El ambiente *in vitro* presenta unas tasas bajas de flujo y energía debido a la existencia de un sistema semicerrado, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO₂ en el interior de los recipientes (Righetti *et al.*, 1990).

El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el período de cultivo (Cañal *et al.*, 2001). En recipientes de cultivo cerrados herméticamente se ha detectado una acumulación de gases (dióxido de carbono, etileno, etano, etanol y acetaldehído) que influyen o controlan el crecimiento; también, pueden afectar procesos de diferenciación y morfogénesis (Righetti *et al.*, 1990). La composición y concentración de ciertos compuestos gaseosos (oxígeno, dióxido de carbono y etileno, entre otros) en el medio de cultivo son determinantes en el crecimiento celular (Arias *et al.*, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones

- Se obtuvo una regeneración *in vitro* exitosa a partir del cultivo de meristemas bajo las condiciones físicas y químicas establecidas en este ensayo.
- Se determinó que el medio MBMS + 0,5 mg/L ($2,22 \times 10^{-6}$ M) de BA fue en el cual se regeneró la mayor cantidad de vástagos *in vitro* del cultivar Plancheta a partir del cultivo de meristema.
- La concentración de BA que induce respuestas de oxidación y menor diferenciación de vástagos en la regeneración del cultivar Plancheta a partir del cultivo de meristemas fue de 0,4 mg/L ($1,78 \times 10^{-6}$ M).
- Las concentraciones de BA utilizadas en este ensayo inhibe o retrasa la inducción de raíces adventicias.
- La eficiencia del cultivo de meristemas, depende de la habilidad del operador para efectuar la extracción del meristema y la utilización de medios de cultivo con un adecuado balance hormonal que favorezca la regeneración del tejido meristemático

Recomendaciones

- Pruebas preliminares que revelen ubicación y manipulación adecuada de los meristemas, con el objetivo de facilitar su extracción, ya que la disección en condiciones asépticas del meristema es un proceso delicado y requiere de muchas horas de práctica.
- Usar algún antioxidante en el medio, para controlar o evitar la oxidación de los explantes.
- Para investigaciones futuras estimar factores como número de hojas y de nudos, para determinar estadísticamente el tratamiento más adecuado para la regeneración *in vitro* de plantas del cultivar Plancheta.
- Evaluar el comportamiento morfológico del explante, según la posición del meristema (apical, medio y basal) en la planta donadora de *S. tuberosum* L., cultivar Plancheta.

www.bdigital.ula.ve

Bibliografía

- Abdelnour, A., Bermúdez, L., Alvarenga, S. y Rivera, C. (2006). Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del Chayote (ChMU). *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 77: 17-23.
- Abobkar, I. Saad y Ahmed, M. Elshahed. (2012). Plant tissue culture media. *Recent advances in plant in vitro culture*, 29-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/50569>
- Afanador, A. (2005). *Propagación in vitro a partir de meristemas de cinco variedades de Dianthus caryophyllus L. (clavel)*. (Tesis de pregrado para obtener el título de Licenciada en Biología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Ahiyoshi D., Morris R., Hinz R., Mischke B., Kosuge T., Garfinkel D., Gordon M. y Nester E. (1983). Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 80:407-411.
- Alcántara, J., Castilla, M. y Sánchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1: 71-83.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C. y Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundario. *Dyna*, 76(157):109-121.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1):153-175.

- Badoni, A. y Chauchan, J. (2009). Effect of growth regulators on meristem – tip development and *in vitro* multiplication of potato cultivar “Kufri Himalini”. *Nature Science*, 7(9), 31-34.
- Bhuiyan, F. (2013). *In Vitro* Meristem Culture and Regeneration of Three Potato Varieties of Bangladesh. *Research in Biotechnology*, 4(3): 29-37.
- Borges M, Ros C, Castellanos Y, Silvio M, Velásquez R. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Bioteología vegetal*, 4(4): 237-242.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I. y Meneses, S. (2009). Uso de diferentes tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Bioteología*, 11(2): 127-135.
- Bowman, J. y Eshed, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in plant science: reviews*, 5(3):110-115.
- Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez, R. y Majada, J. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Bioteología vegetal*, 1: 3-9.
- Clark, S. (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. *The plant cell online*, 9(7): 1067-1076. DOI: 10.1105/tpc.9.71067.
- Cuesta, X., Andrade, J., Yáñez, E. y Reinoso, I. (2010). Caracterización de papas nativas ecuatorianas para resistencia a factores bióticos, abióticos y calidad. *I congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de Papa Nativas: Memoria*, 1:34-37.
- Diazgranados, C. y Chaparro, E. (2007). Desarrollo de un sistema de regeneración de papa criolla (*Solanum phujera* Jus et Buck) var. Yema de huevo clon 1. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 7-15.

- Ebad, F., Sebai, M. y Kazzaz, E. (2015). Micropropagation of four potato cultivars *in vitro*. *Academia Journal of Agricultural Research*, 3(9): 184-188.
- Escala, M., & García, E. de. (1981). Propagación *in vitro* de variedades de *Solanum tuberosum* como método para la obtención de plantas libres de virus. *Agronomía Tropical*, 31(1-6), 91-105.
- Espinoza, N., Estrada, R., Tovar, P., Bryan, J. y Dodds, J. (1986). Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. *Specialized Technology Document 1. International Potato Center*, 1:6-7.
- Fleming, A. (2005). The coordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: a perspective. *Journal of experimental Botany*, 57(1):25-32. DOI: 10.1093/jxb/eri268.
- Fontúrbel, F.; Acha, D.; Moncada, D. (2007). *Manual de Introducción a la Botánica*. 2ª Edición. La Paz- Bolivia: Editorial Publicaciones Integrales.
- Gamarra, L. (2014). *Regeneración in vitro vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de Gmelina arborea a partir de plantas in vitro*. (Tesis de pregrado para optar por el título de Licenciado en Biología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- García, L., Sarría, Z., Pichardo, T. y Pérez, B. (2001). Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 1(2):117-119.
- García, J. (2013). *Establecimiento de un sistema de regeneración in vitro de Cempaxúchitl (Tagetes erecta) vía organogénesis indirecta*. (Tesis para obtener el título de Licenciado en Biotecnología). Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Santiago de Querétaro, México.

- Garza, S., Sánchez, V., Godínez, S. y Lara A. (2014). Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas. *REB*, 32(2): 39- 47.
- George, E., Hall, M. y De Klerk, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. The Background.
- González, N., Vanhaeren, H., y Inzá, D. (2012). Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion. *Trends in plant Science*, 17(6):332-340. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.02.003
- Guevara, M. (2004). *Análisis comparativo entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de Clavel (Dianthus caryophyllus L.)*. (Tesis para obtener el título de Doctor en Biotecnología de plantas). Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Veracruz, México.
- Harting, K. y Beck, E. (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, 8: 389-396.
- Hartmann, H. y Kester, D. (1997). *Propagación de plantas 5ª Reimpresión*. México. Campania Editorial Continental S.A. de C.V.
- Hawkes, J. G. (1958). Significance of wild species and primitive forms for potato breeding. *Euphytica*, 7(3), 257–270.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., y Sakakibara, H. (2007). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 75–83. DOI:10.1093/jxb/erm157.
- Hoque, M. I., Mila, N. B., Khan, M. S. and Sarkar, R. H. (1996). Shoot regeneration and in vitro microtuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.) Bangladesh. *Journal Botany*, 25(1): 87-93.

- Huala, E. (1993). Determination and cell interactions in reproductive meristems. *The plant cell online*, 5(10), 1157-1165. DOI: 10.1105/tpc.5.10.1157.
- Huamán, Z. (1986). Conservation of potato genetic resources at CIP. *CIP circular*, 14(2), 1–7.
- Huarte, M. y Capezio, S. (2011). *Cultivo de papa. La planta de papa y sus partes*. Adaptado del Centro Internacional de la Papa. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_huarte_capezio_papa2013.pdf
- Hussey, G., y W.J, Stacey. (1981). In vitro propagation of potato (*S. tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 48:787-796.
- Jiménez, E. (1998). Cultivo de ápices y meristemas. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, 1:45-56.
- Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citoquininas. Fisiología*. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena.
- Kazemiani, S., Motallebi, A., Panahandeh, J. y Ozdemir, F. (2018). Shoot proliferation from potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) under different concentration of MS include vitamins and BAP médium. *Progress in Nutrition*, 20(1): 160-166. DOI: 10.23751/pn.v20i1-S.6686.
- Kerstetter, R. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. *The plant cell online*, 9(7):1001-1010. DOI: 10.1115/tpc.9.7.1001
- Kumlay, A. y Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) Stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Quipment*, 29(6), 1075-1084.

- Lallana, V. y Lallana, M. (2004). *Manual de prácticas de Fisiología Vegetal: Hormonas Vegetales*. Argentina, Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNER.
- Lizárraga, R.; Panta, A.; Jayasinghe, U.; Dodds, J. 1991. *Cultivo de Tejidos para la Eliminación de Patógenos. Guía de investigación*. CIP. Lima.
- Lizarazo, S., Hurtado, G. y Rodríguez, L. (2015). Physicochemical and morphological characterization of potato starch (*Solanum tuberosum* L.) as raw material for the purpose of obtaining bioethanol. *Agronomía Colombiana*, 33(2): 244-252. DOI: 10.15446/agron.colomb.v33n2.47239.
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65(1), 26–40. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.26>
- Mahmoud, S., Tarek, M., Nahed, H., Amany, E. y Rehab, A. (2012). Selection of an efficient *in vitro* micropropagation and regeneration system for potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Desirée. *Journal of Biotechnology*, 11(98): 16388-16404. DOI: 10.5897/AJB12.2313
- Martínez, Y., Rodríguez, M., Colinas, M., Villegas, O., Castillo, A. y Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista fitotecnia mexicana*, 38(4), 369-374.
- Martínez, C., Mendoza, E. y Vargas, M. (2016). *Efecto de los reguladores de crecimiento en el desarrollo de las plantas*. Fisiología Vegetal. San Carlos: ITCR.
- Masekesa R., Gasura E., Matikiti A, Kujeke G., Ngadze E., Icishahayo D., Chidzwondo F. y Robertson, I. (2016). Effect of BAP, NAA and GA₃, either alone or in combination, on meristem culture and plantlet establishment in sweet potato (cv brondal). *African Journal of food, agriculture, nutrition and development*, 16(1): 10649-10665.

- Medford, J. (1992). Vegetative apical meristems. *The plant cell online*, 4(9): 1029-1039. DOI: 10.1105/tpc.4.9.1029.
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. (2017). *Atlas de histología animal y vegetal. Tejidos vegetales: Meristemos*. Universidad de Vigo – España.
- Mesa, D., Romero, A. y Cruz, A. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación *in vitro* de la *Leucaena leucocephala* L. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36(3): 271-274.
- Mila, N. (1991). *Optimization of in vitro microtubers formation in potato (Solanum tuberosum L.)*. (M.Sc. Thesis). Department of Botany, University of Dhaka. Bangladesh.
- Molla, M., Nasiruddin, K., Amin, M., Khanam, D. y Salam, M. (2011). Effect of growth regulators on direct regeneration of potato. *IPCBE*, 12:205-210.
- Monteros, C., Navarrete, M. y Reinoso, I. (2010). Las Papas nativas en la Gastronomía Andina. *Innovaciones tecnológicas y mercados diferenciados para productores de papas nativas*. Lima: Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO).
- Morales, F. (2007). Sociedades precolombinas asociadas a la domesticación y cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sudamérica. *Revista Latinoamericana de la papa*, 14(1), 1-9.
- Morales, M., Espinosa, C. y Garza, R. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *Investigación en plantas de importancia médica*, 1: 351-410. DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>.
- Moreno, M. (2012). Efecto de la composición del medio de cultivo y del fotoperiodo sobre la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). (Tesis de pregrado para optar por el título de Licenciado en Biología). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.

- Motallebi, A., Kazemiani, S., Kiumarsie, F. y Mohaddes, N. (2011). Shoot proliferation from node explants of Potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria), effect of different concentrations of NH₄NO₃, hydrolyzed casein and BAP. *Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University*, 16(3): 6181-6186.
- Mujica, H. y Mogollón, N. (2004). Bulbificación in vitro del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*, 16(1):55-60.
- Murashige, F. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissues cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473 - 497.
- Ovchinnikova, A., Krylova, E., Gavrilenko, T., Smekalova, T., Zhuk, M., Knapp, S., y Spooner, M. (2011). Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section petota: solanaceae). *Botanical journal of the linnean society*, 165(2):107–155. DOI:10.1111/j.1095-8339.2010.01107.x
- Patti, B. (2013). *Producción de semilla artificial de tres variedades nativas de papa (Solanum tuberosum L.), para la obtención de semilla pre básica.* (Tesis de pregrado para optar por el título de Licenciado en Ingeniería Agronómica). Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.
- Pernisová, M., Kuderová, A y Hejátko, J. (2011). Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development: Metabolism, Signalling, Transport and Gene Expression. *Current Protein and Peptide Science*, 12:137-147.
- Pérez, M., Delgado, M.; Hernández, C. y Armas, R. (2008). Organogénesis indirecta a partir de meristemas apicales caulinares de la variedad cubana de arroz reforma. *Cultivos Tropicales*, 29(1): 23-28.
- Pérez, R. y Gómez, A. (2012). *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of plants Subjected to Abiotic Stress Conditions. *Recent Advances in Plant In vitro culture*, 1: 91-108. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/50671>.

- Purves, W., Sadava, W., Orians, G., & Heller, Z. (2002). *Vida: la ciencia de la biología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Quispe, C. (2007). *Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres*. (Tesis de grado para optar por el título de Licenciada en Ingeniería Agronómica). Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.
- Righetti, B., Magnanini, E., Infante, R. y Pedreri, S. (1990). Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant*, 78:507-510
- Roca, W y Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia: L.A Ediciones.
- Rodríguez, L. (2010). Ecofisiología del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(1):97-108.
- Rodríguez, M., Chacón, M. y Carrillo, R. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1): 119-122. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012>.
- Romero, L. (2003). Hacia una nueva racionalidad socio ambiental en los Andes paperos de Mérida. ¿De qué depende? *Fermentum*, 13(36):55–72.
- Romero, R. (2007). Exploración del subsistema semilla dentro del circuito agroproductivo de la papa en las zonas paperas del Estado Mérida, para el diseño de estrategias de competitividad. (Trabajo Especial de Grado para optar por el título de Licenciado en Biología). Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias. Venezuela.

- Roth, I. (1976). *Anatomía de las plantas superiores*. Segunda Edición. Caracas: Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1):431–449. DOI:10.1146/annurev.arplant.57.032905.10
- Saldívar, P. (2017). *Senescencia, acción del etileno y conservación de flores cortadas. Guía: Especialidad en Floricultura*. Universidad Autónoma del Estado de México - Facultad de Ciencias Agrícolas. Toluca – México.
- Sánchez, J. y Calderón, A. (2014). Efecto de la distancia de la planta al foco emisor de luz durante la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de *Limonium sinuatum*. *III workshop en investigación agroalimentaria*, 3: 95-98.
- Sánchez L. y Sáens E. (2005). Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, 15(2): 82-103.
- Santos, A., López, J., Basail, M., Gutierrez, Y., Rayas, A., Medero, V., Rodríguez, D., Beovides, Y., Reinaldo, D. y Bauta, M. (2017). Efecto de 6-BAP y AIA en el establecimiento *in vitro* de meristemas de *Colocasia esculenta* (L.) Schott cv. 'INIVIT MC 2012'. *Bioteología Vegetal*, 17(1): 67 – 70.
- Sarker, R. H. y Mustafa, B. M. (2002). Regeneration and Agrobacterium mediated genetic transformation of two indigenous potato varieties of Bangladesh, *Plant Tissue Culture*, 12(1): 69-77.
- Seabrook, J. (2005). Light effects on the growth and morphogenesis of Potato (*Solanum tuberosum*) *In vitro*: A review. *American Journal of Potato research*, 82: 353-367.
- Singh, A., Sharma, M., Chaudhary, R. y Sengar, R. (2017). Effects of BAP and adenine sulphate on shoot regeneration from callus in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotech Today*, 7(1): 49-51.

- Smith, L., Greene, B., Veit, B., y Hake, S. (1992). A dominant mutation in the maize homeobox gene, Knotted1, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development*, 116:21-30.
- Smith, P. y Atkins, C. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology*, 128: 793-802.
- Smith, R. (2012). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. 3rd Edition. USA.
- Solis, R., Olivera, J. y La Rosa, R. (2011). Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemos apicales. *Revista peruana de Biología*, 18(3). DOI: <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.450>
- Soto, N., Ferreira, A., Delgado, C. y Gil, E. (2013). Regeneración *in vitro* de plantas de soya de la variedad cubana Incasoy-36. *Biotecnología aplicada*, 30:29-33.
- Spooner, D. 2005. Origen de la papa. (En línea) US, Universidad de Wisconsin. Disponible en: <http://myslide.es/documents/origen-de-la-papa.html>.
- Spooner, D., Núñez, J., Trujillo, G., del Rosario Herrera, M., Guzmán, F., & Ghislain, M. (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49):19398–19403.
- Sussex, I. (1989). Developmental Programming of the shoot Meristem. *Cell*, 56(2): 225–229. DOI:10.1016/0092-8674(89)90895-7
- Taylor TE, Veilleux RE (1992). Inheritance of competencies for leaf disc regeneration, anther culture and protoplast culture in *Solanum phureja* and correlations among them. *Plant Cell Tissues Organism Culture*, 31:95-103.

- Taíz, L. y Zeiger, E. (2003). *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Torres, J., Alvarado, G. y Hernández, A. (2016). Regeneración *in vitro* de cuatro cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) a partir de secciones de hoja y en presencia de diferentes reguladores de crecimiento. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 50(2):134-146.
- Trigiano, R. y Gray, D. (1953). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory*. Second Edition. USA: CRC Press.
- Ureta, E. (2014). *Regeneración vía organogénesis directa de plantas de Digitalis purpurea* L. (Tesis de pregrado para optar por el título de Licenciado en Biología). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuba.
- Valderrama, S., Chico, J., Quispe, J y Sánchez, R. (2011). Regeneración *in vitro* de plantas de *Solanum pimpinellifolium* L. a partir de explantes foliares. *Biotecnología Vegetal*, 11(1): 15-25.
- Van Den Berg, R. y Groendijk, N. (2014). Taxonomy en R. Navarre & M. Pavék (Eds.), *The Potato: Botany, Production and Uses*, 1: 12–28.
- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae*, 725: 55-62.
- Vásquez, J. (2016). Efecto de la aplicación de fitohormonas en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria ananassa*, Var. Chandler). Técnicas avanzadas de laboratorio. Universidad Nacional experimental del Táchira. Laboratorio de Investigaciones genéticas: UNET.

- Vega, J. Arabana, V. y Torres, M. (2015). Standarization of an apical bud *in vitro* culture protocol for shallot onion (*Allium cepa* var. *aggregatum*) regeneration. *Avances en Ciencias e ingenieria*, 7(1):B24-B31.
- Verdugo, G.; Araneda, L. y M.O. Riffo. (2003). Efecto de inhibidores de etileno en postcosecha de flores cortadas de *Lilium*. *Ciencia e Investigación Agraria*, 30(2):89-95.
- Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A., Abades, s- y Cáceres, J. (2013). Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *ahnfeltia plicata* (hudson) fries, 1836 (ahnfeltiales, rhodophyta) de la región de magallanes). *Anales Instituto Patagonia* (Chile), 41(1): 99-111. DOI: 10.4067/s0718-686x2013000100009 .
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. y Schmölling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS*, 98(18): 10487-10492.
- Wilson, C., Zavaleta, H., López, H. y Hernández, A. (2008). La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). *Agrociencia*, 42(7): 799-806.
- Wyrzykowska, J., Schorderet, M., Pien, S., Gruissem, W. y Fleming, A. (2006). Induction of Differentiation in the Shoot Apical Meristem by Transient Overexpression of a Retinoblastoma-Related Protein. *Plant Physiology*, 141: 1338-1348.
- Yildiz, M. (2012). The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/51097>.
- Yasmin, A., Jalbani, A. y Raza, S. (2011). Effect of growth regulators on meristem tip culture of local potato cvs Desiree and patrones. *Pak. J. Agri., Agril. Engg., Vet. Sci*, 27(2), 143-14.
- Zepeda, M., Menjvar, W. (2016). Evaluación de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) multiplicadas *in vitro* en dos volúmenes de sustrato para la producción de mini tubérculos bajo invernadero. (Tesis de pregrado para optar por el título de

ingeniero agrónomo). Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas.
Ciudad Universitaria, El Salvador.

Páginas web consultadas:

- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Consultada en mayo de 2018
- Papas antiguas de Canarias: Extraído de http://papasantiguasdecanarias.org/variedades_sistematica.php. Consultada en mayo de 2018
- Tejidos y órganos Vegetales: Extraído de <https://es.slideshare.net/VidalBanez/byg-1bach-uni9-tejidos-y-rganos-vegetales>. Consultada en Junio de 2018.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Análisis de Varianza (ANOVA)

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
BA	190,622	5	38,124	4,523	,002
Error	396,132	47	8,428		

www.bdigital.ula.ve