

66
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
SUB-DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



APORTACIONES TECNOLOGICAS DE LABORATORIO,
INVERNADERO Y CAMPO, PARA PRODUCIR
TUBERCULO SEMILLA DE PAPA EN EL NORESTE
DE MEXICO.

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA.

POR

Ing. Agr. Fitotecnista:

LUIS ALBERTO MORENO ARREDONDO

Marín, Nuevo León, México

Febrero de 2002

TM

SB211

.P8

M6

2002

c.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUB DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**APORTACIONES TECNOLÓGICAS DE LABORATORIO, INVERNADERO Y
CAMPO, PARA PRODUCIR TUBÉRCULO SEMILLA DE PAPA EN EL NORESTE
DE MÉXICO.**

**PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

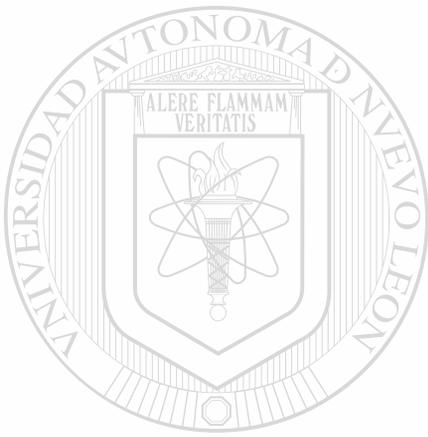
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

POR:

Ing. Agr. Fitotecnista:

LUIS ALBERTO MORENO ARREDONDO

TM
SB211
- P8
ML
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUB DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**APORTACIONES TECNOLÓGICAS DE LABORATORIO, INVERNADERO Y
CAMPO, PARA PRODUCIR TUBÉRCULO SEMILLA DE PAPA EN EL NORESTE
DE MÉXICO.**

**PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

POR:

Ing. Agr. Fitotecnista:

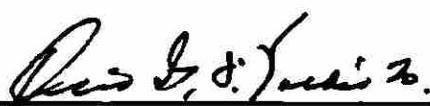
LUIS ALBERTO MORENO ARREDONDO

Maín, Nuevo León, México

Febrero de 2002

**APORTACIONES TECNOLÓGICAS DE LABORATORIO, INVERNADERO Y
CAMPO, PARA PRODUCIR TUBÉRCULO SEMILLA DE PAPA EN EL NORESTE
DE MÉXICO.**

**TESIS APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN
AGRICOLA**



Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano

Director de tesis

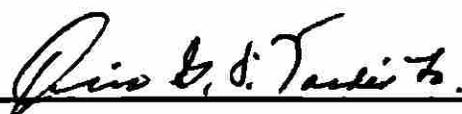


Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón

Coasesor

Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda

Coasesor



Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano

Sub Director de Estudios de Posgrado

Marín, Nuevo León, México

Febrero de 2002

VITAE

El autor, Luis Alberto Moreno Arredondo nació el 22 de marzo de 1971 en Santa Ma. de Ramos, Galeana, Nuevo León., México. Realizó sus primeros estudios en la Escuela Primaria Margarita Maza de Juárez del mismo Municipio alcanzando su certificado de primaria en junio de 1983.

Ingresó a la Escuela Secundaria Nicéforo Zambrano No. 92 en Ciudad Guadalupe, Nuevo León, en Septiembre de 1983, alcanzando su certificado de secundaria en 1986.

En 1987 ingresó a la Escuela Preparatoria No. 22 de la Universidad Autónoma de Nuevo León., de la Ciudad Guadalupe, Nuevo León, cumpliendo con todas las materias del programa de bachillerato en 1989.

En 1990 ingresó a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el Municipio de Marín, Nuevo León obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en 1995.

De marzo de 1995 a marzo de 1996 trabajó en la empresa High Breeding (HBR), en el Municipio de Marín, Nuevo León, como técnico en el programa de producción de semilla agámica de papa.

De febrero de 1996 a Agosto de 1998 cursó los estudios de Maestría en la División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En agosto de 1998 ingresó al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario (LADIF) de la FAUANL y hasta la fecha se ha desempeñado como auxiliar técnico en la detección de enfermedades.

DEDICATORIA

A Jehová Dios

Por haberme dado un tiempo para vivir,

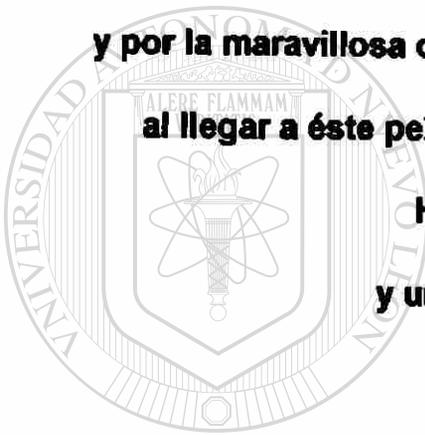
y por la maravillosa oportunidad de realizar uno de mis objetivos

al llegar a éste peldaño dentro de la gran escala de la vida.

Hay un tiempo para todo

y un tiempo para cada acción

bajo el cielo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Ec. 3:1-2

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis padres:

Sr. Ramiro Moreno Malacara y Sra. Dora Elia Arredondo de Moreno. Por darme el ser y enseñarme el camino del bien con el apoyo y palabras de aliento para el término de mis estudios.

A mis hermanas: Evangelina Moreno de Hernández, María Isabel, María del Carmen e Irene, por su ayuda y estar presentes siempre en mis dificultades.

A mi abuelo Paulo Arredondo Mata (Q.E.P.D.) por estimularme a tener un título profesional.

A mi esposa Ing. Agrónomo en Industrias Alimentarias: Blanca E. Calderón Rangel por su comprensión y apoyo en la culminación de este trabajo.

A mi hijo Luis David Moreno Calderón por su sonrisa que alienta a seguir adelante.

A la familia Saucedo Arredondo Sr. Bernardo Saucedo Camacho, Sra. Leonor Arredondo de Saucedo, Arq. Bernardo Saucedo Arredondo (q. e. p. d.), Profr. Platón Saucedo Arredondo y Lic. Norma Saucedo de Coronado, por todo el apoyo y consejo incondicional que me brindaron para salir adelante en mis estudios.

A todos mis maestros: por el tiempo que me dedicaron para transmitirme parte de su conocimiento.

A todos mis compañeros: que formaron parte del apoyo y aliento de seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca de estudios sin la cual no hubiese realizado el cumplimiento de esta meta.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la empresa High Breeding y al proyecto SIREYES 95/034, por las facilidades otorgadas para la realización de estas investigaciones.

Al personal del campo experimental de la Ascensión, Aramberri, N. L. por su ayuda incondicional para la realización de una parte de este trabajo.

Al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario (LADIF) por facilitar todo el equipo y material para la culminación de este trabajo.

Al Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano por su ayuda y dirección para llegar a la culminación de este trabajo.

Al Ph. D. Emilio Olivares Saénz por su ayuda en el análisis estadístico experimental.

Al Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón por apoyo y facilidades ofrecidas para la terminación de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda. por su tiempo prestado incondicional en la revisión de este trabajo.

Al Ph. D. José Luis de la Garza por su ayuda incondicional para la conclusión de este trabajo.

ABREVIATURAS

cm	centímetros
diam.	diámetro
D.O.	densidad óptica
DMS	diferencia mínima significativa
etc.	etcétera
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
°C	grados centígrados
g/L	gramos por litro
g	gramos
ha.	hectárea
hr	horas
µl	microlitros
mL	mililitros
mm	milímetros
mg/ L	miligramos por litro
nm	nanometros
%	porcentaje
pH	potencial hidrógeno
v/v	relación volumen por volumen
rend.	rendimiento
SOLAM	solución amortiguadora
SF+T	solución fosfatos más tween
ton.ha ⁻¹	toneladas por hectárea
PVA	virus A de la Papa
PVS	virus S de la Papa
PVM	virus M de la Papa
PVX	virus X de la Papa
PVY	virus Y de la Papa
PLRV	virus del enrollamiento de la hoja de la papa
HBR	high breeding
LADIF	Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario
FAUANL	Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León

CONTENIDO

VITAE.....	iv
DEDICATORIAS.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ABREVIATURAS.....	Viii
CONTENIDO.....	ix
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INDICE DE CUADROS EN EL TEXTO.....	xvi
APENDICE.....	xviii

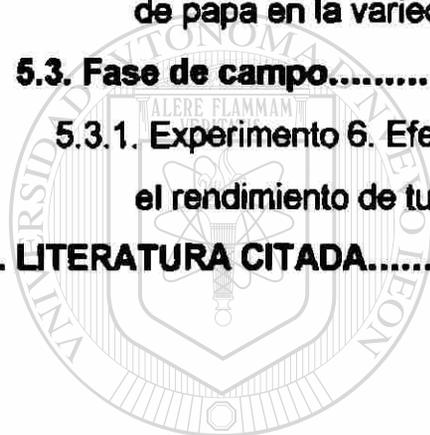
Capitulo	pag.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Fase de laboratorio.....	3
2.1.1. La producción moderna de tubérculo semilla sano de papa.....	3
2.1.2. Procedimiento general para la obtención y multiplicación de papa <i>in vitro</i> sana.....	3
2.1.2.1. Medio de cultivo para la multiplicación de papa <i>in vitro</i>	4
2.1.2.2. Establecimiento de plantas <i>in vitro</i>	4
2.1.2.3. Crecimiento de la planta de papa <i>in vitro</i>	4
2.1.2.4. Condiciones ambientales en el cultivo de tejidos en papa...	7
2.1.3. Obtención de plantas sanas <i>in vitro</i>	7
2.1.3.1. Extracción de meristemos.....	8
2.1.3.2. Termoterapia.....	8
2.1.3.3. Quimioterapia.....	8
2.1.3.4. Electroterapia.....	9
2.1.4. Verificación de la fitosanidad de las plantas <i>in vitro</i> de papa	10
2.1.5. Multiplicación masiva de plantas <i>in vitro</i> sanas	10
2.2. Fase de invernadero.....	11
2.2.1. Transferencia de plantas <i>in vitro</i> al suelo en ambiente protegido...	12
2.2.2. Producción y Cosecha de minitubérculos.....	13
2.3. Fase de campo.....	13

2.3.1. Producción de tubérculos semilla Básica de papa ó primera generación en campo.....	16
2.3.1.1. Uso del minitubérculo.....	16
2.3.1.2. Transplante de la planta <i>in vitro</i> sana directamente en campo.....	17
2.3.2. Producción de tubérculo semilla de papa certificada.....	17
2.3.2.1. La región para la producción de tubérculo semilla de papa..	18
2.3.2.2. La temperatura en la producción de tubérculo semilla de papa.....	18
2.3.2.3. Tamaño del tubérculo semilla de papa.....	19
2.3.2.4. La fitosanidad del tubérculo semilla de papa de Básica a Certificada.....	19
2.3.2.5. Aspectos relevantes de los principales virus de la papa presentes en México.....	20
2.4. Variedades de papa en México.....	21
2.5. Evaluación de la sanidad de la planta <i>in vitro</i> y el minitubérculo de papa mediante ELISA.....	25
2.6. Objetivos generales y objetivos particulares.....	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Fase de laboratorio.....	29
3.1.1. Experimento 1. Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa <i>in vitro</i>	29
3.1.1.1. Material genético.....	29
3.1.1.2. Metodología.	30
3.1.1.3. Variables medidas.....	31
3.1.1.4. Análisis estadístico.....	31
3.1.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en brotes de rodajas de papa sobre la contaminación y vigor de la planta <i>in vitro</i>	31
3.1.2.2. Material genético.....	32
3.1.2.3. Metodología	32

3.1.2.4. Variables medidas	34
3.1.2.5. Análisis estadístico.....	34
3.1.3. Experimento 3.....	34
3.1.3.1. Determinación de la sanidad de las plantas in vitro y minitubérculos de papa por medio de la técnica serológica ELISA.....	34
3.1.3.2. Material vegetal.....	35
3.1.3.3. Metodología: Protocolo para los análisis por ELISA.....	35
3.1.3.3.1. Sensibilización o cubrimiento de la placa.....	35
3.1.3.3.2. Captura del antígeno por el anticuerpo fijado en la placa .	38
3.1.3.3.3. Adicionar el conjugado (anticuerpo-fosfatasa alcalina).....	43
3.1.3.3.4. Adicionar el sustrato para la reacción de la fosfatasa alcalina.....	44
3.1.3.3.5. Terminología utilizada en ELISA.....	46
3.2. Fase de invernadero.....	49
3.2.1. Experimento 4	49
3.2.1.1. Producción de minitubérculos a partir de plantas <i>in vitro</i> envejecidas.....	49
3.2.1.2. Material genético.....	49
3.2.1.3. Metodología.....	49
3.2.1.4. Variables medidas.	50
3.2.1.5. Análisis estadístico.....	50
3.2.2. Experimento 5.....	50
3.2.2.1. Evaluación de diferentes densidades de plántulas provenientes de microtubérculos en la producción de minitubérculo de papa en la variedad Atlantic.....	50
3.2.2.2. Material genético.....	50
3.2.2.3. Metodología.....	51
3.2.2.4. Variables medidas.....	51
3.2.2.5. Cosecha.	51
3.2.2.6. Análisis estadístico.....	51

3.3. Fase de campo.....	52
3.3.1. Experimento 6.....	52
3.3.1.1 Efecto en el tamaño del minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla en la categoría Básica.....	52
3.3.1.2. Material genético.....	52
3.3.1.3. Metodología.....	53
3.3.1.4. Cosecha general y experimental.....	54
3.3.1.5. Variables medidas	54
3.3.1.6. Análisis estadístico.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
4.1. Fase de Laboratorio.....	56
4.1.1. Experimento 1. Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa <i>in vitro</i>	56
4.1.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en la siembra <i>in vitro</i> de rodajas de papa de la variedad alfa en la eliminación de contaminantes endógenos.....	63
4.1.3. Experimento 3. Determinación de la sanidad de las plantas <i>in vitro</i> y minitubérculos de papa por medio de la técnica serológica ELISA.....	67
4.2. Fase de invernadero.....	70
4.2.1. Experimento 4 Producción de minitubérculo a partir de planta envejecida.....	70
4.2.2. Experimento 5. Efecto de densidad en la producción de minitubérculo a partir de microtubérculos de papa brotados en la variedad Atlantic.....	70
4.3. Fase de campo.....	73
4.3.1. Experimento 6. Efecto del tamaño del minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla en la categoría Básica.....	73
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	78
5.1. Fase de Laboratorio.....	78
5.1.1. Experimento 1. Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa <i>in vitro</i>	78

5.1.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en brotes de rodajas de papa sobre la contaminación y vigor de la planta <i>in vitro</i>	79
5.1.3. Experimento 3 Determinación de la sanidad de las plantas <i>in vitro</i> y minitubérculo de papa mediante la técnica serológica ELISA.....	80
5.2. Fase de invernadero.....	80
5.2.1. Experimento 4 Producción de minitubérculos a partir de plantas <i>in vitro</i> envejecida.....	80
5.2.2. Experimento 5. Evaluación de diferentes densidades de plantulas provenientes de microtubérculos en la producción de minitubérculo de papa en la variedad Atlántic.....	81
5.3. Fase de campo.....	82
5.3.1. Experimento 6. Efecto en el tamaño del minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo - semilla en la categoría Básica.....	82
VI. LITERATURA CITADA.....	83



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Con el objetivo de contribuir a la integración de las fases de laboratorio, invernadero y campo para la producción de tubérculo semilla de papa en el Noreste de México, del 27 de agosto de 1997 al 15 de agosto de 1999, se condujeron trabajos experimentales, en la Facultad de Agronomía de la UANL en Marín y en la Ascensión, Aramberri N. L., México y en las instalaciones de la empresa High Breeding en Marín N. L., México. En la fase de Laboratorio se demostró que: a) el uso de tapas de polietileno de alta densidad permiten un mejor crecimiento de la planta *in vitro* en vez de las tapas convencionales y facilita la etapa de preaclimatación, b) el uso de rodajas con brote de tubérculos de papa tratadas con fungicida no reducen la contaminación en el establecimiento de explantes respecto al procedimiento tradicional, y c) se demostró por la técnica serológica ELISA que los tubérculos donantes de explantes, la planta *in vitro* y el minitubérculos estuvieron libres de virus. En la fase de invernadero se demostró que es posible utilizar planta *in vitro* envejecida para la producción de minitubérculo y que se pueden cosechar de 5.3 a 6.5 minitubérculos en una maceta de plástico sembrada con 4 a 5 plántulas obtenidas de microtubérculo. En la fase de campo los minitubérculos de calibre #3 y #4 produjeron los mejores rendimientos de tubérculo semilla en primera generación de campo ó Básica, respecto a los otros calibres evaluados. Es posible integrar las tres fases de producción de tubérculo semilla de papa, sembrando en las localidades bajas a fines del verano y en localidades altas en primavera en el Noreste de México.

SUMMARY

In order to contribute to integrate the phases of laboratory, greenhouse and field, to produce potato seed tuber at Northeast México, from august 27, 1997, to august 15, 1999, several experiments were conducted at Facultad of Agronomía UANL in Marín N.L., México, and La Ascención, Aramberri N. L , México. and in the facilities of High Breeding Co., at Marín, N. L., México. In the laboratory phase, it was demonstrated that: a) the use of high density polietilene caps let a better in vitro plantlet growth instead of regular caps, and facilitate preacclimation respect to conventional procedure, and c) by ELISA it was demonstrated that the explant from donor tubers, in vitro plantlets and minitubers were virus free. In the green house phase it was demonstrated that it is possible to use old in vitro plantlets to produce minitubers and that it is possible to harvest up to 5.3 to 6.5 minitubers in a plastic pot planted with 4 to 5 plants obtained from microtubers. In the field, #3 and #4 caliber minituber produced the highest first field generation or Basic seed tubers yield, respect to the other tested minituber calibers. It is possible to integrate the three phases of potato seed tuber production by planting at the end of summer in low locations and in spring at high locations of Northeast Mexico.

INDICE DE CUADROS EN EL TEXTO

	Pag.
Cuadro No. 1 Sales inorgánicas que componen el medio de cultivo para la siembra de papa <i>in vitro</i> , Murashige y Skoog (1962).	6
Cuadro No. 2 Relación de intensidad de tratamiento con calor y la eliminación de fitopatógenos en papa.	9
Cuadro No. 3 Categorías de minitubérculos en función de su tamaño (Gálvez y Lorence 1997).	14
Cuadro No. 4 Terminología por generación de material de papa en México, Canadá y en los diferentes estados de producción de los EUA. (SNICS-SAGAR, 1996).	15
Cuadro No. 5 Niveles de tolerancia permitida para algunas enfermedades y plagas en las diferentes categorías de tubérculo semilla de papa. NOM-041-FITO-1995*.	22
Cuadro No. 6 Principales virus de la papa; síntomas, hospederos, forma de transmisión y su distribución.	23
Cuadro No. 7 Objetivos particulares por experimento para alcanzar el objetivo general de integración de tecnología en las fases de laboratorio, invernadero y campo. FAUANL-HBR. 1996-1999.	28
Cuadro No. 8 Análisis de varianza de la longitud, de la planta <i>in vitro</i> en cm. FAUANL, Marín, N.L., 1997.	57
Cuadro No. 9 Análisis de varianza de número de brotes laterales, de la planta <i>in vitro</i> en FAUANL, Marín, N.L., 1997.	57
Cuadro No. 10 Análisis de varianza de número de entrenudos en la planta <i>in vitro</i> en FAUANL, Marín, N.L., 1997.	57
Cuadro No. 11 Efecto de cuatro tipos de tapas sobre la longitud de la planta <i>in vitro</i> , dentro de tres variedades de papa. FAUANL Marín N. L., 1997.	60
Cuadro No. 12 Efecto del tipo de explante en la siembra <i>in vitro</i> sobre la longitud de la planta <i>in vitro</i> . FAUANL, Marín, N. L., 1997.	60
Cuadro No. 13 Efecto de cuatro tipos de tapas sobre el número de brotes laterales de la planta <i>in vitro</i> , dentro de tres variedades de papa. FAUANL Marín N. L., 1997.	60
Cuadro No. 14 Efecto del tipo de explante en la siembra <i>in vitro</i> sobre el número de brotes laterales de la planta <i>in vitro</i> . FAUANL, Marín, N. L., 1997.	60
Cuadro No. 15 Efecto de cuatro tipos de tapas sobre el número de entrenudos de la planta <i>in vitro</i> , dentro de tres variedades de papa. FAUANL Marín N. L., 1997.	62
Cuadro No. 16 Efecto del tipo de explante en la siembra <i>in vitro</i> sobre el número de entrenudos de la planta <i>in vitro</i> . FAUANL, Marín, N. L., 1997.	62
Cuadro No. 17 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto de la longitud de la planta <i>in vitro</i> de papa, en tres tratamientos dentro de la variedad alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1997.	64
Cuadro No. 18 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto del número de entrenudos de la planta <i>in vitro</i> de papa, en tres tratamientos dentro de la variedad alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1997.	64

Cuadro No. 19 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto de número de brotes laterales de la planta <i>in vitro</i> de papa, en tres tratamientos dentro de la variedad alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1997.....	64
Cuadro No. 20 Comparación de medias en tres tratamientos en tres variables evaluadas de la planta <i>in vitro</i> de papa, en la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1997.....	65
Cuadro No. 21. Relación de muestras y nivel de absorbancia para los virus PVA, PVM, PVS y PVX en cuatro variedades de papa mediante ELISA.....	68
Cuadro No. 22. Relación de muestras y nivel de absorbancia para los virus PVY y PLRV en cuatro variedades de papa mediante ELISA.....	69
Cuadro No. 23 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar para el número de minitubérculos por bolsa en tres tipos de plántulas de papa, de la variedad alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1998.....	72
Cuadro No. 24 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto de número de minitubérculos por bolsa en cinco densidades de plántulas de papa en la variedad alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1997.....	72
Cuadro No. 25 Comparación de medias de cinco tratamientos para el número de minitubérculos por bolsa. Efecto de densidad, en la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N.L., 1998.....	72
Cuadro No. 26 Cuadrados medios y significancia para el rendimiento total de tubérculos semilla Básica y su composición por categorías comerciales en función de tres orígenes y cinco calibres de minitubérculo sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.....	74
Cuadro No. 27 Comparación del rendimiento total y para categorías comerciales de tubérculo semilla básica obtenido en base a minitubérculos de tres orígenes. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.....	74
Cuadro No. 28 Comparación del rendimiento total tubérculo semilla básica y su composición por categorías en base al calibre de minitubérculos sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.....	77
Cuadro No. 29 Comparación del rendimiento total de tubérculo semilla básica, para las 15 combinaciones de calibres y origen de minitubérculo sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.....	77

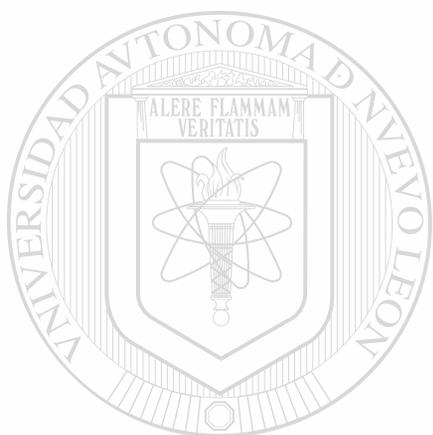
LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Datos y distribución de las muestras con su repetición en la placa de microtitulación en una prueba ELISA.....	42
Figura 2A. Preparación de una solución amortiguadora (SOLAM) de adsorción o cobertura.....	87
Figura 2B. Agregar 100µl de la gamaglobulina purificada (anticuerpo) con la ayuda de una micropipeta multicanal.....	87
Figura 3A. Lavado de la placa de microtitulación con la ayuda de una pizeta.	87
Figura 3B. Secado de la placa de microtitulación golpeando con firmeza sobre el papel secante hasta eliminar la SF+T	88
Figura 4A. Macerado del tejido se coloca en bolsa de plástico con la SOLAM de extracción	88
Figura 4B Macerado del tejido en forma mecánica en un macerador tipo taladro.....	88
Figura 4C. Se toman 100µl de tejido macerado con una micropipeta.....	89
Figura 4D. Se agregan 100 uL de tejido macerado a un pocillo de la placa de microtitulación con su repetición, y con una micropipeta.....	89
Figura 4E. Incubación de la placa de microtitulación.....	89
Figura 5 A. Dilución del conjugado enzimático en una SOLAM de reactivo.	90
Figura 5B. Agregar 100µl del conjugado enzimático a cada pozo de la placa de microtitulación con una micropipeta multicanal.....	90
Figura 6A. Diluir la pastilla de P - Nitrofenil Fosfato (PNP) en una SOLAM de sustrato.....	90
Figura 6B Adicionar 100µl de la solución de sustrato a cada pocillo de la placa de microtitulación con una micropipeta multicanal.....	91
Figura 7A. Medición de la reacción mediante un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 405 y 620 nm.....	91

I. INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* L., es originaria de la región montañosa de los andes en América del Sur, es un cultivo alimenticio de importancia mundial en la dieta del hombre y en muchos casos es básico, tiene usos forrajeros e industriales; ocupa el cuarto lugar en el mundo entre las plantas cultivadas y ocupa una gran cantidad de mano de obra para su producción. En México la superficie sembrada con papa en el período 90-96 fue de 181,654.41 ha. y la superficie cosechada 67,777.15 ha., con una producción nacional de 1'204,510 ton. y un rendimiento promedio nacional de 21.17 ton.ha⁻¹. Este cultivo a recibido inmensamente la influencia de los avances científicos y técnicos y ha sido mejorado en aspectos como el rendimiento, la calidad, el control de plagas y enfermedades, en la conservación e industrialización, lo que ha incrementado los rendimientos pero también los costos de producción. El cultivo presenta un gran número de problemas fitosanitarios, los cuales comienzan desde la siembra cuando se utiliza tubérculo semilla infectado por diversos fitopatógenos, obteniéndose a la emergencia un cultivo con plantas enfermas, caro por su control y de bajo potencial de rendimiento, por lo que el agricultor a reconocido que el sembrar tubérculo de papa libre de enfermedades y plagas, es determinante para obtener un cultivo sano que con un buen manejo garantizará un alto rendimiento en campo y menores costos de producción. En México hay un déficit de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria que se haya producido bajo la tecnología moderna que integra trabajos del laboratorio, invernadero y campo; por ello, en el presente estudio, se estableció como objetivo general llevar a cabo un conjunto de trabajos experimentales para integrar estas tres fases de la producción moderna de tubérculo

semilla de papa, particularmente bajo las condiciones del Noreste de México, donde el cultivo de la papa presenta los rendimientos más altos del país (40-50 ton. ha⁻¹), resultado de una alta tecnología en su manejo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fase de laboratorio

2.1. 1. La producción moderna de tubérculo semilla sano de papa

El cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y ápices de papa es una técnica que es ampliamente utilizada en la obtención de plantas libres de enfermedades, las cuales se mantienen *in vitro* para la conservación de germoplasma, para el intercambio internacional de material genético y como apoyo en la propagación masiva de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética (Hawkins, 1992).

La producción moderna de tubérculo semilla de papa libre de patógenos que se utiliza en la producción comercial de campo tiene tres fases: a) obtención y multiplicación rápida de plantas *in vitro* libre de enfermedades, b) siembra bajo invernadero de la planta sana *in vitro* para la obtención de minitubérculos sanos y c) producción en campo de tubérculo semilla sano en la categoría Certificada, para una distribución en siembras comerciales la cual se logra, a partir del minitubérculo y siembras sucesivas para obtener semilla Básica, Registrada (R), RI, RII, RIII y Certificada, esta ultima para producción de tubérculo para consumo (Valdés 1995).

2.1.2. Procedimiento general para la obtención y multiplicación de papa *in vitro* sana.

La obtención y multiplicación de papa sana *in vitro*, en su primer fase de la producción de tubérculo-semilla se lleva a cabo en el laboratorio y se inicia con la siembra de una sección de tejido vegetal de la papa, llamado explante, en un medio de cultivo artificial, el cual bajo condiciones de esterilidad y los apropiados requerimientos de temperatura y luz, crece para dar origen a una plántula *in vitro* en

poco tiempo, que es seccionada en microestacas, las cuales son subcultivadas nuevamente y así sucesivamente hasta tener tantos miles de plantas *in vitro* como se hayan planeado (Gálvez y Lorence, 1997).

2.1.2.1 Medio de cultivo para la multiplicación de papa *in vitro*

El medio de cultivo semisólido más utilizado para la multiplicación de explantes sencillos, se denomina MS dado que fué desarrollado por Murashige y Skoog en 1962; sus constituyentes inorgánicos y orgánicos se muestran en el Cuadro No. 1 (Murashige y Skoog, 1962).

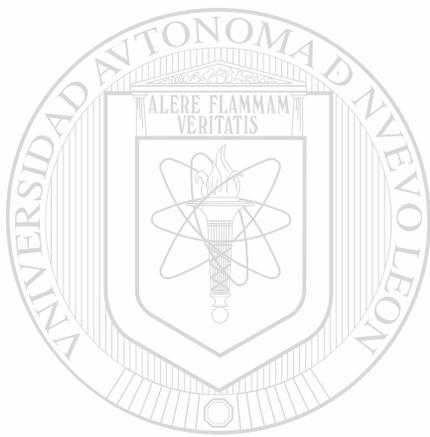
2.1.2.2. Establecimiento de plantas *in vitro*

Para la obtención de las primeras plantas *in vitro* sanas, se toman como explantes ápices de las yemas apicales y axilares de una planta visualmente sana o de los brotes de un tubérculo visualmente sano, los ápices son cuidadosamente lavados y desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% para luego enjuagar con agua estéril y sembrarlos en tubos de ensaye u otros contenedores con el medio MS de cultivo, previamente esterilizado. Este trabajo se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, lográndose esto en un ambiente que ha sido previamente aseado y desinfectado con hipoclorito de sodio (NaClO) al (0.05%) ó alcohol al 6%, efectuándose la siembra de los ápices en el medio, en una campana de flujo laminar (CIP, 1997).

2.1.2.3. Crecimiento de la planta de papa *in vitro*

Una vez establecido el explante, los ápices inician rápidamente la brotación y en dos a cuatro semanas se obtiene una planta *in vitro* con seis o siete nudos. Las

plántulas *in vitro* son seccionadas en microestacas con una ó dos yemas para ser transferidas nuevamente a recipientes con medio de cultivo MS estéril y así sucesivamente para incrementar la cantidad de plantas *in vitro* hasta obtener un total preestablecido (Espinosa et. al, 1992).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 1 Sales inorgánicas que componen el medio de cultivo para la siembra de papa *in vitro*, Murashige y Skoog 1962.

Macronutrientes	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	---
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	---
Micronutrientes	
	mg/L
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
MnSO ₄ H ₂ O	—
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Componentes orgánicos	
	mg/L
Inositol	100
Tiamina Hcl	0.5
Acido giberelico GA ₃	100
Sacarosa	20,000
agar	4000
pH	5.7

2.1.2.4. Condiciones ambientales en el cultivo de tejidos en papa

Las plántulas de papa *in vitro* se mantienen y crecen bajo las condiciones de temperatura de 18 a 22°C, un fotoperíodo de 16 horas luz, una humedad relativa del 60 al 70% y una intensidad lumínica de 1200 lux (Gálvez y Lorence 1997).

2.1.3. Obtención de plantas *in vitro* sanas

En México se pueden obtener plantas libres de enfermedades si se importan de empresas especializadas privadas o gubernamentales, de Estados Unidos y Canadá así como de producción nacional, los precios van de \$ 0.25 USD a \$ 0.35 USD. Otra forma de obtener plantas sanas *in vitro* es a partir de minitubérculo sano nacional o importado el cual ha sido indexado por algún laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario acreditado ante la SAGARPA. Los ápices de los brotes de minitubérculo indexado serán los explantes a partir de los cuales se logrará establecer y producir plántulas sanas de papa *in vitro*, esto se ha logrado en el Proyecto SYREYES 95/034 FAUANL-HBR (Gálvez y Lorence 1997).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una alternativa adicional consiste en proceder al uso de las técnicas de saneamiento por extracción de los meristemos de los ápices de brotes ó yemas axilares después de, al someter las plantas de papa a las técnicas de termoterapia, quimioterapia o electroterapia, las cuales permiten obtener ápices ó meristemos sanos con alta frecuencia y de ellos plantas *in vitro* sanas, incluso a partir de una planta infectada por virus (Valdés 1995).

2.1.3.1. Extracción de meristemas.

El meristemo es un tejido indiferenciado localizado dentro del ápice de un brote o yema axilar ó apical en crecimiento, generalmente observándose bajo el microscopio como una estructura brillante en forma de domo, su medida es menor a 0.1 mm de longitud y en constante división celular, se asume que está libre de virus por carecer aún de los vasos del floema bien diferenciados, impidiéndose así la presencia de partículas vírales en el meristemo al no moverse del tejido infectado de una planta enferma, al tejido sano en formación. (Lizárraga, 1991).

2.1.3.2. Termoterapia

Consiste en la aplicación de calor al tejido vegetal en crecimiento, buscando márgenes térmicos en los cuales las plantas se recuperen, en tanto que el ARN del virus se desnaturaliza o se dificulta su replicación después del tratamiento. Para un virus ó un fitoplasma, existen niveles de temperatura y tiempos de exposición, los cuales han dado mejor resultado en la eliminación de estos fitopatógenos, excepto los viroides, en los tejidos infectados (Lozoya, 1995), estos niveles de temperatura y tiempos de exposición se presentan en el Cuadro No. 2, (Lizarraga, 1991).

2.1.3.3. Quimioterapia

Aun cuando no existen "viricidas" o productos que eliminen a los virus fitopatógenos directamente en el tejido infectado, se han identificado sustancias de acción directa y específica que actúan en contra de su replicación, tal es el caso del Ribavirin, el cual aplicado al medio de cultivo en el cual crecen las

plantas *in vitro* infectadas por virus, interfiere en la replicación viral, permitiendo que los meristemos crezcan libres de virus, tales meristemos se toman como explantes para la producción de plantas *in vitro* libres de virus (Lozoya, 1995)

2.1.3.4. Electroterapia

Es la aplicación de corriente eléctrica la cual aumenta la temperatura del tejido vegetal por lo que podría ser una alternativa para el saneamiento de material vegetal infectado con virus, esta técnica es combinada con el cultivo de tejidos para multiplicar el material tratado, (Lozoya, 1995).

Cuadro No. 2. Relación de intensidad de tratamiento con calor y la eliminación de fitopatógenos en papa.

Patógeno	°C	Tiempo	Tejido
Punta Morada *	36	6 días	Tubérculo
Enrollamiento (LRV)	50	17 minutos	Tubérculo
	37.5	15-30 días	Tubérculo
	PVY	38	7 días
PVA	35	14 días	Tallo-c.t
PVX	35	15 semanas	Tallo-c.t.
	35	13 semanas	Tubérculo- c.t.
PVS	35	6 semanas	Tallo-c.t
	35	13 semanas	Tubérculo- c.t.
PSTV***	40	3 semanas	Tallo-c.t-
	35	39 días	Tubérculo

(*) Fitoplasmas fácilmente eliminable.

(**) Termoterapia con cultivo de tejidos.

(***) Víroide no eliminado.

2.1.4. Verificación de la fitosanidad de las plantas *in vitro* de papa

Las técnicas modernas para evaluar la fitosanidad para virus, bacterias y fitoplasmas, tanto de la fuente de explantes como de las plantas *in vitro* una vez establecidas, son: la técnica serológica ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción con Enzima Ligada) y la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); sin embargo, también se utilizan técnicas tradicionales como el uso de plantas indicadoras diferenciales, medios de cultivo diferenciales y específicos para el caso de bacterias y hongos respectivamente. El conocer la fitosanidad del material vegetal permite continuar la propagación masiva de las plántulas de papa *in vitro* que han presentado un alto grado de calidad fitosanitaria, al estar libre de patógenos de importancia, los cuales son definidos en las normas fitosanitarias, para el caso de México la NOM-041-95 establecida por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SAGAR (SAGAR, 1996).

2.1.5. Multiplicación masiva de planta *in vitro* sana

Tal como se explicó en la sección anterior, independientemente del origen de la planta *in vitro* que se asume como sana, es recomendable la confirmación de su fitosanidad en un laboratorio autorizado para el efecto; para contar con la seguridad de tener plantas *in vitro* libres de enfermedades, para con ellas dar inicio a un programa de multiplicación masiva (SAGAR 1996).

La multiplicación masiva de las plantas *in vitro* sanas se logra mediante el corte del tallo en microestacas con una o dos yemas axilares, las cuales son transferidas al medio de cultivo descrito en la sección 2.1.2.3. En los subcultivos no

es necesaria la desinfección de las microestacas como en el caso de los explantes en la etapa de establecimiento sección 2.1.2.2.; sin embargo, la asepsia debe ser mantenida en el área de trabajo como se explica en la sección 2.1.4. y en todo el material y equipo de trabajo con la combinación de cloro (NaClO) al 2% y alcohol etílico al 70% flameado con la ayuda de un mechero, o bien el uso de hipoclorito de sodio al 2% y para la limpieza del área de trabajo e instrumental para siembra. Deberá esmerarse el aseo personal antes del inicio del trabajo de subcultivo, y utilizar tapabocas y gorra (Valdés 1995).

Al cabo de tres a cinco semanas la microestacas subcultivadas en medio de cultivo de multiplicación, se han convertido en nuevas plántulas *in vitro* para un siguiente subcultivo; como una regla general es recomendable no subcultivar por más de diez veces a partir del mismo explante, dado que algunos autores han observado que se puede presentar variación somaclonal, esto es, pueden obtenerse plantas *in vitro* las cuales presenten un genotipo diferente al de la planta original o planta donadora del explante, que es la que se desea micropropagar.

El número inicial de plantas *in vitro* a subcultivar depende de un programa previo de multiplicación masiva, en el cual se establece la cantidad de plantas *in vitro* a producir, dependiendo de los propósitos a alcanzar, ya sean de producción o de investigación (Valdés, 1998)

2.2. Fase de Invernadero.

El objetivo en esta segunda fase de la producción moderna para la producción de tubérculo - semilla certificada, es transferir las plantas *in vitro* a suelo o algún otro sustrato estéril ó libre de fitopatógenos en la papa, bajo invernadero para la

producción de minitubérculo. El cultivo en invernadero debe contar con un control estricto de plagas para evitar la posible presencia de insectos vectores de enfermedades virales y también de enfermedades para mantener la sanidad original de la planta *in vitro* en los minitubérculos a cosechar,.

2.2.1. Transferencia de la planta *in vitro* al suelo o sustrato en ambiente protegido.

Las plántulas sanas de papa *in vitro* para producción de minitubérculos en ambiente protegido, se obtienen en un período de crecimiento de alrededor de cuatro semanas partiendo de la continua multiplicación en tubos de ensaye, frascos de vidrio ó cajas magenta, siendo transferidas al final de su crecimiento *in vitro*, directamente al suelo ó a bolsas ó cajas de plástico con un sustrato estéril, generalmente es utilizado el musgo asfángico ó composta mixta, bajo ambientes protegidos como son desde invernaderos sofisticados con control ambiental, invernaderos con mallas ó microtúnel con tela antiáfidos en clima favorable. Para un trasplante, las plantas *in vitro* deben tomarse con cuidado para evitar daños a las raíces, eliminar con agua limpia el resto del medio nutritivo artificial y al trasplante asegurar un buen contacto entre raíces y el sustrato de siembra (CIP 1992).

Dado que las plantas *in vitro* tienen un alto contenido de agua en el tejido, en la etapa de aclimatación deben de mantenerse en un ambiente con una humedad relativa alta durante los primeros días. Las plantas *in vitro* para trasplante directo en invernadero, deben ser de 3.5 a 4.5 cm de altura, deben tener al menos tres entrenudos, tres o cuatro pares de hojas y su ápice. En general y dependiendo de la variedad, las plantas más funcionales son las que tienen las hojas más anchas y el

tono de verde es más oscuro y raicillas en cada nudo (Gálvez y Lorence, 1997, Espinosa et al, 1992) , las cuales se transplantan a 10 cm equidistantes entre cada una de ellas, esto es 100 plantas por metro cuadrado.

2.2.2. Producción y Cosecha de Minitubérculos.

El crecimiento de las plantas *in vitro* transcurre hasta su desecación artificial para la producción de minitubérculos aptos para cosecharse de 70 a 100 días, dependiendo de la variedad

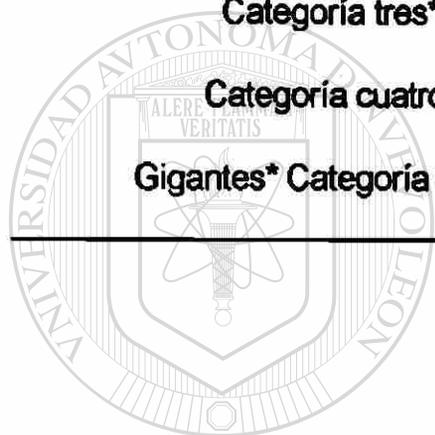
Los minitubérculos producidos en invernadero, constituyen la categoría de tubérculo semilla pre-elite ó prebásica, una característica importante de los minitubérculos es su tamaño, en base al cual se han establecido categorías, las cuales varían poco entre autores, Cuadro No. 3.

.2.3. Fase de campo

La fase de campo tiene como objetivo final producir el tubérculo - semilla en categoría Certificada, como resultado de cultivar subsecuentemente en el campo el minitubérculo producido en el invernadero para obtener las categorías: Básica, Registrada, (R), RI, RII, RIII y Certificada. Lo anterior implica que para el caso de México, partiendo del minitubérculo, son seis generaciones autorizadas en campo para cosechar tubérculo - semilla en la categoría Certificada (SNICS - SAGAR, 1996); en el Cuadro No. 4 se muestran las equivalencias de las categorías de tubérculo semilla en México respecto a Canadá y algunos estados de la Unión Americana, en el cual se observar que en todos los casos se autorizan seis generaciones en campo excepto en Montana y Utah en donde sólo se autorizan cinco generaciones (SNICS - SAGAR, 1996).

Cuadro No. 3 Calibres del minitubérculos en función de su tamaño Gálvez y Lorence (1997) (*), Obtenidos en invernadero Valdés y Moreno (1998) ().**

CATEGORÍA	TAMAÑO (diam. en cm)
Perlita (**)	< 0.8
Categoría cero*	0.8 a 1.4
Categoría uno*	1.5 a 1.7
Categoría dos*	1.8 a 2.5
Categoría tres*	2.6 a 3.5
Categoría cuatro*	3.5 a 4.5
Gigantes* Categoría cinco**	4.6 en adelante



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 4 Terminología por generación de material de papa en México, Canadá y los diferentes estados de producción de los EUA (SNICS-SAGAR, 1996).

ESTADO	ORIGEN (Anterior a campo)	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años	6 años
México	Lab. Gh*	Básica	Registrada	Registrada I	Registrada II	Registrada III	Certificada
Canadá	Lab. Gh*	Pre-Elite	Elite 1	Elite 2	Elite 3	Fundación	Certificada
Alaska	Lab. Gh*	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5	Generación 6
California	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Fundación	Certificada
Colorado	Lab. Gh*	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5	Generación 6
Idaho	Lab. Gh*	Nuclear	Elite	Elite	Elite	Fundación	Certificada
Maine	Lab. Gh*	Nuclear 1	Nuclear 2	Nuclear 3	Generación 1	Generación 2	Generación 3
Michigan	Lab. Gh*	Nuclear 3	Generación 1	Generación 2	Fundación	Fundación	Certificada
Minnesota	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Montana	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	-----
Nebraska	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Fundación/FA	Certificada
New York	Lab. Gh*	Seed Plot	Fundación/ Uhlein Farm	Fundación/ Uhlein 1	Fundación/ Uhlein 2	Fundación/ Uhlein 3	Fundación
North Dakota	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Oregon	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	Generación 5
Utah	Lab. Gh*	Nuclear	Generación 1	Generación 2	Generación 3	Generación 4	-----
Wisconsin	Lab. Gh*	Univ. Farm	Univ. Farm	Fundación	Fundación	Fundación	Fundación

* Laboratorio e Invernadero, minitubérculos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LEÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES

2.3.1. Producción de tubérculo semilla Básica de papa o primera generación en campo

En la producción de semilla básica, el objetivo es transferir al campo los minitubérculos producidos en invernadero, los cuales en su primera fase de laboratorio se obtuvieron de plantas *in vitro* libres de enfermedades, o bien producir tubérculo semilla básica a partir de un trasplante de planta *in vitro* sana directamente al campo, situación poco frecuente.

2.3.1.1. Uso del minitubérculo

Para sembrar una hectárea de minitubérculos en campo se requieren de 50 a 55 mil unidades, bajo una distancia entre surcos de 0.92 m y cinco minitubérculos por metro lineal. Se pueden producir de 18 a 25 ton ha⁻¹ de tubérculo semilla Básica en lugares cálidos, y de 25 a 30 ton ha⁻¹ en lugares templados (Gálvez y Lorence, 1997).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Es necesario tener especial cuidado con los tubérculos de categorías pequeñas ya que se recomienda enterrarse a mano, entre dos y tres veces su diámetro de profundidad. Los minitubérculos no deben tener daños físicos o "monos", es importante estar fisiológicamente maduros y brotados para obtener una emergencia uniforme. Son más lentos en su emergencia que las papas normales, ya que tardan una o dos semanas más, siendo la temperatura, el factor más importante que afecta la edad fisiológica de un minitubérculo; a mayor temperatura, la edad fisiológica será mayor, esto es, el minitubérculo estará más deteriorado (Gálvez y Lorence, 1997).

La semilla prebásica o minitubérculo y la semilla básica se producen generalmente en pequeña escala y en zonas aisladas, lejos de las zonas de producción comercial y libres de cuarentena, las cuales, son fácilmente supervisadas e inspeccionadas. (Van der Zaag, 1987).

2.3.1.2. Transplante de la planta *in vitro* sana directamente en campo.

Aunque, como anteriormente se ha mencionado, el transplante es poco frecuente, la fase de aclimatación en el invernadero puede obviarse y las plantas *in vitro* pueden transplantarse directamente en el campo, usando hileras de gramíneas para protección contra insectos, después del trasplante, los días largos son favorables para la formación de raíces y estolones, lográndose en este caso la producción de tubérculo semilla en la categoría Básica. En esta etapa, se debe manejar de manera estricta el control de insectos vectores de virus y la presencia de enfermedades producidas por bacterias y hongos, esto permitirá cosechar tubérculos libres de enfermedades en la categoría Básica, correspondiente a la primera generación en campo (Atlantic Canada Potato Guide, 1993).

2.3.2. Producción de tubérculo semilla de papa certificada.

A partir de la semilla Básica, se requieren de cinco años o cinco ciclos agrícolas para producir tubérculo semilla certificada para usarse en la producción comercial de papa. (Van der Zaag, 1987). Es importante que el estándar de fitosanidad del tubérculos semilla Básica hasta Certificada sea alto; y así mantener una constante producción de semilla sana en las explotaciones de semilla Certificada. (Bryan et al, 1991).

2.3.2.1. La región para producción de tubérculo semilla de papa.

El suelo en el campo para la producción de tubérculo semilla de papa debe estar libre de patógenos que puedan ser transmitidos al tubérculo (Vargas, 1994), durante la etapa de crecimiento del cultivo. Las regiones seleccionadas para la producción de tubérculo semilla de papa deben estar libres de fitopatógenos y aislados de otras siembras comerciales de papa. Las zonas deben ser con un rendimiento potencial alto y permitir en el periodo de crecimiento mayor a 70 días. (Van der Zaag, 1987).

2.3.2.2. La temperatura en la producción de tubérculo semilla de papa

Por lo general se acepta que la siembra de tubérculo semilla debe ser en un suelo con una temperatura alrededor de los 32°C cuando comienza a emerger, las temperaturas altas en el final de la etapa de crecimiento pueden afectar adversamente la calidad fitosanitaria y el vigor del tubérculo semilla. La duración del periodo de crecimiento puede acortarse defoliando, lo cual permite prevenir que las enfermedades foliares se extiendan a los tubérculos. (Van der Zaag, 1987).

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan la edad fisiológica del tubérculo semilla (Atlantic Canadá Potato Guide, 1993). El desarrollo diario del tubérculo depende en gran medida de las temperaturas del día y de la noche y del suministro de agua. La temperatura óptima para la producción de papa es de 20-25°C durante el día y de 10-15°C en la noche. (Van der Zaag, 1987).

Las bajas temperaturas durante el día no afectan mucho al crecimiento. A temperaturas cercanas a 25°C la producción puede ser razonable, si el suministro de

agua es suficiente; a los 35°C la producción por lo general es menor. (Van der Zaag, 1987).

La duración del período de crecimiento está determinada con frecuencia por la temperatura prevaleciente. Las noches frías al comienzo del período de crecimiento son muy perjudiciales. Las temperaturas altas en el final de la etapa de crecimiento pueden afectar adversamente la calidad fitosanitaria y el vigor del tubérculo semilla de papa (Van der Zaag, 1987).

2.3.2.3 Tamaño del tubérculo semilla de papa.

Normalmente los calibres del tubérculo semilla Certificada comprenden entre 28 a 65 mm en variedades normales y entre 25 y 60 mm en variedades en que la longitud es más del doble de su ancho, el cual, de haberse producido bajo los cuidados de manejo antes mencionados permitirá una siembra de papa con un alto potencial de producción (Alonso, 1996).

2.3.2.4. La fitosanidad del tubérculo semilla de papa de Básica a Certificada.

En los países productores de tubérculo semilla de papa es muy importante el saneo al cultivo, el cual consiste en la eliminación de las plantas con síntomas de enfermedades, así como sus tubérculos, esto para prevenir la expansión de las mismas, por lo que esta práctica se debe hacer desde la emergencia hasta antes de la defoliación previa a la cosecha, para finalmente cosechar tubérculo semilla solamente de plantas sanas (Van der Zaag, 1987).

Un suelo ligero con buena estructura es el mejor para la producción de tubérculo semilla de papa, dado que las piedras y los terrones duros pueden causar

daños a los tubérculos, especialmente si la cosecha es mecanizada, el daño mecánico de los tubérculos a la cosecha es la causa de la infección por patógenos a través de las heridas y daños por enfermedades en bodega (Van der Zaag, 1987).

La Norma Mexicana exige una cierta fitosanidad del tubérculo semilla de papa, en las diferentes categorías, tal fitosanidad se da en el Cuadro No. 5, y como se observa, las bacterias que producen las enfermedades pierna negra y marchitez, así como el nemátodo dorado deben estar ausentes, siendo la tolerancia para los virus PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV del 0.2% y para el PVX de 0.4%.

2.3.2.5. Aspectos relevantes de los principales virus de la papa presentes en México.

En el cultivo de la papa uno de los principales problemas fitosanitarios son los virus debido a la forma de distribución, transmisión y su distribución geográfica. Los virus más importantes en México, dado que el tubérculo semilla tanto de importación como de producción nacional se exige por la NOM-041-FITO-1995, que esté prácticamente libre de ellos son los siguientes: PVX, PVY, PVA, PVS, PVM Y PLRV. Algunos aspectos relevantes referentes a estos virus han sido presentados por Lozoya, (1995) y estos se dan en el Cuadro No. 6 en el cual se puede observar que:

- 1 Es difícil distinguir entre los virus únicamente por sus síntomas.
- 2 Todos tienen como hospedero a especies de la familia solánaceas.
- 3 Excepto PLRV, en mayor o menor grado todos los virus se transmiten mecánicamente.
- 4 Excepto PVX, todos los demás virus se transmiten por áfidos.

5. En ninguno de los virus se ha reportado transmisión por semilla.
- 6 La reacción serológica no es uniforme entre los virus
- 7 Todos los principales virus de la papa son de ARN y de tipo varilla excepto para PLRV.
- 8 Todos estos virus están presentes en México.

Por lo anterior, la única forma de identificación plena de estos virus es mediante las técnica serológica ELISA ó PCR

2.4. Variedades de Papa en México.

Por consulta con productores de papa en México, el número de variedades más utilizadas es pequeño, particularmente por las exigencias del mercado para consumo fresco y por la industria del freído. Las variedades más usadas se describen a continuación (Valdés, 1998)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 5 Niveles de tolerancia permitida para algunas enfermedades y plagas en las diferentes categorías de tubérculo semilla de papa. NOM-041-FITO-1995. *

Problema fitosanitario	Niveles de tolerancia permitidos					
	Básica	Registradas				Certificadas
Plagas B	B	R	RI	RII	RIII	C
Virus X de la papa	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%	3.0%
Virus Y de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus A de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus M de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus S de la papa	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV)	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	1.0%
Pierna negra (<i>Erwinia carotovora pv. atroseptica</i>)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Pudrición de los tubérculos **1	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
<i>Streptomyces scabies</i>	0.5%	0.5%	1.0%	2.0%	2.0%	3.0%
<i>Spongospora subterranea</i>	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	2.0%	3.0%
Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>)	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	2.0%	3.0%
Plagas 2						
Nemátodo dorado (<i>Globodera rostochiensis</i>) ***2	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Marchitez bacteriana (<i>Pseudomonas solanacearum</i>)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

* Formato modificado para su presentación en este escrito

Para plagas A1, la tolerancia son de 0.0%

**1 Porcentaje de peso del tubérculo

***2 Número de quistes por 200 g de suelo

Cuadro No. 6. Principales virus de la papa; síntomas, hospederos, forma de transmisión y su distribución.

	PVX	PVS	PVY	PLRV	PVA	PVM
Síntomas en papa	Desde asintomático hasta necrosis, mosaico ligero	Asintomático, mosaico ligero o clorosis	Moteado, necrosis sistemática y de las venas.	Enrollamiento foliar, coriacea necrosis vascular brote fino	Mosaico ligero rugosidad en el margen de la hoja.	Moteado, mosaico, enrollamiento, enanismo.
Hospedante	Solanáceas principalmente	Solanáceas principalmente	Solanáceas principalmente ^e	Solanáceas principalmente	Solanáceas	Limitada a algunas Solanáceas
Transmisión mecánica	Fácil y única	Hojas jóvenes solamente	Limitada	No	Con dificultad	Sí
Vectores	No reportados	Afidos de estilote	Afidos de estilote	Afidos circulativos	Afidos de estilote	Afidos de estilote
Transmisión por semilla	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada	No reportada
Reacción serológica	Mosaicos del trébol, cactus x potex	PVM y del grupo Carla	Variantes comunes y necróticas del mismo virus	Variantes del mismo virus	Miembros del grupo POTY	Distanciada con latente del clavel, PVS, B del crisantemo
Partícula	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN	Isometría ARN	Varilla flexible ARN	Varilla flexible ARN
Distribución geográfica	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	Solo en país con papa	Solo en país con papa

Fuente: Lozoya Saldaña, (1995)

Alfa: la forma del tubérculo es oval; con ojos poco profundos; piel, amarilla; pulpa, amarillo suave, flores malva, muy abundantes, tarda en desarrollarse. El rendimiento es alto; gravedad específica media; maduración tardía, 120 días; resistente a la enfermedad de la verruga; resistencia moderada a la defoliación tardía y a la polilla común de la papa, muy susceptible al virus del enrollamiento de la hoja (PLRV) y al virus Y de la papa (PVY). Poca brotación en almacenamiento. (Hettema S/F).

Mondial: Origen genealógico. Spunta x SVP Ve66-295. La maduración es semitardía en Europa del Norte, semitemprana en Medio Oriente y Norte de Africa. Los tubérculos son de forma oval alargada, ojos superficiales, piel amarilla, pulpa amarilla clara. Tamaño uniforme y alto rendimiento. El follaje con rápido desarrollo y alto grado de cobertura en el terreno, y flor blanca. Resistente al nemátodo dorado (*Globodera rosotochiensis*), inmune a la sarna verrugosa, algo sensible a *Phytophthora infestans* de la hoja y poco sensible a la del tubérculo, poco resistente al virus del enrollamiento de la hoja, resistente a los virus A de la papa (PVA) y al virus X de la papa (PVX), sensible a la sarna común de la papa (*Streptomyces scabies*), algo sensible al *Fusarium*. Requiere un aporte moderado de nitrógeno y distancia grande entre plantas, buena conservación, firme al cocer, resistente a la sequía (Hettema S/F).

Atlantic. La Forma de tubérculo es oval o redondo; ojos poco profundos; piel delgada o gruesa, pulpa blanca; para siembra se utilizan tubérculos de tamaño grande y mediano, tienen hojas grandes, flores, lavanda. El rendimiento es alto; gravedad específica, alta; maduración temprana. Tiene Resistencia cero a la

defoliación tardía; resistencia al nemátodo dorado; inmune al virus X de la papa (PVX) y a necrosis de tubérculo, tolerante a escarabajo común (*Hettema S/F*).

Otras variedades que se han sembrado son: Norteña, Gigant, Carola, Snowden, etc, siendo últimamente de interés las variedades Premier, Adora y Morene por ser precoces y de alta calidad para el mercado nacional y para la industria.

2.5. Evaluación de la sanidad del material de papa mediante ELISA

La NOM -041- FITO - 1995 (Proyecto de Norma Oficial Mexicana) establece los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la inspección y Certificación Fitosanitaria de planta *in vitro*, minitubérculo y tubérculo semilla de papa mediante ELISA, para los casos de los virus PVY, PVX, PVS, PVA, PVM, y PLRV, así como para la bacteria *Clavibacter michiganensis pv. sepedonicum*, causante de la pudrición anular de la papa.

— La prueba de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas o ELISA (Enzyme Linked Inmunosorbent Assay), es un método confiable y rápido para la detección de agentes fitopatógenos, ya que hace posible la detección de cantidades muy pequeñas de estos agentes en los órganos de las plantas y además permite estimar la concentración de los fitopatógenos en el tejido enfermo (Cruz y Farías, 1997).

La sensibilidad de ELISA es superior a otras pruebas serológicas como la aglutinación, y la reacción de la precipitina, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas (Cruz y Farías, 1997)

Las pruebas serológicas como ELISA están basadas en la capacidad que tienen los agentes fitopatógenos (antígeno) para desencadenar la producción de inmunoglobulinas (anticuerpo) cuando son inyectados en organismos de sangre caliente. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con la proteína del patógeno inyectado.

Actualmente existe una gran variedad de anticuerpos ligados a enzimas que se encuentran comercialmente disponibles para detectar diferentes agentes patogénicos en órganos vegetales por medio de la técnica ELISA (Cruz y Farías, 1997).

Para obtener resultados confiables, es necesario utilizar la parte u órgano de la planta donde existan altas concentraciones de virus, generalmente, la parte foliar en crecimiento es la más empleada para detectar agentes fitopatógenos, para detectar virus en tubérculos de papa se recomienda hacer un muestreo en yemas o de preferencia los brotes en crecimiento. (Peralta y Frías, 1987).

Para la fijación del antígeno por el anticuerpo; se toman 100 µl de macerado de tejido y se agregan a un pocillo de la placa (Figura 4 B apéndice) debe utilizarse una puntilla para cada muestra. Normalmente pueden utilizarse todas las celdillas de la placa, pero la experiencia dicta que los pocillos de los bordes, frecuentemente producen reacciones no específicas y por ello es recomendable no utilizarlos, llenándolos con solución buffer de extracción. (Jayasinghe y Salazar, 1993).

2.6. Objetivos generales y objetivos particulares.

Habiéndose considerado que el proceso de producción de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria involucra las etapas de laboratorio, invernadero y campo, en el presente estudio se estableció como objetivo general el proponer, evaluar e integrar algunas tecnologías en cada una de las fases mencionadas, para lo cual se establecieron seis objetivos particulares, tres para la fase de laboratorio, dos para la fase de invernadero y uno para la fase de campo, estos fueron los siguientes:

Fase de laboratorio.

1. Determinar si las tapas transparentes de los recipientes de los recipientes mejoraban la calidad de la planta de papa *in vitro*.
2. Determinar si hay mejora en la calidad de la planta *in vitro*, si la contaminación exógena del explante y las siembras de papa *in vitro* se reduce con explantes de brotes tratados químicamente.
3. Determinar si el material experimental utilizado mantuvo su fitosanidad.

Fase de invernadero.

4. Definir si era posible utilizar plantas *in vitro* envejecidas en la producción de minitubérculo
5. Establecer la mejor densidad de plantas por bolsas para lograr el máximo rendimiento de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.

Fase de campo.

6. ¿Definir como el rendimiento de tubérculo semilla Básica de papa es afectado por el tamaño del minitubérculo sembrado en campo?

Cuadro 7 Objetivos particulares por experimento para alcanzar el objetivo general de integración de tecnología en las fases de laboratorio, invernadero y campo. FAUANL-HBR.1996-1999.

Fase	Fecha	Experimento y titulo	Objetivo particular
Laboratorio	27/VIII/97	Experimento 1 Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa <i>in vitro</i>	Determinar si las tapas transparentes mejoraban la calidad de la planta de papa <i>in vitro</i>
	20/IX/97	Experimento 2. Efecto del tratamiento químico en rodajas brotadas de papa y sembradas <i>in vitro</i>	Determinar si hay mejora en la calidad de la planta <i>in vitro</i> , si la contaminación exógena del explante y las siembras de papa <i>in vitro</i> se reduce con explantes de brotes tratados químicamente.
	15/VIII/99	Experimento 3. Diagnóstico mediante la técnica serológica ELISA del material utilizado en los experimentos	Determinar si el material experimental utilizado mantuvo su fitosanidad.
Invernadero	26/IX/96	Experimento 4. Producción de minitubérculos a partir de planta <i>in vitro</i> envejecida	Definir si era posible utilizar plantas <i>in vitro</i> envejecidas en la producción de minitubérculo
	26/XI/96	Experimento 5. Efecto de densidades en la producción de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.	Establecer la mejor densidad de plantas por bolsas para lograr el máximo rendimiento de minitubérculo a partir de microtubérculo brotado.
Campo	6/VI/97	Experimento 6. Efecto del tamaño del minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla Básica.	Definir como el rendimiento de tubérculo semilla Básica de papa es afectado por el tamaño del minitubérculo sembrado en campo.

III. Materiales y Métodos

Para cada uno de los seis objetivos particulares se tuvieron experimentos específicos, en estos experimentos se indicó la fase correspondiente, la fecha de establecimiento un número, título y objetivo particular asociado se presenta en el Cuadro 7.

3.1. Fase de laboratorio

3.1.1. Experimento 1: Efecto de diferentes tipos de tapas en el crecimiento de papa *in vitro*.

El experimento se realizó en las instalaciones de la empresa High Breeding (HBR), y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL.), con el objetivo particular de definir si la calidad de la planta *in vitro* podría mejorarse mediante el uso de tapas de plástico transparente.

3.1.1.1. Material genético:

Se utilizaron plantas sanas *in vitro* de las variedades Gigant, Atlantic y el Clon 5175, las cuales fueron obtenidas del banco de germoplasma del convenio HBR - FAUANL, el cual se ha venido integrando como resultado de las actividades en el Proyecto SIREYES 95/034. La fase de incubación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUANL. Las instituciones mencionadas se encuentran localizadas en el municipio de Marín, N. L.

3.1.1.2. Metodología:

Se definieron cuatro tratamientos:

Tapa 1= tapa de polietileno translúcido de alta densidad; Tapa 2= tapa de plástico sólido de color verde, marca Sigma; Tapa 3= tapa de plástico sólido semitranslúcido marca Sigma y

Tapa 4= tapa de plástico transparente flexible marca Clean Pack (no esterilizable en autoclave).

Las tapas 1 y 4, fueron seleccionadas bajo la consideración de que por ser translúcidas, permitirían lograr las condiciones *in vitro* más favorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*, en tanto que las tapas 2 y 3, son las tapas comúnmente encontradas en el mercado para los tubos de ensaye utilizados en el cultivo *in vitro*, de tejidos vegetales.

El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962) modificado según el Instituto de

 Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de las Villas, Cuba.

Se procedió a la siembra *in vitro*, para lo cual los explantes fueron tomados de las plantas *in vitro* ya existentes y se cortaron microestacas de 2 cm, identificándolos según su posición en la planta en: microestacas apicales, medias y basales, se sembró una microestaca por tubo de ensaye insertándola en el medio de cultivo por la parte basal del corte, así hasta completar nueve tubos por cada tipo de tapa y para cada una de las tres variedades, haciendo un total de 27 tubos sembrados.

3.1.1.3. Variables Evaluadas:

A los quince días después de la siembra, se midieron las siguientes variables: longitud en centímetros, número de entrenudos, número de brotes laterales y el vigor de la planta *in vitro* medido en una escala arbitraria de 4 (excelente), 3 (bueno) 2 (regular) y 1 (pobre).

3.1.1.4. Análisis estadístico

Los datos de las tres primeras variables se analizaron bajo un arreglo de tratamientos factorial 3X4X3, respectivamente para las tres variedades, para los cuatro tipos de tapas, y para los tres tipos de explantes. El análisis estadístico fué bajo un diseño experimental completamente al azar, en las variables donde se detectaran diferencias significativas, se procedió a la comparación de medias por la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) protegida de Fisher (Steel y Torrie 1980). Para la variable vigor, el análisis se efectuó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete de cómputo FAUANL de diseños experimentales (Olivares, 1993).

3.1.2. Experimento 2:

3.1.2.1. Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en rodajas de papa sobre la contaminación y el vigor de la planta *in vitro*.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de la empresa High Breeding (HBR) en Marín N. L., en asociación con la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), después del entrenamiento recibido del Dr.

Ricardo Hernández Pérez del Instituto de Biotecnología de las Plantas - Universidad Central de las Villas (IBP-UCLV), como actividad del proyecto SIREYES/95/034, con el objetivo particular de establecer si el tratamiento químico de brotes en crecimiento a utilizar como explantes, podría reducir la contaminación en el establecimiento de plantas *in vitro* de calidad.

3.1.2.2. Material genético:

El material genético utilizado fueron tubérculos brotados de la variedad Alfa de papa seleccionados de una cosecha comercial por una aparente sanidad.

3.1.2.3. Metodología.

El procedimiento de siembra consistió en lavar y desinfectar tubérculos de papa, para luego cortar rodajas con brotes y colocarlas invertidas sobre arena estéril, se efectuaron riegos con agua bidestilada y soluciones de agroquímicos. Para la siembra *in vitro* se utilizaron los ápices de los brotes de las rodajas como explantes. Se compararon en cuanto a sanidad las siembras tradicionales *in vitro* respecto a la siembra con explantes tomados de los ápices de los tubérculos brotados, de rodajas las cuales se lavaron y desinfectaron previo a la siembra.

Considerando el procedimiento general descrito, se definieron tres tratamientos T1, T2 y T3, los cuales se describen a continuación :

T1= corte del ápice del brote tomándolo directamente del tubérculo y siembra de acuerdo al procedimiento tradicional, esto es, desinfectando los brotes con hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 15% (v/v) durante 15 minutos, enjuagando con agua estéril y cortando explantes de 5 mm para posteriormente proceder a su siembra *in vitro*, todo esto en el área de siembra aséptica en una campana de flujo laminar.

T2= consistió en la excisión de rodajas de tubérculos con un brote cada una y siembra invertida de las rodajas sobre arena estéril en contenedores asépticos; las rodajas, previamente a su siembra en la arena estéril, se lavaron y desinfectaron de acuerdo al procedimiento tradicional (15% de NaClO v/v por 15 minutos), y una vez sembradas con el brote hacia abajo, se mantuvieron bajo alta humedad, mediante el riego con agua bidestilada; cuando los brotes emergieron y tenían una altura de 5 cm, se procedió al corte del ápice en una longitud de 20 mm, para utilizarlo como explante y siembra *in vitro*, previo lavado y desinfectado por el método tradicional.

Bajo este método de siembra en arena estéril se consideró que la movilización de los fitopatógenos al ápice que se utilizó como explante fuera baja y por lo tanto permitiría utilizar el ápice considerándolo libre de fitopatógenos endógenos y evitar con ello la contaminación *in vitro* por estos fitopatógenos.

T3= fue similar al T2 pero el riego de las rodajas sembradas en arena estéril se realizó con una solución que contenía un fungicida y un bactericida sistémicos, Ridomil Bravo 81 PH (metalaxil) y Agrimicin (oxitetraciclina + oxiclóruo de cobre a razón de 1.0 y 1.5 g l⁻¹), respectivamente; esto con el fin de reducir la presencia de fitopatógenos endógenos y obtener ápices libres de los mismos. Bajo este método adicionalmente, se esperó que la movilización de fitopatógenos al ápice no ocurriera o se redujera debido a la mayor tasa de división celular del tejido vegetal y menor tasa de multiplicación de los posibles fitopatógenos endógenos por efecto de los productos químicos.

Tanto los brotes como los ápices en los tratamientos una vez desinfectados se cortaron para obtener un explante de 5 mm y proceder a su siembra *in vitro*.

3.1.2.4. Variables a medir

- 1) Contaminación en el medio después de 30 días. Se clasificarán en: ausencia (1) y presencia (2)
- 2) Longitud de la planta *in vitro* en cm.
- 3) Numero de entrenudos
- 4) Vigor de la planta *in vitro* medida en la escala: 4 (excelente), 3 (bueno), 2 (regular) y 1 (pobre)
- 5) Número de brotes laterales
- 6) Formación de raíces se clasificarán en: ausencia (0) y presencia(1).

3.1.2.5. Análisis estadístico.

La variable de contaminación en el medio después de 30 días y la formación de raíces fue analizada mediante una tabla de contingencia. Se utilizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar para las variables longitud de la vitropianta, número de entrenudos y número de brotes laterales. Para la variable vigor de la planta *in vitro* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis de estadística no paramétrica; los análisis se efectuaron con el paquete de cómputo Diseños experimentales FAUANL (Olivares 1993).

3.1.3 Experimento 3.

3.1.3.1. Determinación de la sanidad de las plantas *in vitro* y minitubérculos de papa por medio de la técnica serológica ELISA.

Con el objetivo particular de determinar si la planta *in vitro* y el minitubérculo utilizados conservaron la sanidad fitosanitaria, el presente experimento de diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico

Fitosanitario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.1.3.2. Material vegetal

Para realizar la prueba se utilizaron muestras compuestas de tejido de brote de cinco minitubérculos y de muestras de hoja de tallo de 5 o 6 plantas *in vitro* de papa de cada variedad, se utilizaron cuatro variedades: Atlantic, Herta, Carola y Snowden para los virus que se analizaron.

Se utilizaron cinco muestras compuestas cada una con 5 submuestras de tejido de brote de minitubérculo o de tallo y hoja de planta *in vitro* según el caso.

Se analizó la presencia de seis virus de la papa: PVA (virus A de la papa), PVM (virus M de la papa), PVS (virus S de la papa), PVX (virus X de la papa), PVY (virus Y de la papa) y PLRV (Virus del Enrollamiento de la hoja de la papa)

3.1.3.3. Metodología: Protocolo para los análisis por ELISA

3.1.3.3.1. Sensibilización o cubrimiento de la placa.

Los anticuerpos (gammaglobulina) específicos para cada agente fitopatógeno son adsorbidos a la superficie de cada pocillo de la placa de microtitulación. Esto se logra cubriendo los pocillos de la placa de microtitulación con el anticuerpo (gammaglobulina purificada) específico para el agente patológico que se pretende detectar. Para lograrlo, es necesario efectuar los siguientes pasos:

Preparar una solución amortiguadora (SOLAM) de adsorción o cubrimiento.

La SOLAM se prepara como sigue

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.93 g
Azida de sodio	0.2 g
Ajustar pH a	9.6

La SOLAM puede almacenarse por un mes, siempre y cuando se refrigere de 4-6°C.

Dilución del anticuerpo purificado.

Para proceder a la dilución del anticuerpo, se debe considerar los siguientes tres aspectos:

1. La dilución del anticuerpo que maneja el fabricante; por ejemplo, la empresa Agdia diluye 1µl de anticuerpo en 200µL de buffer.
2. Que una placa de poliestireno tiene 96 pocillos.
3. Que en cada pocillo de la placa se colocarán 100µL los cuales se integran con 0.5µL del anticuerpo diluido y 95.5µL de una solución amortiguadora; por tanto, 0.5µL x 96 pocillos implican 48µL de anticuerpo por placa.

En el punto tres, se procede de acuerdo a la recomendación del fabricante o a resultados previos de titulación realizados por el usuario; en este caso Agdia proporciona el anticuerpo diluido 1:200, esto es 1µL de anticuerpo diluido en 200µL de buffer. El anticuerpo se deposita en un recipiente que contenga la SOLAM suficiente para la cantidad de muestras que se analizarán, por ejemplo si en esta prueba se utilizaran 40 pozos incluyendo los blancos y controles de una placa de 96 pozos, solo se utilizaran 20µl de los 48µl

necesarios para una placa completa del anticuerpo específico en cada virus analizado Figura 2A del Apéndice.

Colocación del anticuerpo más la SOLAM en cada pocillo de la placa.

La cantidad de solución del anticuerpo más SOLAM previamente preparada para la cantidad de muestras a analizar más ocho controles, se colocan en un recipiente que permita utilizar la micropipeta multicanal (8 cargas de 100µL c/u) para el llenado de 8 pocillos de la placa en cada carga Figura 2B del Apéndice.

Fijación del anticuerpo en la placa (incubación).

En una cámara húmeda se coloca la placa con el anticuerpo por 12 horas a 4 °C, ó a temperatura de laboratorio (20-30°C) durante 4 horas según las recomendaciones del proveedor y/o experiencias del laboratorio. Sin embargo, en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario (LADIF) de la FAUANL, se incuba durante 12 horas, lo cual permite tener la seguridad de que el anticuerpo se adhiera a cada pocillo de la placa.

Lavado de la placa

Para el lavado de la placa se utiliza una SOLAM de fosfato más Tween (SF+T) 1X (buffer de lavado) y se prepara como sigue:

Preparar SOLAM de Fosfato + Tween 1X (SF + T):

Disolver en 1000 ml de agua destilada:

Cloruro de sodio	8.0 g.
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g.
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g.
Cloruro de potasio	0.2 g.
Tween 20	0.5 mL
Ajustar pH a 7.4	

La SOLAM de fosfatos más Tween (SF +T) una vez preparada se puede almacenar a temperatura ambiente y usarse como máximo una semana después de su preparación o bien almacenar a 4°C y usarse como máximo tres semanas después de su preparación, cuidando que el pH no varíe.

Después de la incubación de la placa se requiere de eliminar la SOLAM de adsorción o cubrimiento y el resto de anticuerpo no fijado en cada pocillo de la placa, para lo cual se requiere vaciar el contenido de los pocillos de la placa y posteriormente con la ayuda de una pizeta que contiene SF+T, se llenan los pozos de la placa de microtitulación y se vacían de inmediato, repitiéndose el lavado en tres ocasiones (Figura 3A de Apéndice).

Finalmente, después del tercer lavado, se lleva a cabo el secado, golpeando con firmeza la placa de microtitulación con los pocillos hacia abajo sobre el papel secante hasta eliminar completamente la SF+T (Figura 3B de Apéndice).

3.1.3.3.2. Captura del antígeno por el anticuerpo fijado en la placa.

El antígeno es, en este caso, el virus de interés que se sospecha puede estar presente en el tejido vegetal de la muestra. El antígeno en la muestra, de estar presente, debe ser extraído del tejido vegetal y colocarse en los pocillos de la placa para ser capturado por el anticuerpo específico; en términos generales esto se efectúa en los cuatro pasos siguientes:

1. Preparación de una SOLAM de extracción, en la cual se pretende aislar el antígeno que se sospecha que está presente en la muestra de tejido vegetal, la cual está compuesta de 5 submuestras para este caso.

2. Agregar la SOLAM de extracción al tejido vegetal de la muestra y proceder al macerado del tejido junto con la SOLAM para que el antígeno se disuelva en ésta.
3. Se da un orden y distribución de las muestras en la placa, para lo cual se realiza un croquis, para su identificación Figura No. 1
4. Con una micropipeta sencilla o multicanal se toman 100 μ L del macerado de tejido vegetal en la SOLAM de extracción, de cada muestra compuesta y se colocan en los pocillos correspondientes para en caso de existir el antígeno en la muestra, éste sea fijado por el anticuerpo absorbido en la placa (Figura 4C del Apéndice).

En forma detallada, los pasos anteriores se describen a continuación:

a) Preparación de la SOLAM de extracción:

Diluir en 100 ml de SF+T:

Sulfito de sodio	1.3 g
Polivinilpirrolidona MW 24-40,000	20 g
Albúmina de huevo	2.0 g
Tween 20	20 mL
Azida de sodio	0.2 g

Ajustar a pH de 7.4

La SOLAM de extracción una vez preparada se puede almacenar a 4-6°C y usarse como máximo una semana.

Macerar el tejido y extracción del antígeno en su caso de estar presente.

El tejido vegetal se coloca en bolsas de plástico de aproximadamente 10X15 cm agregando SOLAM de extracción en una proporción de 1:5

(peso:volumen) macerando con el pistilo de un mortero. Cuando se utiliza un macerador eléctrico de rodillos o tipo taladro, el tejido se macera primero. Posteriormente se agrega el SOLAM de extracción en proporción 1:5 (peso:volumen). Lo anterior se ilustra en las figuras 4A y 4B del Apéndice respectivamente para brotes de tubérculo y hojas de la planta de papa.

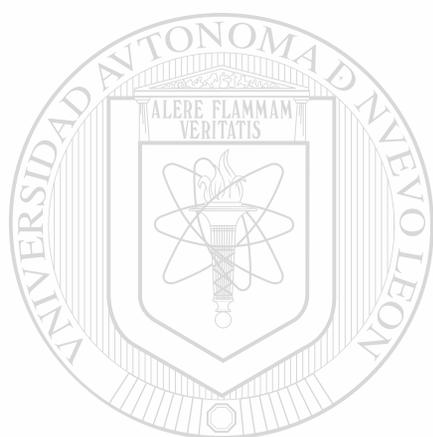
Fijación del antígeno de la muestra por el anticuerpo previamente adherido a la placa.

Se colocan 100 μ L del macerado de tejido, se agregan a un pocillo de la placa (Figura 4C, D del Apéndice). Debe utilizarse una puntilla para cada muestra. Se recomienda no usar los pocillos cercanos a los bordes ya que pueden desarrollar reacciones no específicas

En la Figura No. 1 se ilustra la disposición de muestras, testigos y blancos que se requieren en una prueba de ELISA. Cada prueba debe incluir las muestras por duplicado, cuatro pocillos en blanco, cuatro con testigo negativo y cuatro con testigo positivo, de estos últimos, dos deben estar concentrados para que reaccionen con una intensidad tal que en 0.5 a 1 hora de incubación con el sustrato se obtenga una lectura de (densidad óptica) mayor o igual a 1.0, los otros dos testigos positivos deben diluirse para obtener en el mismo tiempo de incubación (0.5 a 1 hora) una lectura de 0.2 de densidad óptica, la dilución de este testigo será determinada por el proveedor o por el propio laboratorio en base a ensayos experimentales.

Incubación de la placa

De existir el antígeno en la muestra, el mismo será capturado por el anticuerpo previamente adherido los pocillos de la placa, el conjunto de anticuerpo + antígeno en la placa debe ser incubados por 2 horas a temperatura de laboratorio (20-30°C) en cámara húmeda (Figura 4E del Apéndice) o por 12 horas a 4°C.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura No. 1. Datos y distribución de las muestras con su repetición en la placa de microtitulación en un análisis de ELISA.

Marín N. L. a de 2002

Clave de la muestra _____
 Cultivo _____
 Variedad _____
 Origen _____
 Objetivo _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	1	2	3	4	B	B	1	2	3	4
B	5	6	7	8	9	10	5	6	7	8	9	10
C	11	12	13	14	15	16	11	12	13	14	15	16
D	17	18	19	20	21	22	17	18	19	20	21	22
E	23	24	25	26	27	28	23	24	25	26	27	28
F	29	30	31	32	33	34	29	30	31	32	33	34
G	35	36	37	38	39	40	35	36	37	38	39	40
H	-	-	BE	+	(+)	BE	-	-	BE	BE	+	(+)

B= Blanco (Sin anticuerpo, muestra ni conjugado) con sustrato.
 (-) = Testigo negativo planta sana)
 += Testigo positiva diluido con D.O. de aproximado 0.15 (planta enferma)
 (+)= Testigo positivo con D.O. de 1.0 (Planta enferma)
 BE= Buffer de Extracción

Resultados
y Vo Bo

Observaciones

Lavado de la placa.

Como antes se explicó, en el lavado de la placa, se procede a eliminar el excedente de la muestra contenida en la placa lavándola con la SOLAM de Fosfatos más Tween (SF+T). Para lavar adecuadamente y evitar la contaminación entre muestras (pocillos), la placa se coloca en posición inclinada, se agrega SF+T, iniciando con los pocillos de la parte inferior (columna 12 letra H de la placa), continuando hacia la parte superior (columna 1 letra A) hasta llenar toda la placa (Figura 3A del Apéndice). Posteriormente se deja reposar la placa con SF+T durante 3 minutos, se vacía y este proceso se repite 3 veces, para finalmente secar la placa golpeando sobre papel secante como se describió anteriormente en la sección de lavado de la placa.

3.1.3.3.3. Adicionar el conjugado (anticuerpo - fosfatasa alcalina).

Para completar la reacción de doble anticuerpo en sandwich (DAS) se adhiere el mismo anticuerpo pero ahora conjugado con la enzima fosfatasa alcalina de haber esto capturado al antígeno por el anticuerpo en la placa, ahora el antígeno capturará el anticuerpo conjugado con la fosfatasa alcalina. La adición del conjugado se realiza en los siguientes pasos.

Preparación de la SOLAM para diluir el conjugado anticuerpo-fosfatasa alcalina de acuerdo al siguiente procedimiento:

Diluir en 1000 ml de SF+T:

Albúmina de suero de bovino2.0 g (0.2%)
Polivinilpirrolidona (MW 24-40,000)20.0 g (2%)
Azida de sodio0.2 g
Ajustar a pH de 7.4	

La SOLAM debe almacenarse de 4 a 6 °C y usarse como máximo una semana después de su preparación.

Diluir el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina en un recipiente en la proporción de SOLAM, señalada por el proveedor o de acuerdo a resultados de titulaciones realizadas por el usuario, en el caso de LADIF-FAUANL se utiliza una dilución de 1:200, esto es un 1 μ L del conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina en 200 μ L de SOLAM; el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina se deposita en un recipiente que contenga la SOLAM suficiente para la cantidad de muestras que se analizarán, como en esta prueba se utilizaron 40 pocillos incluyendo los blancos y ocho controles de una placa de 96 pocillo solo se utilizaron 20 μ L de los 48 μ L necesarios para una placa completa de la enzima específica para cada virus analizado (Figura 5A de Apéndice).

Agregar a cada pocillo de la placa 100 μ L (0.1 mL) de la mezcla de SOLAM más el anticuerpo - fosfatasa alcalina diluido (Figura 5B de Apéndice).

Incubar dos horas a temperatura de laboratorio (20-30°C) en cámara húmeda. Eliminar el conjugado enzimático y lavar de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. En este paso se elimina el conjugado anticuerpo - fosfatasa alcalina que no esté adherido a las partículas del agente patogénico. Como se describe en la secciones anteriores sobre lavado de la placa.

3.1.3.3.4. Adicionar el sustrato para la reacción de la fosfatasa alcalina

Para preparar el sustrato para la reacción de la fosfatasa alcalina se precede diluyendo el Para-Nitrofenil Fosfato (PNP) (pastilla de 5 mg) en SOLAM de sustrato en una relación de 1 mg/mL y se agrega 100 μ L (0.1 mL) de ésta solución de sustrato a cada pocillo de la placa incluidos los blancos (Figura 6A de Apéndice).

La solución amortiguadora SOLAM del sustrato se preparo como sigue:

Agua destilada800 mL

Dietanolamina97.0 mL

Azida de sodio0.2 g

Agregar agua destilada hasta completar un volumen total de 1 litro.

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico concentrado.

Nota: Esta solución amortiguadora SOLAM debe ser preparada 15 minutos antes de cada aplicación

Incubación de la placa en cámara húmeda a temperatura de laboratorio (20-30°C) y obscuridad por 0.5-1 h para observar la reacción.

La intensidad del cambio de color producida por la reacción de la fosfatasa alcalina del antígeno conjugado con el PNP, es una indicación de la cantidad de antígeno en la muestra. Cuanto más intenso es el color, mayor es la concentración de antígeno. Los pocillos transparentes, en los que no hay cambio de color corresponden a las muestras de plantas en las que no está presente el antígeno, es decir plantas sanas, así como los testigos sanos y el blanco sin muestra.

Para detener la reacción, esto se hace en el momento en que se obtiene una densidad óptica media de 0.20 en el testigo positivo diluido, añadiendo 50µl de hidróxido de sodio al 3 M a los pocillos de la placa, cuando se usa fosfatasa alcalina y ácido sulfúrico 3 M para el caso de la peroxidasa.

Lecturas y valores esperados de densidad óptica (D.O.) en la prueba serológica ELISA:

Para considerar aceptables la prueba de una placa ELISA, la media de las lecturas de densidad óptica del testigo negativo deben ser menores a 0.06 y del testigo positivo diluído aproximadamente 0.20.

Criterios para declarar como positiva o negativa una muestra.

Según Cruz y Farías, 1997 la reacción se considerará como positiva (presencia del fitopatógeno) si la lectura de densidad óptica es mayor o igual a tres veces la media del testigo negativo. Si el testigo negativo presenta en promedio valores de densidad óptica menores de 0.03, solo se considerarán positivos aquellas con densidades ópticas mayores a 0.1 Según (Cruz y Farías 1997).

Cuando solo una de las muestras es positiva y/o si la diferencia con su repetición es mayor o igual al 50 % de su valor, la muestra debe procesarse nuevamente para determinar la presencia de fitopatógenos.

Las pruebas que resulten positivas deberán analizarse una segunda vez para su confirmación.

3.1.3.3.5. Terminología utilizada en ELISA

Adsorción. Propiedad de algunos antígenos y anticuerpos de adherirse entre sí ó de estos últimos a un medio sólido, en este caso la placa de microtitulación.

Antígeno fitopatógeno. Microorganismo capaz de causar enfermedades a los vegetales.

Anticuerpo. Moléculas proteicas conocidas como inmunoglobulinas, que se encuentran en el suero sanguíneo y son producidas por las células linfáticas en respuesta al estímulo de un antígeno.

Antígeno. Sustancia extraña, normalmente proteína que es capaz de provocar la producción de anticuerpos específicos cuando es introducido al sistema sanguíneo de un organismo de diferente especie.

Antisuero: Suero que contiene anticuerpos que reaccionan contra un antígeno.

ELISA. Acrónimo de Enzyme/ Linked Immunosorbent Assay, cuya traducción al idioma español es "Prueba de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas".

Inmunoglobulinas: Anticuerpos o moléculas de alto peso molecular llamadas IgG , IgM, entre otras.

pH. Es el logaritmo natural de la concentración de los iones hidrógeno en cualquier solución acuosa y tiene un rango de 0-14.

Reactivos. Sustancias químicas usadas para la preparación de soluciones requeridas para una técnica, de análisis.

Reacción Antígeno-Anticuerpo - Es la reacción que ocurre al infectarse un organismo con un antígeno el cual es atacado por el anticuerpo correspondiente, producido por el sistema inmunológico del organismo infectado. La reacción es dependiente de la proporción y concentración en que están ambos elementos (Curso Saneamiento, 1996).

Sensibilidad.- Mínima concentración de antígeno o IgG que se puede detectar con seguridad mediante la reacción antígeno anticuerpo.

Solución amortiguadora. Solución capaz de impedir cambios bruscos de pH aún

cuando se le agrega un ácido o base fuerte a la solución.

Sustrato. Sustancia química sobre la cual actúa una enzima.

Técnicas serológicas. Pruebas basadas en la especificidad de la reacción antígeno anticuerpo utilizada para el diagnóstico de agentes patogénicos (Cruz y Farías, 1997)

Testigo negativo. Muestra vegetal libre de agentes patogénicos usada como control o referencia en las pruebas serológicas.

Testigo positivo. Muestra vegetal infectada por un agente patogénico que se usa como control o referencia en las pruebas serológicas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2. Fase de Invernadero

3.2.1. Experimento 4:

3.2.1.1. Producción de minitubérculos a partir de planta *in vitro* envejecida de minitubérculo de papa.

Para determinar si la planta *in vitro* envejecida podría utilizarse para la producción, el experimento se realizó en el laboratorio e invernadero en condiciones de microtúneles en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL).

3.2.1.2. Material genético.

Se utilizó como material genético plantas envejecidas *in vitro* de papa de la variedad Alfa, siendo clasificadas en tres tipos: con hojas, con tallo grueso y tipo estropajo.

3.2.1.3. Metodología

Se procedió a lavar la raíz de las plantas *in vitro*, con agua y eliminando el remanente de medio de cultivo para evitar la propagación de hongos.

Las plantas *in vitro* fueron colocadas en una bolsa de poliestireno (20 X 30) con sustrato estéril de musgo asfángico, dejando solamente la parte apical de la planta sobre el sustrato, finalmente se les colocó una malla antiáfidos humedecida sobre la bolsa para evitar la deshidratación de las mismas, a los 20 días se pasaron a un microtúnel cubierto con tela antiáfidos para la protección de insectos transmisores de enfermedades vírales, durante el desarrollo del experimento se realizó un control estricto de plagas y enfermedades.

3.2.1.4. Variables evaluadas

Número de minitubérculos por bolsa.

Categorías de los minitubérculos (tamaños) cosechados por bolsa

3.2.1.5. Análisis Estadístico

El Diseño Experimental utilizado fué el completamente al azar, con tres tratamientos que fueron los tres tipos de plantas envejecida: con hojas, con tallo grueso y tipo estropajo. Después para obtener los datos de las variables, se procedió al análisis de varianza, considerando que de detectarse diferencias entre los tratamientos, se procedería a la Prueba de Comparación de Medias por DMS protegida de Fisher (Steel y Torrie 1981). El análisis estadístico se efectuó con el paquete de cómputo Diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994).

3.2.2. Experimento 5:

3.2.2.1. Evaluación de diferentes densidades de plántulas provenientes de microtubérculo en la producción de Minitubérculos de papa en la variedad Atlántic.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) bajo el proyecto SIREYES 95/034.

3.2. 2.2. Material genético.

Se utilizaron microtubérculos (obtenidos *in vitro*) de papa brotados, de la variedad Atlántic, los cuales provenían del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de Cuba.

3.2.2.3. Metodología.

Se realizó la siembra de los minitubérculos brotados en charolas de propagación de unícel de 200 cavidades con musgo esfágico como sustrato y posteriormente se dio un riego a los 40 días de la siembra y cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm se procedió al trasplante a bolsas de poliestireno de 15 x 30 cm, con el mismo sustrato y fertilizante comercial de la fórmula 17-17-17 a razón de 10 g por bolsa.

Se definieron 5 tratamientos, los cuales consistieron en colocar 1, 2, 3, 4 y 5 plántulas por bolsa utilizando musgo esfágico como sustrato, finalmente se aplicó un riego pesado, posteriormente las bolsas con las plántulas fueron colocadas en un microtúnel donde permanecieron 70 días después del trasplante hasta su desecación, para luego proceder a la cosecha a los 25 días después.

3.2.2.4. Variables Evaluadas

A la cosecha se procedió a determinar dos variables:

Número de minitubérculos por bolsa y calibres de minitubérculos cosechados. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.2.2.5. Cosecha:

A los 70 días después del trasplante se procedió a desecar el follaje de las plántulas con el desecante comercial Paracuat y con el fin de lograr una completa suberización, a los 25 días después se procedió a cosechar los minitubérculos de cada uno de los tratamientos.

3.2.2.6. Análisis estadístico.

El diseño experimental utilizado fue el de completamente al azar con los 5

tratamientos antes descritos, cada uno con diferente número de repeticiones. Se efectuó el análisis de varianza, para las dos variables y donde se detectó diferencia entre los tratamientos se procedió a la comparación de medias por DMS (0.05) protegida de Fisher. Los análisis se efectuaron con el paquete de computo Diseños Experimentales FAUANL (Olivares, 1993).

3.3. Fase de Campo

3.3.1. Experimento 6:

3.3.1.1. Efecto del tamaño de minitubérculo, en el rendimiento de tubérculo semilla básica.

Con el objetivo de encontrar el tamaño óptimo de minitubérculos a sembrar para maximizar el rendimiento de semilla básica en campo, se utilizaron siembras de minitubérculo para la producción y de tubérculo semilla básica, con de tres orígenes de minitubérculos cada uno clasificado en cinco calibres o tamaño, para ser evaluados en su rendimiento promedio en ton ha¹ y su composición por categorías comerciales a saber: primeras, segundas, terceras, cuartas y quintas.

3.3.1.2. Material genético.

Como material genético se utilizaron minitubérculos de la variedad Atlantic de primera y segunda generación producidos por siembras de microtubérculo a bancales y tubérculo semilla básica de papa cosechados como primer generación de campo los cuales se clasificaron en calibres 4, 3, 2, 1 y 0 para su siembra en campo, con el fin de producir tubérculo semilla básica para siembra.

3.3.1.3. Metodología

De octubre a diciembre de 1996, en las instalaciones de la empresa HBR en Marín, N. L. y en el campo experimental de la FAUANL en Marín N. L. se produjeron minitubérculos a partir de siembras con microtubérculo (tubérculo producido *in vitro*) importado por la citada empresa del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de las Villas, Cuba.

Los minitubérculos se identificaron por tres orígenes 1ª generación de bancal 2ª generación de bancal y 1ª generación de campo y se clasificaron por su diámetro en las siguientes categorías: 4 (5 a 6 cm), 3(4 a 5 cm), 2 (4 a 3 cm), 1 (2 a 3 cm), 0(1 a 2 cm) y quinta (< 2 cm); se lavaron y trataron con hipoclorito de sodio al 5% y posteriormente se protegieron con un bactericida y un fungicida comerciales. En las instalaciones de la FAUANL, se almacenaron los minitubérculos y se llevaron a brotación bajo temperatura ambiente a la sombra una vez brotados se utilizaron en las siembras antes descritas de la cual se identificaron en el campo tanto los orígenes como su calibre.

El 3 de junio de 1997 en el Campo Experimental de la Ascensión, Aramberri, N. L. de la FAUANL, para la producción de semilla básica de papa se establecieron siembras con los minitubérculos cosechados el ciclo anterior en Marín N. L. identificando en el campo los tres orígenes y los cinco calibres sembrados.

El cultivo se atendió aplicando ocho riegos con equipo de aspersion y después del segundo riego se hicieron 7 aplicaciones con fertilizante foliar e insecticidas, fungicidas y bactericidas para prevenir ataques de insectos transmisores de virus, y enfermedades producidas por hongos y bacterias.

3.3.1.4. Cosecha general y experimental.

El 6 de septiembre de 1997 se procedió al desvare y la cosecha general se realizó del 29 de septiembre al 1 de octubre de 1997. La cosecha para fines experimentales de estimación del rendimiento total por categorías de minitubérculo sembrado (calibres 4,3,2,1, y 0), se tomaron cuatro muestras al azar dentro de cada una de las áreas sembradas con cada uno de los tres orígenes de minitubérculo sembrado, el tamaño de muestra fue una parcela de un surco de 3 x 0.8 m.

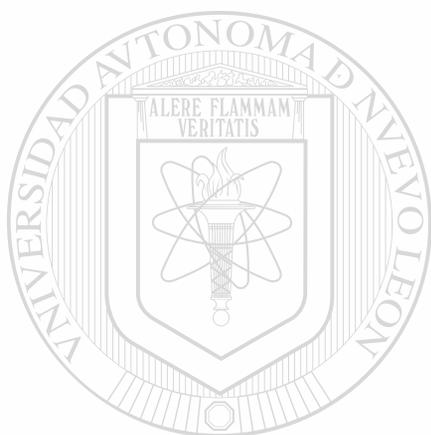
3.3.1.5. Variables Evaluadas.

El tubérculo semilla Básica cosechado se separó en cinco categorías comerciales denominadas, de mayor a menor tamaño, como primera, segunda, tercera, cuarta y quintas; se pesaron por separado para medir el rendimiento para cada categoría y la suma de los pesos de las cinco categorías permitió estimar el rendimiento total. El rendimiento total y su composición por categorías se expresó en ton ha^{-1} y se analizó estadísticamente.

3.3.1.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor A consistió de tres niveles siendo los tres orígenes de minitubérculo sembrado (a_1 = minitubérculo de segunda generación de bancal, a_2 = minitubérculo de primera generación de bancal a_3 = minitubérculo de primer generación de campo) y el factor B con cinco niveles siendo los calibres de los minitubérculos sembrados ($b_1=4$, $b_2=3$, $b_3=2$, $b_4=1$ y $b_5=0$). La combinación de los tres niveles del factor A y los cinco niveles del factor B dieron 15 tratamientos. Para tener mayor confiabilidad se consideraron dos repeticiones utilizando los dos

datos más similares de los cuatro muestreos por sitio. Cuando se detectó significancia se procedió a definir la magnitud de las diferencias mediante la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS 0.05) protegida de Fisher, se utilizó el paquete de cómputo Diseños experimentales para análisis estadístico FAUANL (Olivares, 1993).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Fase de laboratorio.

4.1.1. Experimento 1

Efecto de diferentes tipos de tapas y tipos de explante en tres variedades en el crecimiento de papa *in vitro*.

En los cuadros 8, 9 y 10, se presentan los análisis de varianza de un diseño completamente al azar con arreglo factorial, respectivamente para las variables longitud de la planta de papa *in vitro*, número de entrenudos y número de brotes laterales en las variedades Atlantic, Gigant y Clon 5175. En los resultados se aprecia que existió diferencia significativa entre variedades, tipos de tapas y tipo de explante en forma independiente; sin embargo, para el caso de las interacciones, solo se presentó diferencia significativa para variedades por tipo de tapa para las tres variables evaluadas, sin encontrar diferencia estadística entre las otras interacciones evaluadas.

Por lo anterior, se procedió a las comparaciones de medias para las variables longitud de la planta *in vitro*, mediante la prueba de DMS protegida de Fisher (Steel y Torrie 1982), para los tipos de tapas dentro de variedades y para el factor tipo de explante.

La diferencia estadística entre variedades por tipos de tapa pudo ser casa del efecto de luminosidad que recibieron las plantulas en el corto periodo de incubación.

Cuadro No. 8 análisis de varianza de la longitud de la planta *in vitro* en cm. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Variedades	2	3650.68	1825.33	8.42	0.001
Tapas explante	3	6956.62	2318.88	10.70	0.000
	2	6293.40	3146.70	14.53	0.000
Variedades x Tapas	6	3123.27	520.54	2.40	0.035
Variedades x explantes	4	290.1	72.52	0.33	0.854
Tapas x Explantes	6	1771.20	295.20	1.37	0.240
Variedades x Tapas x explantes	12	1167.04	97.25	0.44	0.937
Error	72	15592.70	216.57		
Total	107	38845.0			

Cuadro No. 9 Análisis de varianza de número de brotes laterales de la planta *in vitro*. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Variedades	2	57.40	28.70	9.93	0.00
Tapas explante	3	61.51	20.50	7.10	0.001
	2	52.46	26.23	9.1	0.001
Variedades x Tapas	6	44.37	7.40	2.55	0.026
Variedades x explantes	4	19.48	4.88	1.67	0.162
Tapas x Explantes	6	3.98	0.66	0.22	0.965
Variedades x Tapas x explantes	12	40.97	3.41	1.19	0.312
Error	72	208.00	2.89		
Total	107	488.18			

Cuadro No. 10. Análisis de varianza para número de entrenudos de la planta *in vitro*.[®] FAUANL, Marín, N. L., 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Variedades	2	51.47	25.73	8.65	0.001
Tapas explante	3	66.78	22.25	7.49	0.000
	2	107.85	53.92	18.14	0.000
Variedades x Tapas	6	48.39	8.06	2.71	0.020
Variedades x explantes	4	21.38	5.34	1.80	0.138
Tapas x Explantes	6	4.89	0.81	0.28	0.947
Variedades x Tapas x explantes	12	51.44	4.29	1.44	0.167
Error	72	213.10	2.98		
Total	107	566.19			

Longitud de la planta *in vitro*.

En los Cuadros 11 y 12, se presentan las comparaciones de medias para esta variable, respectivamente para la interacción tapas x variedades y para los tipos de explantes.

En el Cuadro 11, se observa que la tapa de polietileno fué estadísticamente superior al resto de las tapas en las variedades Atlantic y Gigant y estadísticamente igual a la tapa Klean Pack pero superior a las tapas convencionales verde y blanca para el caso del Clon 5175.

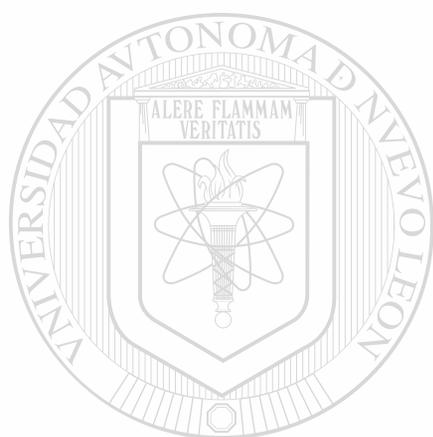
En el Cuadro 12, se presenta la comparación de medias para esta variable entre los tipos de explantes, observándose que el explante apical fué el que estadísticamente presentó la longitud de la planta *in vitro* más grande seguido en forma decreciente y estadísticamente los explante medio y basal.

Brotos laterales de la planta *in vitro*.

En los Cuadros 13 y 14, se presentan las comparaciones de medias para esta variable, respectivamente para la interacción tapas x variedades y para los tipos de explantes.

En el Cuadro 13, se observa que la tapa de polietileno fué estadísticamente superior al resto de las tapas en la variedad Atlantic, para el caso de la variedad Gigant fue estadísticamente igual a las demás tapas con excepción de la tapa convencional de color verde. Para el Clon 5175 fue numéricamente superior la tapa de Klean Pack, pero todas fueron estadísticamente iguales.

En el Cuadro 14, se presenta la comparación de medias para esta variable entre los tipos de explantes, observándose que el explante apical fué el que estadísticamente presentó la mayor longitud de la planta *in vitro* seguido por los explantes medio y basal que estadísticamente fueron iguales.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 11. Efecto de cuatro tipos de tapa sobre la longitud de la planta *in vitro*. dentro de tres variedades de papa. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

ATLANTIC		GIGANT		CLON 5175	
Tipo de Tapas	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.
Polietileno Verde	53.44 a	Ploietileno verde	53.44 a	Cleean Pack	58.00 a
Kleean Pack	30.44 b	Cleean Pack	30.44 b	Polietileno	49.22 ab
Blanca	30.00 b	Blanca	30.00 b	Verde	42.67 b
	26.33 b		26.33 b	Blanca	39.67 b
DMS 0.05	16.89				

Cuadro No. 12. Efecto del tipo de explante en la siembra *in vitro* sobre longitud de la planta *in vitro*. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

Tipo de explante	Media
Apical	48.05 a
Medio	40.02 b
Basal	29.41 c

DMS 0.05=6.89

Cuadro No. 13. Efecto de cuatro tipos de tapa sobre el número de brotes laterales de la planta *in vitro*. dentro de tres variedades de papa. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

ATLANTIC		GIGANT		CLON 5175	
Tipo de Tapas	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.
Polietileno Verde	6.11 a	Ploietileno Blanca	3.33 a	Verde	3.11 a
Blanca	3.89 b	Cleean Pack verde	2.78 ab	Polietileno	2.89 a
Cleean Pack	3.11 b		1.66 ab	Cleean Pack	2.11 a
	2.44 b		1.11 b	Blanca	1.89 a
DMS 0.05	1.95				

Cuadro No. 14. Efecto del tipo de explante en la siembra *in vitro* sobre el número de brotes laterales de la planta de papa *in vitro*. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

Tipo de explante	Media
Apical	3.77 a
Medio	2.75 b
Basal	2.09 b

DMS 0.05=0.796

Número de entrenudos de la planta *in vitro*.

En los Cuadros 15 y 16, se presentan las comparaciones de medias para esta variable, respectivamente para la interacción tapas x variedades y para los tipos de explantes.

En el Cuadro 15, se observa que la tapa de polietileno fué estadísticamente superior al resto de las tapas en la variedad Atlantic, para el caso de la variedad Gigant todas fueron estadísticamente iguales. En el caso del Clon 5175 la tapa de polietileno numéricamente fué mayor pero estadísticamente solo superó a las tapas verde y blanca.

En el Cuadro 16, se presenta la comparación de medias para esta variable entre los tipos de explantes, observándose que el explante apical fué el que estadísticamente presentó la mayor longitud de la planta *in vitro* seguido en forma decreciente de longitud de plántula por los explantes medio y basal.

Cuadro No. 15. Efecto de cuatro tipos de tapa sobre el número de entrenudos de la planta de papa *in vitro*. dentro de tres variedades de papa. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

ATLANTIC		GIGANT		CLON 5175	
Tipo de Tapa	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.	Tipo de tapa	Long. en cm.
Poliétileno	6.67 a	Blanca	3.77 a	Poliétileno	6.11 a
Verde	4.11 b	Poliétileno	3.44 a	Kleen Pack	5.55 ab
Kleen Pack	4.00 b	Kleen Pack	2.88 a	Verde	3.77 b
Blanca	3.11 b	verde	2.55 a	Blanca	3.55 c
DMS 0.05	1.978				

Cuadro No. 16. Efecto del tipo de explante en la siembra *in vitro* sobre el número de entrenudos de la planta de papa *in vitro*. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

Tipo de explante	Media
Apical	5.38 a
Medio	4.05 b
Basal	2.94 c
DMS 0.05=0.808	

Nota: Tapa 1= Tapa de polietileno de alta densidad

Tapa 2= Tapa marca SIGMA de plástico color verde

Tapa 3= Tapa marca SIGMA color blanco translúcido

Tapa 4= Tapa de plástico transparente marca Klean Pack

4.1.2. Experimento 2.

Efecto del tratamiento químico (fungicida - bactericida) en la siembra *In vitro* en rodajas de papa de la variedad Alfa en la eliminación de contaminantes endógenos.

En la etapa de laboratorio la contaminación tanto del explante como por manejo, es el principal problema para pasar de la etapa de establecimiento aséptico del explante a la etapa de subcultivo de planta *in vitro* sana y bien desarrolladas para proceder a su multiplicación masiva. Con el fin de reducir la contaminación *in vitro* se llevó a cabo un experimento en el cual se evaluaron las variables de longitud, número de entrenudos, número de brotes laterales, vigor y formación de raíces de la planta *in vitro*.

En los Cuadros 17, 18 y 19 se presentan los análisis de varianza de un diseño completamente al azar, respectivamente para las variables longitud de las plantas *in vitro*, número de entrenudos y número de brotes laterales dentro de la variedad Alfa.

Los resultados muestran que no existió diferencia estadística para longitud y número de entrenudos de las plantas *in vitro*; sin embargo, para el número de brotes laterales se aprecia una diferencia estadística significativa en el efecto de tratamientos.

Por lo anterior para el caso de número de brotes laterales se procedió a la comparación de medias mediante la prueba DMS protegida de Fisher.

Cuadro No. 17 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto de la longitud de la planta *in vitro* de papa, en el efecto del tratamiento químico, dentro de la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	2	519.18	259.59	1.13	0.332
s					
Error	44	10093.43	229.39		
Total	46	10612.62			
c.v.	18%				

Cuadro No. 18 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto del número de entrenudos de la planta *in vitro* de papa, en el efecto del tratamiento químico, dentro de la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamiento	2	5.53	2.76	1.88	0.163
s					
Error	41	60.19	1.46		
Total	43	65.72			
c.v.	19%				

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 19 Análisis de varianza en el diseño completamente al azar en el efecto del número de brotes laterales de la planta *in vitro* de papa, en el efecto del tratamiento químico, dentro de la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N. L. 1997.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	2	43.94	21.97	9.21	0.001
error	41	97.78	2.38		
Total	43	141.72			
c.v.	55%				

En el Cuadro 20 se presentan la comparación de medias donde se nota que el tratamiento de rodajas de papa regadas con agroquímicos es numéricamente superior a los demás, sin embargo, no existió diferencia estadística para las variables de longitud y número de entrenudos, pero para la variable número de brotes laterales existió diferencia estadística entre el tratamiento de siembra tradicional con relación a los dos tratamientos de rodajas y con riegos con agroquímicos y agua estéril respectivamente.

Cuadro No. 20 Comparación de medias en los tres tratamientos dentro de tres variables evaluadas de la planta *In vitro* de papa de la variedad Alfa. FAUANL, Marín, N. L., 1997.

Tratamiento	Media de longitud de brote en cm	Tratamiento	Media de número de entrenudos	Tratamiento	Media de brotes laterales
Rodaja + Agroquímico	6.73 a	Rodaja + agroquímico	6.72 a	Rodaja + agroquímico	3.72 a
Rodaja+Agua Siembra	6.28 a	Rodaja+Agua Siembra	6.27 a	Rodaja+Agua Siembra	3.33 a
Tradicional	5.8 a	tradicional	5.8 a	tradicional	1.46 b

Nivel de sig. =0.05

Evaluación de la contaminación *in vitro*.

Se establecieron brotes como explantes en un total de 44 tubos de ensaye, de los cuales 15 tubos con brotes de tubérculo de papa sembrados *in vitro* en la forma tradicional, esto es, desinfectados con hipoclorito de sodio al 15% por un tiempo de 15 minutos y enjuagados con agua estéril y sembrados *in vitro*, 18 fueron sembrados con explantes provenientes de rodajas que se habían regado solo con agua destilada estéril y un desinfección tradicional y sembrados *in vitro*, por ultimo 11 tubos con brotes de rodajas que fueron regados con una solución de fungicida y bactericida y un desinfección de forma tradicional y sembrados *in vitro*. Los tubos contaminados fueron en el primer caso 12 tubos de 18, 14 de 18 en el segundo caso, y 5 de 11 y en el tercer caso lo que representó un 66%, 77% y un 45% respectivamente para los tres tratamientos, sin embargo, de acuerdo con la prueba no paramétrica de Kruskal -Wallis se obtuvo una estadística de prueba $H=2.0607$ menor que el valor de $X^2=3.84$ por lo que no se rechaza la hipótesis nula de que las tres poblaciones tienen la misma distribución; en consecuencia solo se puede establecer que el riego a las rodajas con una solución de fungicida - bactericida, tiende a reducir la contaminación aunque dicha tendencia no es significativa

4.1.3. Experimento 3

Determinación de la sanidad de las plantas *in vitro* y minitubérculos de papa por medio de la técnica serológica ELISA.

Los resultados del análisis de ELISA de minitubérculos de primera y segunda generación para detectar la presencia de los virus: PVA, PVM, PVS, PVX, PVY y PLRV en plantas *in vitro* y minitubérculos de papa se muestran en los Cuadros No. 15 y 16 en los cuales se puede observar que de acuerdo a los valores de densidad óptica (D.O.) que todas las muestras compuestas para las cuatro variedades y los seis virus analizados resultaron negativos, debido a los valores estimados del umbral basándose en los controles negativos para cada uno de los virus analizados, con excepción de la muestra compuesta cinco para la variedad Atlántic y para el virus PVS que resultó ser positiva; por lo que la muestra positiva fue identificada y se le dio un manejo por separado gracias a que se cuenta con una genealogía de todo el material que es multiplicado a nivel de laboratorio e invernadero.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 21. Relación de muestras y nivel de absorbancia para los virus PVA, PVM, PVS y PVX. en cuatro variedades de papa mediante ELISA.

PVA		
Variiedad	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.080
Atlantic	2	0.075
Atlantic	3	0.090
Atlantic	4	0.072
Atlantic	5	0.060
Atlantic	6	0.071
Atlantic	7	0.068
Herta	8	0.081
Herta	9	0.075
Herta	10	0.065
Herta	11	0.073
Herta	12	0.062
Carola	13	0.059
Carola	14	0.065
Snowden	15	0.071
Blanco	B	0.050
Negativo	(-)	0.07
Positivo	+	0.25
Positivo	(+)	1.2
	Umbral	0.21

PVM		
Variiedad	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.075
Atlantic	2	0.065
Atlantic	3	0.060
Atlantic	4	0.059
Atlantic	5	0.065
Atlantic	6	0.071
Atlantic	7	0.069
Herta	8	0.058
Herta	9	0.060
Herta	10	0.065
Herta	11	0.058
Herta	12	0.068
Carola	13	0.071
Carola	14	0.062
Snowden	15	0.055
Blanco	B	0.058
Negativo	(-)	0.06
Positivo	+	0.15
Positivo	(+)	0.98
	Umbral	0.18

PVS		
Variiedad	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.065
Atlantic	2	0.068
Atlantic	3	0.059
Atlantic	4	0.064
Atlantic	5	1.60*
Atlantic	6	0.062
Atlantic	7	0.056
Herta	8	0.066
Herta	9	0.059
Herta	10	0.055
Herta	11	0.060
Herta	12	0.065
Carola	13	0.071
Carola	14	0.063
Snowden	15	0.058
Blanco	B	0.045
Negativo	(-)	0.055
Positivo	+	1.2
Positivo	(+)	1.8
	Umbral	0.165

PVX		
Variiedad	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.058
Atlantic	2	0.063
Atlantic	3	0.059
Atlantic	4	0.065
Atlantic	5	0.059
Atlantic	6	0.057
Atlantic	7	0.056
Herta	8	0.061
Herta	9	0.054
Herta	10	0.064
Herta	11	0.057
Herta	12	0.056
Carola	13	0.062
Carola	14	0.058
Snowden	15	0.060
Blanco	B	0.044
Negativo	(-)	0.058
Positivo	+	>3.0
Positivo	(+)	>3.0
	Umbral	0.174

* Muestra compuesta positiva para el virus PVS

Cuadro No. 22. Relación de muestras y Nivel de absorbancia para los virus PVY y PLRV en cuatro variedades de papa mediante ELISA.

PVY		
Variedades	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.057
Atlantic	2	0.066
Atlantic	3	0.061
Atlantic	4	0.070
Atlantic	5	0.067
Atlantic	6	0.059
Atlantic	7	0.063
Herta	8	0.065
Herta	9	0.058
Herta	10	0.067
Herta	11	0.058
Herta	12	0.062
Carola	13	0.059
Carola	14	0.062
Snowden	15	0.063
Blanco	B	0.043
Negativo	(-)	0.062
Positivo	+	0.268
Positivo	(+)	0.90
	Umbral	0.186

PLRV		
Variedades	No. de Muestra	Densidad Optica.
Atlantic	1	0.065
Atlantic	2	0.054
Atlantic	3	0.058
Atlantic	4	0.062
Atlantic	5	0.065
Atlantic	6	0.071
Atlantic	7	0.060
Herta	8	0.059
Herta	9	0.057
Herta	10	0.065
Herta	11	0.063
Herta	12	0.057
Carola	13	0.062
Carola	14	0.058
Snowden	15	0.065
Blanco	B	0.046
Negativo	(-)	0.066
Positivo	+	0.220
Positivo	(+)	1.5
	Umbral	0.198

4.2. Fase de invernadero.

4.2.1. Experimento 4.

Producción de minitubérculos a partir de planta *in vitro* envejecida

En el cuadro 23 se presenta el análisis de varianza de un diseño completamente al azar para la variable número de minitubérculos por bolsa de papa de la variedad Alfa. Los resultados indicaron que numéricamente la planta envejecida tipo tallo grueso presento una tendencia a producir más minitubérculos por bolsa ; sin embargo, no existió diferencia estadística para los tres tipos de plantas.

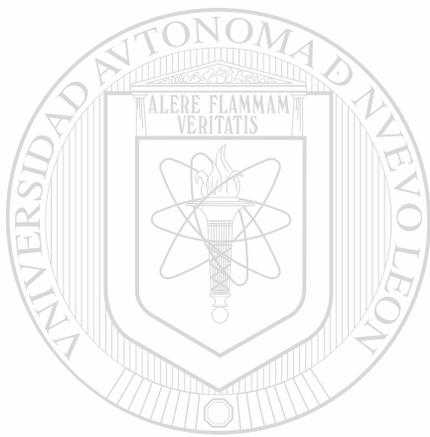
Por lo anterior, el no encontrar diferencia estadística pudo deberse a que los tres tipos de plántulas se sometieron a un trasplante igual esto es que solo se dejó expuesto al ambiente aproximadamente dos centímetros de la parte apical. Sin embargo, nos da la alternativa de recuperar o renovar material genéticamente valioso al cosechar los minitubérculos.

4.2.2. Experimento 5

Efecto de densidad en la producción de minitubérculos a partir de microtubérculos brotados.

En el cuadro No. 24 se presenta el análisis de varianza en un diseño completamente al azar en el cual se encontró diferencia significativa para el número de minitubérculos cosechados en los tratamientos de 5, 4, 3, 2 y 1 plantas por bolsa, por lo que se efectuó una comparación de medias entre tratamientos usando DMS; estos resultados se presentan en el Cuadro No. 23

En el cuadro 25 se presenta la comparación de medias de tratamientos en la cuales se notan diferencias estadísticas; en el cual el tratamiento cinco y el cuatro con cinco y cuatro plántulas por bolsa respectivamente produjeron el mayor número de minitubérculos por bolsa que los demás, y el tratamiento tres y dos con tres y dos plantulas por bolsa fueron superiores al tratamiento uno con una planta por bolsa y siendo este el que menor número de minitubérculos por bolsa rindió.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro No. 23 Análisis de varianza para el número de minitubérculos por bolsa en tres tipos de planta de papa de la variedad alfa. FAUANL, Marín N. L., 1998.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	2	7.55	3.77	0.19	0.826
Error	59	1150.13	19.49		
Total	61	1157.69			
c.v.	48%				

Cuadro No. 24 Análisis de varianza para el número de minitubérculos por bolsa en cinco densidades de plantulas de papa de la variedad alfa. FAUANL, Marín N. L., 1998.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	43.76	10.94	9.94	0.000
Error	20	22.00	1.10		
Total	24	65.76			
c.v.	24%				

Cuadro No. 25. Comparación de medias de tratamientos para el número de minitubérculos por bolsa , Efecto de densidades.

Tratamientos	Medias
5 plantas por bolsa	6.2 A
4 plantas por bolsa	5.4 A
3 plantas por bolsa	4.0 B
2 plantas por bolsa	3.8 B
1 plantas por bolsa	2.4 C

Significancia =0.05

4.3. Fase de campo

4.3.1. Experimento 6

Efecto del tamaño de minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla en la categoría Básica.

En el Cuadro 26 se presentan los cuadrados medios y nivel de significancia del análisis de varianza de un diseño completamente al azar con arreglo factorial, encontrándose diferencias significativas para el origen y calibre del minitubérculo e interacción para rendimiento total de tubérculo semilla y en todas las categorías excepto en las quintas donde solo se presentó diferencias en la interacción calibres por origen.

En el Cuadro 27 se presenta la comparación de medias DMS del rendimiento total y por categorías comerciales de tubérculo y tres orígenes en donde se encontró diferencia el rendimiento total de minitubérculo de segunda generación de bancal fue superior respecto a los otros orígenes. En el rendimiento de tubérculo semilla de las categorías primeras, segundas y terceras, se muestra que no presentaron diferencias los minitubérculos de primera y segunda generación de bancal, superando estos a la primera generación de campo. En la categoría de cuartas, todos los orígenes mostraron diferencias estadísticas entre si, siendo superior el de segunda generación de bancal, seguido por la primera generación de bancal y finalmente la primera generación de campo. Finalmente, la categoría quintas no presentó diferencia estadística con respecto al origen.

Cuadro No. 26 Cuadrados medios y significancia para el rendimiento total de tubérculos semilla Básica y su composición por categorías comerciales en función de tres orígenes y cinco calibres de minitubérculo sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.

FV	Rendimiento o total en t.ha ⁻¹	Rendimiento por categorías de tubérculo en ton.ha ⁻¹				
		1as.	2 ^{as} .	3as.	4as.	5as.
Origen del Minitubérculo (A)	32.685 *	5.607 *	3.689 *	1.256 *	3.882 *	0.04 NS
Calibre del Minitubérculo sembrado (B)	165.160 *	57.771 *	12.668 *	5.120 *	2.145 *	0.22 NS
AXB	29.374*	6.835 *	7.797 *	5.036 *	1.548 *	0.055 *
Error	1.989	1.294	0.401	0.151	0.072	0.020
Total						
CV.%	6.450	11.94	9.59	10.54	16.21	37.08

*= significativo a un nivel de 0.05; N.S= No significativo.

Cuadro No. 27 Comparación del rendimiento total y para categorías comerciales de tubérculo semilla básica obtenido en base a minitubérculos de tres orígenes. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.

Origen del Minitubérculo	Rendimiento total en t.ha ⁻¹	Rendimiento por categorías de tubérculo en ton.ha ⁻¹				
		1as.	2 ^{as} .	3as.	4as.	5as.
2 ^a . Generación de bancal (1)	23.886 a 1	10.10 a	7.079 a	3.954 a	2.325 a	0.427
1 ^a . Generación de bancal (2)	21.283 b 3	9.799 a	6.817 a	3.829 a	1.566 b	0.421
1 ^a . Generación de campo (3)	21.411 b 2	8.679 b	5.92 b	3.287 b	1.089 c	0.314
DMS	1.344	1.084	0.603	0.370	0.256	NS

*= significativo a un nivel de 0.05; N.S= No significativo.

En el Cuadro 28 se presentan la comparación del rendimiento total de semilla básica y su composición en tamaños, para los cinco calibres de minitubérculo sembrados. Para el rendimiento total el cual el calibre tres presentó el rendimiento más alto, seguido por los calibre cuatro, uno, dos y el calibre cero fue el que produjo menor rendimiento total de tubérculo semilla de papa. Para el caso del rendimiento de las cinco categorías, el calibre tres y cuatro fueron superiores estadísticamente a los demás calibres, seguidos por los calibres uno y dos, el calibre cero fue el que presentó los rendimientos mas bajos.

En el cuadro 29 se presenta la comparación del rendimiento total de tubérculo semilla básica, para las quince combinaciones resultantes de los tres orígenes y los cinco calibre de minitubérculo sembrados y se observa dentro que el calibre tres de primer generación de bancal obtuvo el mayor rendimiento total de tubérculos semilla básica, seguido por el calibre cuatro de segunda generación de bancal y primera generación de campo los cuales fueron superiores al resto.

Los rendimientos totales de tubérculos semilla básica promedios y para cada categoría más altos, se lograron con los minitubérculos de los calibres tres y cuatro, de primera y segunda generación de bancal. El rendimiento total fue cercano a las 30 ton/ha¹, el cual es inferior al rendimiento promedio de papa comercial en la región, esto se explica por que para la producción de semilla de papa, el cultivo no se deja a que llegue a su máximo rendimiento, para así evitar que las posibles enfermedades que se presenten no se trasloquen al tubérculo y mantener así su sanidad; adicionalmente, durante el desarrollo del cultivo se eliminan las plantas fuera del tipo y aquellas de las cuales se sospeche del más mínimo síntoma de

cualquier enfermedad, por lo que la densidad de población inicial se reduce y con ello el rendimiento. No obstante que debido a las altas temperaturas, en el año de 1997 se caracterizó por ser un año de bajos rendimientos de papa comercial en la región, los rendimientos de tubérculo semilla básica en este experimento pueden considerarse como muy buenos. Bajo este contexto, los tamaños deseados de minitubérculo para maximizar la producción de semilla Básica de papa son los calibres tres y cuatro. El minitubérculo de calibre tres es el que maximiza el rendimiento total con una mayor composición de tubérculo semilla Básica, por lo que en la producción del minitubérculo en microtúneles con tela antiáfidos deberán darse las prácticas de manejo que permitan maximizar el número de minitubérculos de calibre tres y cuatro que se cosecha.

Posteriormente a la cosecha, se procedió al análisis de semilla Básica que se cosechó en un laboratorio autorizado por la Dirección General de Sanidad Vegetal, con el fin de determinar su sanidad para los fitopatógenos de riesgo en la papa, los análisis fueron negativos, por lo que la semilla cosechada se clasificó en la categoría Básica, estando libres de los virus y bacteria señalados por la NOM-041-Fito-95 de la SAGARPA.

Cuadro No. 28 Comparación del rendimiento total tubérculo semilla básica y su composición por categorías en base al calibre de minitubérculos sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.

Calibres de Minitubérculo sembrados	Rendimiento total en t.ha ⁻¹	Rendimiento por categorías de tubérculo en ton ha ⁻¹				
		1as.	2 ^{as} .	3as.	4 ^{as} .	5as.
3	27.462 a	12.597 a	8.968 a	4.618 a	2.625 a	0.645 a
4	25.511 b	12.187 a	6.798 b	4.555 a	1.715 b	0.506 ab
1	22.272 c	9.048 b	6.298 bc	3.715 b	1.612 bc	0.364 ab
2	20.060 d	8.895 b	5.798 cd	3.055 c	1.284 cd	0.348 ab
0	13.986 e	4.902 c	5.163 e	2.506 d	1.066 d	0.271 b
DMS	1.735	1.399	0.779	0.478	0.331	0.306

Tamaño de las categorías evaluadas:

4=4.6 cm o mayor, 3= 4.5 a3.5 cm, 2=3.4 a 2.6, 1= 2.5 a 1.8 y 0=1.7 a 1.5

Cuadro No. 29 Comparación del rendimiento total de tubérculo semilla básica, para las 15 combinaciones de calibres y origen de minitubérculo sembrado. La Ascensión, Aramberri N. L. Octubre 1997.

Categorías	Origen del minitubérculo	Rendimiento total ton ha ⁻¹
3	1 ^a . Generación en bancal	32.520 a
4	2 ^a . Generación en bancal	29.673 a
4	1 ^a . Generación en campo	26.600 b
1	2 ^a . Generación en bancal	25.323 bc
3	1 ^a . Generación en campo	24.975 bc
3	2 ^a . Generación en bancal	24.890 bc
1	1 ^a . Generación en campo	23.166 c
2	2 ^a . Generación en bancal	22.330 c
2	1 ^a . Generación en bancal	20.479 d
4	1 ^a . Generación en bancal	20.261 d
1	1 ^a . Generación en bancal	18.329 e
2	1 ^a . Generación en campo	17.386 e
0	2 ^a . Generación en bancal	17.208 e
0	1 ^a . Generación en bancal	14.823 f
0	1 ^a . Generación en campo	9.926 g
DMS		3.005

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Fase laboratorio.

5.1.1. Experimento 1

Efecto de diferentes tipos de tapas, tipos de explante en tres variedades en el crecimiento de papa *in vitro*.

CONCLUSIONES:

1. La tapa de polietileno de alta densidad fué en general superior a las tapas convencionales en las variables evaluadas.
2. La utilización de la tapa de polietileno de alta densidad puede disminuir los costos de producción de plantas de papa *in vitro*.
3. La planta *in vitro* de la variedad Atlantic presentó el mejor comportamiento en las variables evaluadas con el tipo de tapa polietileno de alta densidad.
4. El explante de la parte apical fue superior a los de la parte media y basal para producir planta vigorosa de papa *in vitro*.

RECOMENDACIONES:

1. Para aumentar la tasa de multiplicación de las plantas de papa *in vitro* se recomienda la tapa de polietileno de alta densidad y utilizar como explante la parte apical dando un periodo de 15-20 días de crecimiento en cada subcultivo.
2. En la metodología actual donde se utilizaron tubos de vidrio con 25 ml de medio, se recomienda disminuir la cantidad de medio de cultivo a 10 ml por tubo, debido al corto periodo de desarrollo de la planta *in vitro*, lo cual contribuirá a reducir costos y el tiempo ente subcultivos.

5.1.2. Experimento 2 .

Efecto del tratamiento químico (fungicida -bactericida) en brotes de rodajas de papa sobre la contaminación y desarrollo de la planta *in vitro*.

CONCLUSIÓN.

- 1. Se descarta la influencia de los agroquímicos utilizados en la eliminación de patógenos exógenos en rodajas de papa en la variedad Alfa que pudieran influir en la reducción del nivel de contaminación al establecimiento del explante y en la calidad de la planta *in vitro*.**

RECOMENDACIÓN

- 1. Los resultados muestran que puede seguir trabajándose, con el procedimiento convencional de extracción de explantes de brotes de tubérculos visualmente sanos y lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.1.3. Experimento 3

Determinación de la sanidad de las plantas *in vitro* y minitubérculos de papa mediante la técnica serológica ELISA.

CONCLUSIÓN.

Los resultados de laboratorio confirman que bajo las condiciones de microtúnel con tela antiáfidos se conservó la ausencia de virus tanto en planta *in vitro* como en el minitubérculo cosechado a partir de la primeras plantas y así el tubérculo semilla que se genere.

5.2. Fase de invernadero.

5.2.1. Experimento 4.

Producción de minitubérculo a partir de plantas *in vitro* envejecidas.

CONCLUSIÓN.

1. Bajo condiciones controladas el tipo de planta *in vitro* envejecida, puede ser utilizada para la producción de minitubérculos.

RECOMENDACIÓN.

1. No obstante de que una planta *in vitro* envejecida por no subcultivarse, si aún está viva, es posible utilizarla con éxito para la producción de minitubérculo.

5.2.2. Experimento 5.

Evaluación de diferentes densidades de plántulas provenientes de minitubérculos sembrados en bolsas para la producción de minitubérculo de papa de la variedad Atlantic.

CONCLUSIÓN.

1.- Es posible obtener un rendimiento aceptable de 5.3 a 6.5 minitubérculos por bolsas transplantando a cada bolsa de 4 a 5 plántulas provenientes de microtubérculo de papa de la variedad Atlántic.

RECOMENDACIÓN.

1.- Estos resultados indican que la producción de minitubérculo bajo el sistema utilizado puede ser llevado a cabo partiendo de microtubérculo por productores de papa que no poseen invernaderos sofisticados y lograr así su autoabasto de tubérculo semilla de papa de alta calidad fitosanitaria y genética; y de esta manera lograr una mayor seguridad en sus sistemas de producción en este cultivo.

5.3. Fase de campo.

5.3.1. Experimento 6

5.3.1. Efecto del tamaño de minitubérculo de papa en el rendimiento de tubérculo semilla en la categoría Básica

CONCLUSIONES.

1. Los máximos rendimientos de papa en la primer generación de campo o categoría Básica se logran con minitubérculos de los calibres 3 y 4.
2. La calidad fitosanitaria y genética de la semilla de papa en la categoría Básica depende de la sanidad inicial del minitubérculo utilizado, de las prácticas de control fitosanitario en el campo, de la eliminación de las plantas con mínimos síntomas de cualquier enfermedad al inicio de su crecimiento y de aquellos que no se ajusten al tipo de planta de la variedad sembrada.

RECOMENDACIONES.

1. De acuerdo a los resultados se recomiendan los calibres 3 y 4 para la producción de tubérculo semilla de papa en su categoría de Básica en la variedad Atlantic.
2. La producción de semilla de papa en la categoría Básica de alta calidad fitosanitaria y genética, es posible lograrla con el uso de microtúneles de tela antiáfidos en vez de las instalaciones costosas que representan las de invernaderos sofisticados.

VI. LITERATURA CITADA

Alonso , F. 1996. El Cultivo de la patata. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España.

Atlantic Canadá Potato Guide. 1993. Advisory Committee on Potatoes. Atlantic Provinces Agriculture Services Co-ordinating Committee. 59 p

Bryan, J. E. 1995. Parcela de semilla de papa. Técnica al alcance del agricultor. Boletín de información técnica. CIP reimpresión 13p

Cruz, 1998. Detección e identificación de Fitopatógenos de Importancia Cuarentenaria. SAGAR.

Cruz, F. M. y Farias, T. G. 1997. Guía ilustrada de la prueba de inmunoabsorción con Enzimas Ligadas para la detección de Fitopatógenos (ELISA).

SAGAR Comité Nacional de Sanidad Agropecuario. México D.F. 23p.

CIP, 1997. Tissue Culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. International Potato Center, Lima, Perú..

Espinoza, N. Lizarraga, R., Sigueñas, C., Buitron, F. .Bryan, J., Dodds, J. 1992. Tissue Culture micropropagation, conservation and export of potato germoplasm. International Potato Center, Lima, Perú..

Gálvez y Lorence, 1997. Cuaderno de Vigilancia Biotecnológica. De Centro para la innovación Tecnológica, México D.F.

Hettemma, S/F. Seed Potatoes-Pommes de terre de Semense. Isla del Príncipe Eduardo. Canadá.

Hawkins, 1996. Seed potato Specialist, NB Agriculture, Fredericton, NB.

Hernández, R. 1996. Curso de saneamiento de enfermedades vírales de papa.

Jayasinghe, V. y Salazar, L. F. 1993. Manual de técnicas en virología de plantas fascículos CIP Lima Perú.

Lozoya, 1995. Curso de saneamiento de papa. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Marín N. L.

Leatal, J. R. Nuclear seed potato production. 28p

Matthews, 1970. Plant Virology. By Academic Press, New York San Francisco London.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 473-497p

NOM-041-FITO-1995 SAGAR. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. Secretaría de Agricultura. Ganadería y Desarrollo Rural. Diario Oficial. México, D.F.

Olivares, 1993. Paquete Computacional de Diseños Experimentales. FAUANL. Fac. de Agronomía de la UANL., Marín, N. L. México.

Peralta, E. L. y Farias. M. T. 1987. Manual sobre la Técnica de inmunoenzimática ELISA. ENPES, La Habana, Cuba. 71p.

Rowe, 1993. Potato Health Management. University of Wisconsin, Madison.

SAGAR, 1996. (Secretaría de Agricultura y Ganadería) Guía Ilustrada de la Prueba de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas para la detección de fitopatógenos de importancia cuarentenaria. Departamento de Fitopatología. México, D. F.

Saad, 1997. Cuaderno de Vigilancia Biotecnológica. De. Centro para la innovación Tecnológica, México D.F.

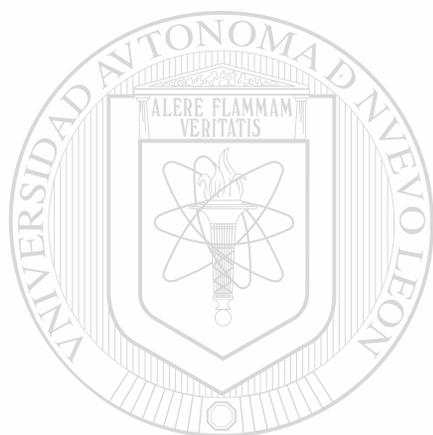
Valdés, 1994. Curso Taller: Evento De Aprobación De Profesionales en Producción de Semillas De Papa Y Certificación Sanitaria. Fac. de Agronomía. UANL. Marín N.L. México.

Valdés, 1995. La Biofábrica una Alternativa Para México. V Ciclo de Conferencias para el Fitotecnista. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Fitomejoramiento. Buena Vista, Saltillo, Coahuila, México.

Valdés, 1998. Producción de semilla Agámica de Papa y otras Especies Vegetales Informes Técnicos Semestrales: Enero-Junio 1997, Julio - Diciembre 1997 y Enero - Junio 1998. Sistema de Investigación Alfonso Reyes SIREYES 95/034. FAUANL, HBR, IDP-UCLV.

Valdés, y Moreno. 1999. Integración Tecnológica para Producir Semilla de Papa de Alta Calidad en el Noreste de México. IX Congreso Nacional de Productores de Papa. León, Gto. México.

Van der Zaag, 1987. Yield reduction in relation to virus infection. In: Viruses of Potatoes and Seed - Potatoes Production Chap. Podoc, Wagenien, Netherlands.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Apendice

Pasos en el protocolo de la técnica serológica ELISA

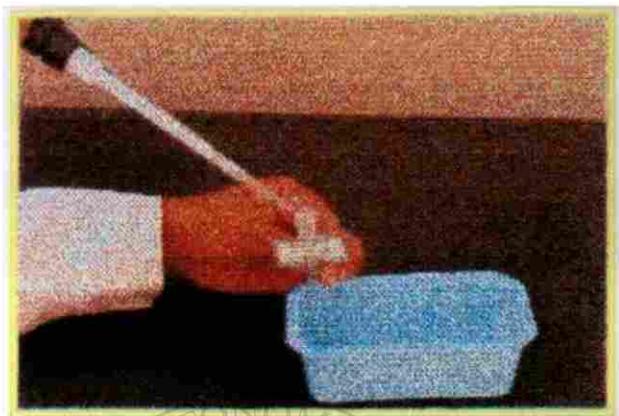


Figura 2A. Preparación de una solución amortiguadora (SOLAM) adsorción o cobertura.

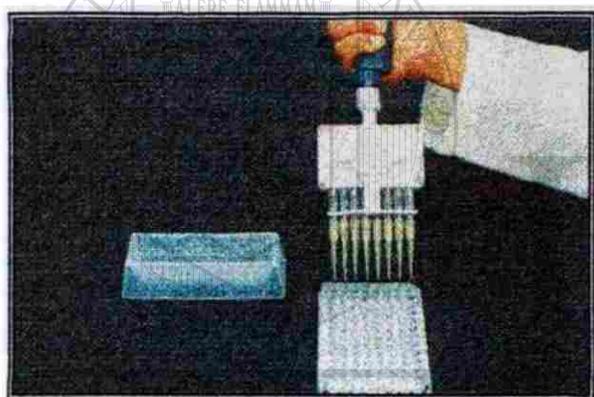


Figura 2B. Agregar 100ul de la gamaglobulina purificada (anticuerpo) con la ayuda de una micropipeta.



Figura 3A. Lavado de la placa de microtitulación con la ayuda de una pizeta

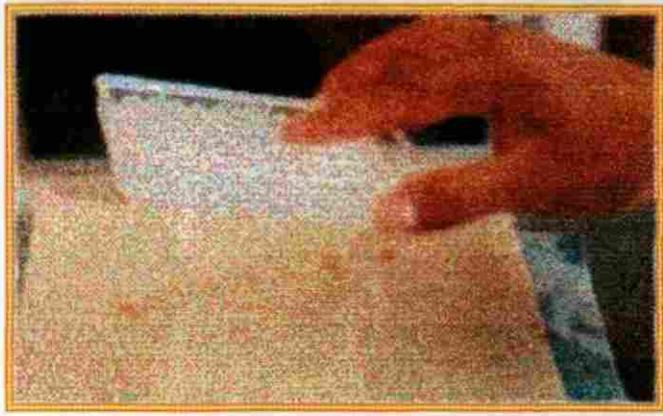


Figura 3B. Secado de la placa de microtitulación golpeando con firmeza sobre el papel secante hasta eliminar la solución de fosfatos + Tween (SF+T).

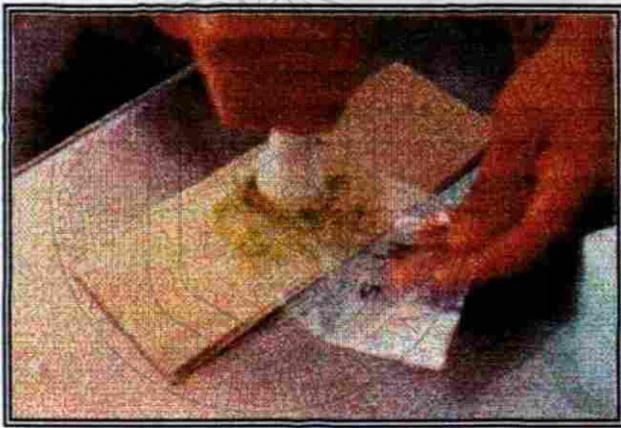


Figura 4A. Macerado del tejido colocándolo en bolsas de plástico en una (SOLAM) de extracción.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®



Figura 4B. macerado mecánico del tejido en macerador tipo taladro.



Figura 4C. Se toman 100ul de tejido macerado con una micropipeta.

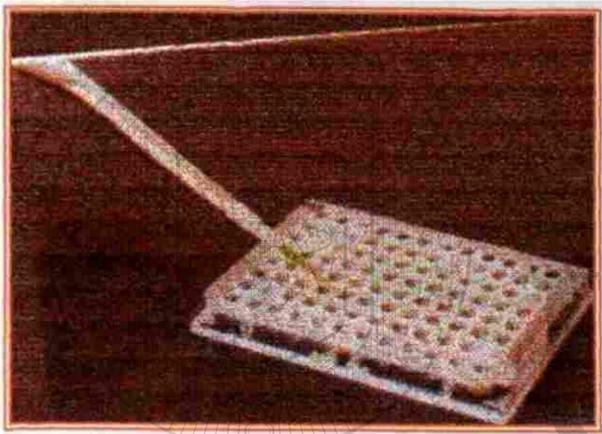


Figura 4D. Se agregan 100ul del tejido macerado a un pocillo de la placa con su repetición, y con una micropipeta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Figura 4E. Incubación de la placa de microtitulación en camara humeda.



Figura 6B. adicionar 100ul de la solución sustrato a cada pocillo de la placa con una micropipeta multicanal

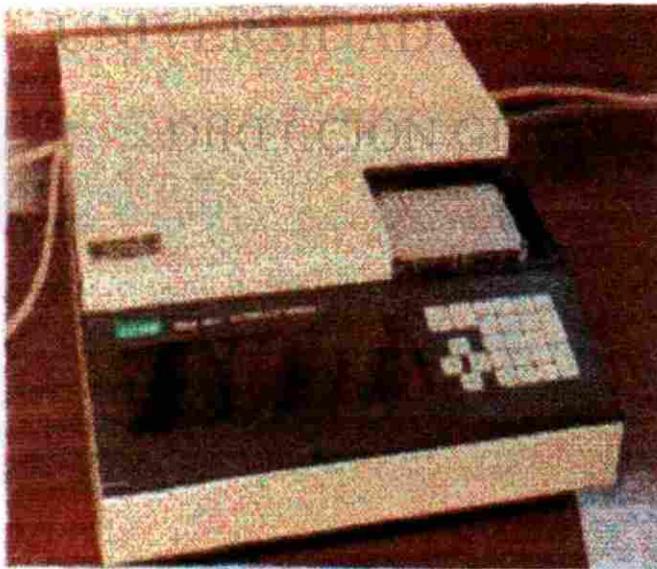


Figura 6C. Medición de la reacción mediante un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 405 y 620nm

VII. APÉNDICE

7.1. Pasos en el protocolo de la técnica serológica ELISA

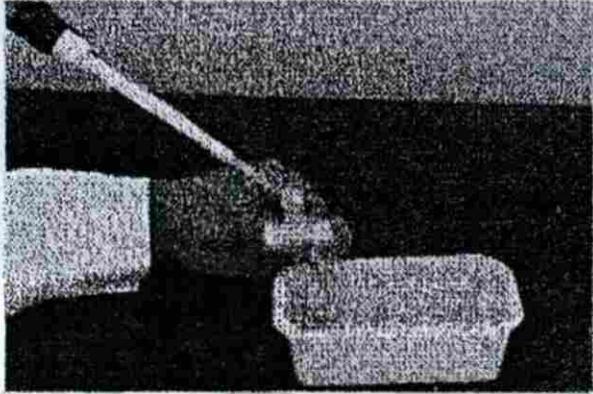


Figura 2A. Preparación de una solución amortiguadora (SOLAM) adsorción o cobertura.

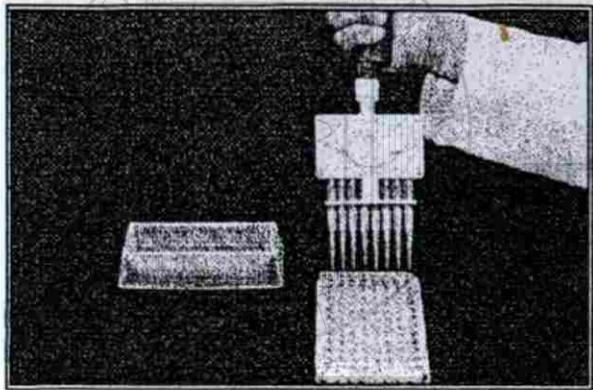


Figura 2B. Agregar 100ul de la gamaglobulina purificada (anticuerpo) con la ayuda de una micropipeta.

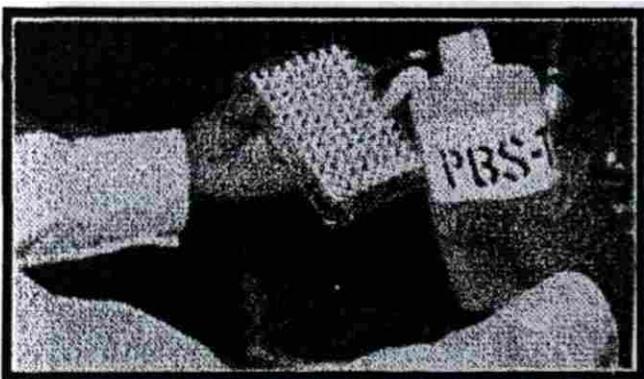


Figura 3A. Lavado de la placa de microtitulación con la ayuda de una pizeta

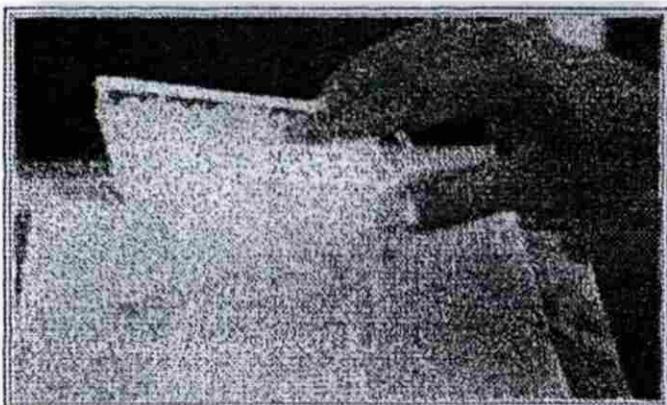


Figura 3B. Secado de la placa de microtitulación golpeando con firmeza sobre el papel secante hasta eliminar la solución de fosfatos + Tween (SF+T).

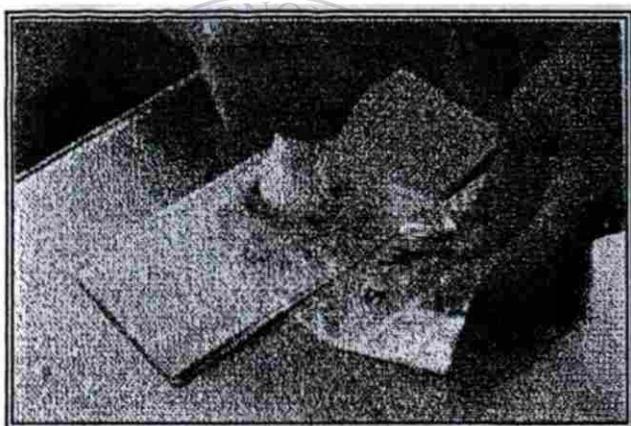


Figura 4A. Macerado del tejido colocandolo en bolsas de plástico en ura (SOLAM) de extracción.

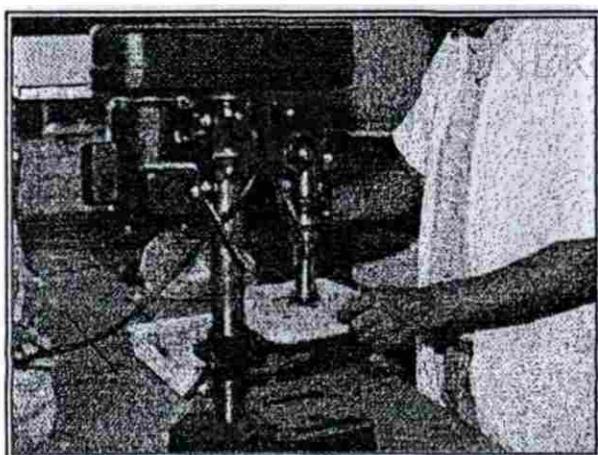


Figura 4B. macerado mecanico del tejido en macerador tipo taladro.

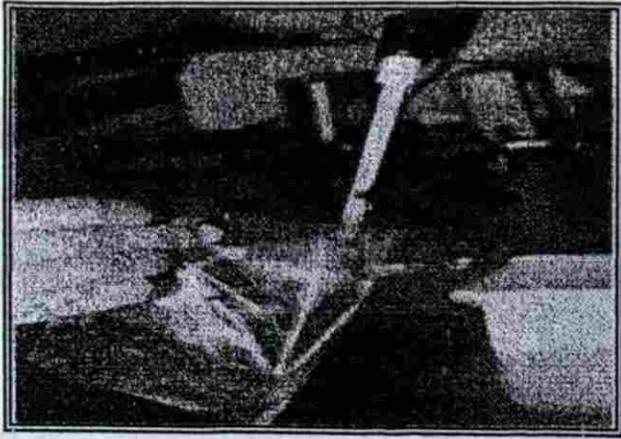


Figura 4C. Se toman 100ul de tejido macerado con una micropipeta.

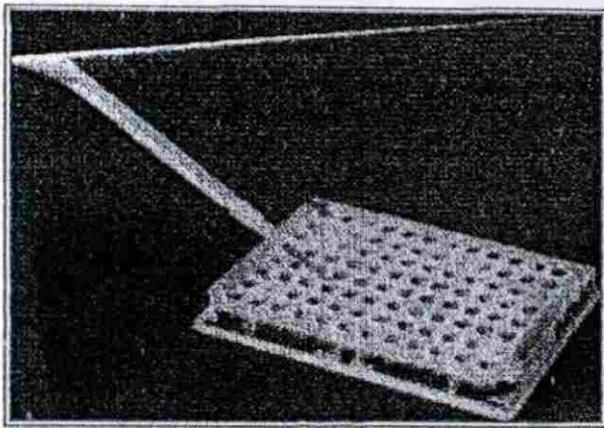


Figura 4D. Se agregan 100ul del tejido macerado a un pocillo de la placa con su repetición, y con una micropipeta.

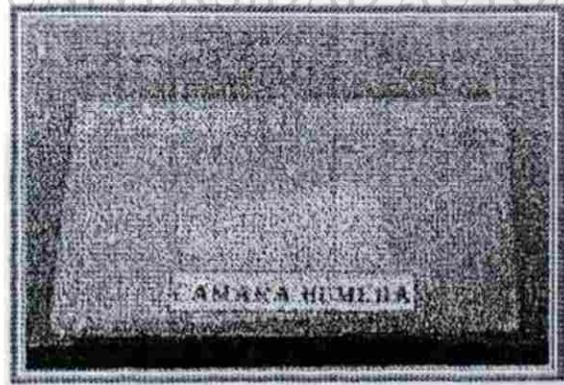


Figura 4E. Incubación de la placa de microtitulación en camara humeda.

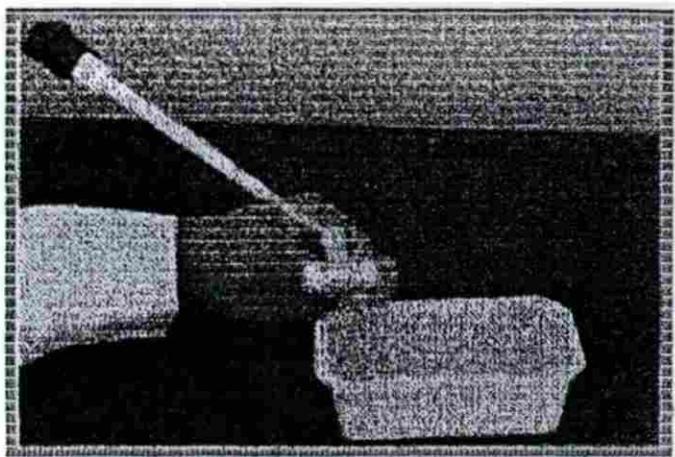


Figura 5A. Dilución del conjugado enzimático en una SOLAM de reactivo.

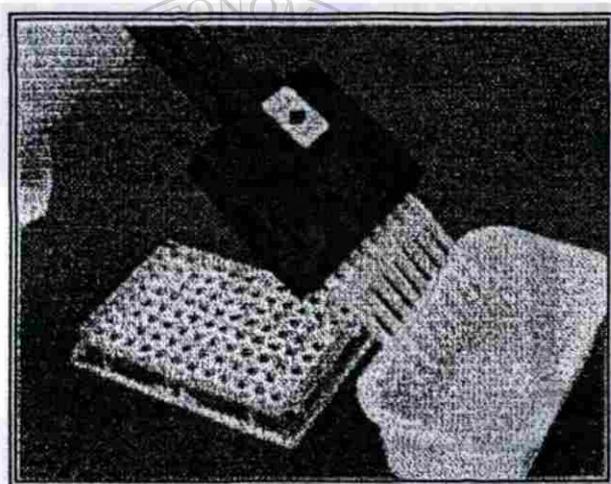


Figura 5B. agregar 100ul del conjugado enzimático a cada pocillo de la placa con una micropipeta multicanal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Figura 6A. agregar una pastilla de para-nitofenil fosfato (PNP) por cada 5ml de SOLAM de sustrato.

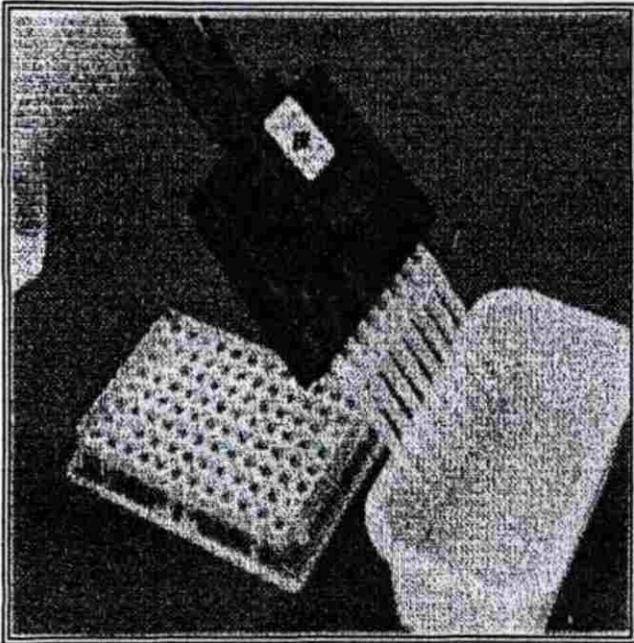


Figura 6B. adicionar 100ul de la solución sustrato a cada pocillo de la placa con una micropipeta multicanal

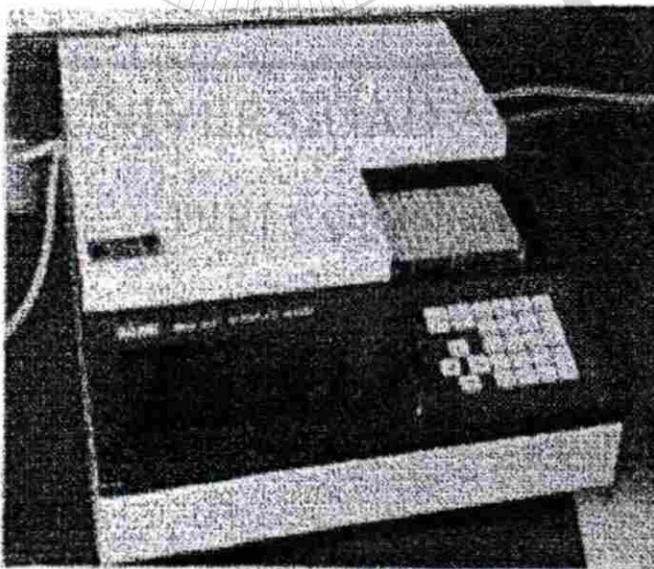
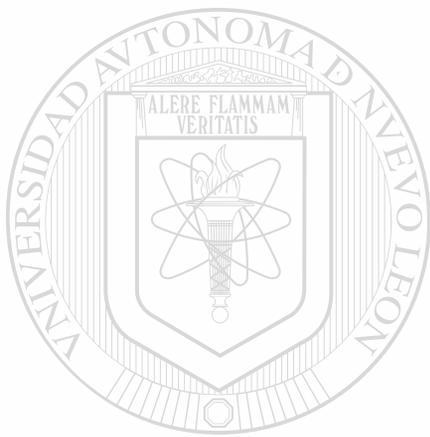


Figura 6C. Medición de la reacción mediante un lector de placas ELISA a una longitud de onda de 405 y 620nm



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



