

Nota Técnica

USO DE ABONOS FOLIARES COMERCIALES EN LA ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO *in vitro*

Álvaro Azofeifa¹*, Eric Guevara*, Víctor M. Jiménez*

Palabras clave: Abonos foliares, cultivo *in vitro*, medios de cultivo, papa, sales.

Keywords: Foliar fertilizer, inexpensive medium, potato, tissue culture.

Recibido: 05/06/08

Aceptado: 01/08/08

RESUMEN

Se evaluó el uso de abonos foliares comerciales para el cultivo *in vitro* de microestacas de papa cv. Atzimba, como alternativa de bajo costo a las sales minerales de Murashige y Skoog (MS). Microestacas de plantas de papa cultivadas en medio MS se transfirieron a 5 combinaciones de abonos, 2 equiparadas molarmente en su composición al MS (AMSF, AMSF+Intra) y las otras 3 (MF+Intra, MF+Micro+Intra, MF+Foli+Agro+Intra), ajustadas a los contenidos de N, P, K y Mg del MS. El medio MS se incluyó como testigo. En todos los casos se realizó transferencias mensuales. Durante 5 meses se evaluó, semanalmente, la altura de la planta, el número de yemas y raíces, clorosis, y, al final del 5^{to} subcultivo, el peso fresco. Los mejores resultados se obtuvieron con los medios MS, AMSF y AMSF+Intra. En los demás se observó una disminución gradual del crecimiento de las plantas, y un incremento en la clorosis. De las formulaciones con buenos resultados, AMSF fue la más barata (US\$0,012 l⁻¹), seguida por AMSF+Intra (US\$ 0,025 l⁻¹), y el MS (US\$ 3,411 l⁻¹). Los resultados obtenidos permiten considerar la factibilidad de emplear abonos foliares de bajo costo, como reemplazo de las sales minerales de alta pureza en la elaboración del medio de cultivo MS, para la propagación *in vitro* de plantas de papa cv. Atzimba, al menos por períodos de tiempo limitados.

ABSTRACT

Use of commercial foliar fertilizers to prepare *in vitro* culture media. The use of commercial foliar fertilizers was evaluated as a low-cost alternative to the Murashige and Skoog (MS) tissue culture-grade mineral salts, for *in vitro* culture of potato cv Atzimba microcuttings. Five foliar fertilizer formulations were evaluated, 2 of them equimolar to the MS mineral salts (AMSF, AMSF+Intra) and the other 3 (MF+Intra, MF+Micro+Intra, MF+Foli + Agro+Intra) adjusted to the N, P, K and Mg contents in the MS. The MS prepared with tissue culture-grade mineral salts was included as a control. Subcultures were carried out every month. Plant height, number of buds and roots, as well as chlorosis were evaluated monthly, while fresh weight was assessed at the end of the 5th subculture. Best results were obtained with MS, AMSF and AMSF+Intra culture media. In all other media plant growth decrease and chlorosis increased. The cost of 1 liter of AMSF medium was US\$ 0.012, being the cheapest, followed by AMSF+Intra (US\$ 0.025 l⁻¹) and the MS with US\$ 3.411 l⁻¹. According to the results of this work, it is feasible to use commercial foliar fertilizers to replace the tissue culture-grade mineral salts normally used in the preparation of the MS medium for potato cv. Atzimba, at least for limited periods of time.

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: alvaro.azofeifa@ucr.ac.cr

* Centro de Investigación en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

La multiplicación de plantas a través de las técnicas de cultivo in vitro se ha convertido en una herramienta indispensable en la agricultura moderna. Gran parte de este éxito se debe al desarrollo, a partir de la década de 1950, de medios de cultivo con altos contenidos de sales minerales y en particular de amonio (Vasil 2008). Si bien se considera que existen 13 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, la determinación de los niveles óptimos es compleja (Niedz y Evens 2007). En 1962, Toshio Murashige y Folke Skoog desarrollaron, basándose en el contenido de compuestos inorgánicos de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38), un medio de cultivo que permitió el crecimiento y desarrollo satisfactorios de callos de tabaco. Luego de su publicación (Murashige y Skoog 1962), este medio, conocido como MS empezó a ser utilizado extensivamente en una gran cantidad de especies vegetales, a veces muy distantes taxonómicamente del tabaco, y en una gran diversidad de estructuras vegetales. Gran parte del éxito de este medio, se debe a los niveles altos en sales de amonio, fosfato y de potasio; los cuales han probado ser críticos en los procesos organogénicos de la mayoría de especies estudiadas (Hughes 1986, Pierik 1987). En la actualidad, el MS es el medio de cultivo más utilizado para el cultivo in vitro de plantas (George y de Klerk 2008). Esto porque aunque no contiene necesariamente las cantidades óptimas para todos los explantes, de las diversas especies en que se emplea, la mayoría presentarán cierto grado de crecimiento, lo que representa un punto de partida (Niedz y Evens 2007).

Zimmerman et al. (1995) mencionan que el costo económico de los diferentes componentes de un medio de cultivo, tanto para laboratorios de investigación como para los comerciales, es un criterio importante en la toma de decisiones. Datos de la IAEA (2004), indican que en los países en vías de desarrollo, el costo de los ingredientes del medio de cultivo (sales minerales, azúcar, agente gelificante y agua), la mano de obra, y la energía eléctrica representan de 30-35% del costo de producción.

Se han realizado varios intentos para reducir costos en la preparación de medios de cultivo, pero estos se han enfocado principalmente a sustituir los azúcares y agentes gelificantes por fuentes más baratas (Ganapathi et al. 1995, Jain y Babbar 2002, Leite et al. 2002, Lucyszyn et al. 2006, 2007, Tyagi et al. 2007, Vieira et al. 2007). Adicionalmente, se ha buscado sustituir completamente las soluciones nutritivas por otras con menor contenido de nutrimentos, aunque utilizando productos con grado reactivo. Un ejemplo lo presentan Ganapathi et al. (1995), quienes lograron propagar banano, con un éxito limitado, al sustituir las sales de MS por las de Knop, mucho más pobres en elementos minerales. Si bien Hurtado y Merino (1997), consideran que la pureza de los ingredientes de un medio de cultivo es un factor crítico, y mencionan la necesidad de que los reactivos utilizados sean de calidad “químicamente pura”, también se ha intentado la sustitución completa de medios de cultivo clásicos por medios mucho más baratos, utilizando fertilizantes foliares para ese fin. En este último grupo está el trabajo de Gutiérrez (1996), quien usó el fertilizante 7-6-19 para aportar las sales minerales al medio de enraizamiento de meristemas de *Cattleya* sp. Por su parte, Pollock y Oppenheimer (1999), utilizaron el fertilizante 20-10-20 en el cultivo de semillas de *Arabidopsis thaliana*, con la finalidad de reducir costos. Sin embargo, los autores del presente trabajo no conocen ninguna publicación referente a la formulación de un medio de cultivo clásico, utilizando fuentes más baratas y de fácil acceso de elementos minerales.

La papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Atzimba) ha sido cultivada por varios años de forma rutinaria en nuestro laboratorio, y se ha utilizado como planta modelo para diversas evaluaciones. Por ello se conocen muy bien sus condiciones de cultivo in vitro. Adicionalmente, se desarrolla bien en medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento.

En vista de lo anterior, el objetivo de este trabajo, fue determinar la factibilidad del uso de algunos fertilizantes foliares comerciales, como

sustitutos de los macro y micronutrientes en la elaboración de un medio de cultivo, sencillo, barato y accesible, que sea alternativo al medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) en papa cv. Atzimba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica.

Material vegetal

Los explantes se seleccionaron de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Atzimba), previamente establecidas in vitro, en un medio de cultivo MS, formulado con reactivos con alto grado de pureza, y reproducidas rutinariamente por microestacas. Estas plantas presentaban buen crecimiento y ningún síntoma aparente de deficiencia nutricional. Con el fin de garantizar una mayor homogeneidad del material vegetal, las microestacas que se utilizaron (0,5-1 cm de longitud, con 1 yema), se obtuvieron de la parte media de las plantas. Este procedimiento se repitió para cada subcultivo.

Procedimiento

Cada microestaca se cultivó en un tubo de ensayo de 18x150 mm, el cual contenía 7 ml de medio de cultivo semisólido.

Se realizaron subcultivos a medio de cultivo fresco cada 4 semanas, durante 5 meses. Las evaluaciones de las diferentes variables se realizaron semanalmente durante todo el período del experimento. Solamente la variable de peso fresco se determinó al final del experimento.

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en medios de cultivo elaborados a partir de productos comerciales (Cuadro 1).

Se estudiaron los siguientes 6 medios de cultivo:

1. **MS:** Sales minerales formuladas con reactivos con alto grado de pureza y las vitaminas de Murashige y Skoog (1962); 36,7 mg.l⁻¹ de la sal ferro-sódica del ácido etilendiamino tetra-acético (Na-Fe EDTA) y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
2. **MF+Intra:** Este medio se preparó equiparando, según molaridad, los macronutrientes del MS con los productos comerciales N.º 8, 9, 10 y 11 (Cuadro 1). Las dosis empleadas se presentan en el cuadro 2. Se utilizaron, además, los micronutrientes y vitaminas del MS, así como 0,66 ml de Intrafer[®] y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
3. **AMSF+Intra:** Este medio se preparó equiparando, según molaridad, los macro y micronutrientes del MS con los productos comerciales N.º 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, y 12 (Cuadro 1). Las dosis empleadas se presentan en el cuadro 2. Adicionalmente, se emplearon las vitaminas del MS, 0,66 ml de Intrafer[®] y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
4. **MF+Micro+Intra:** Este medio se preparó equiparando, según molaridad, los macronutrientes del MS con los productos comerciales N.º 8, 9, 10 y 11 (Cuadro 1). El Mg y los micronutrientes se agregaron con el producto comercial N.º 7 (Cuadro 1). Para ajustar la dosis de este producto, se consideró únicamente la equiparación molar del Mg del producto comercial, respecto de su nivel en el MS. Las dosis empleadas se presentan en el cuadro 2. Adicionalmente, se usaron las vitaminas del MS, 0,66 ml de Intrafer[®] y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.
5. **MF+Foli+Agro+Intra:** Este medio se preparó equiparando, según molaridad, los macro nutrientes del MS con los productos comerciales N.º 8, 9, 10 y 11 (Cuadro 1). El Mg y los micronutrientes se agregaron con los productos comerciales N.º 2 y 5 (Cuadro 1). Para ajustar la dosis de estos productos, se consideró la

Cuadro 1. Composición porcentual de los diferentes elementos en los productos comerciales utilizados en la elaboración de los medios de cultivo evaluados.

Nombre comercial	Producto N.º	Composición porcentual												
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Ca	S	Fe	Cu	Zn	B	Mo	Co	Mn
Ácido bórico Fedecoop	1										17,71			
Agromart Óxido de magnesio	2			0,035	16,5	0,002								
Coopecide 101 77 FW	3								60,8					
Azufre (Productos Quiflo)	4						99,97							
Foliveex Combi	5				6		7,8			4,5	1,5	0,1		1
Intrafer ® TF	6							*						
Micromax Combi	7				18,26		8	1,3	0,65	2	0,5	0,01	0,005	3,1
Nitrato de amonio	8	33,5												
Nitrato de potasio, CAFESA	9	13		46										
Sarefix Nitrato de calcio	10	15,5				19								
Super Green	11	20	20	20										
S-Z Fedecoop	12						10,21			20,7				

* Cada ml contiene hierro aminoquelatado equivalente a 8,55 mg de hierro elemental.

Cuadro 2. Cantidad (g) del producto comercial utilizada en la preparación de 1 litro de medio de cultivo.

Nombre comercial	Medio de cultivo				
	MF + Intra	AMSF + Intra	MF + Micro + Intra	MF + Foli + Agro + Intra	AMSF
Super Green	0,4403	0,4403	0,4403	0,4403	0,4403
Ácido bórico Fedecoop		0,0063			0,0063
Agromart Óxido de magnesio	0,3646	0,3646		0,109	0,3646
S-Z CEDECOOP		0,0116			0,0116
Coopecide 101 77 FW		0,0099			0,0099
Sarefix Nitrato de calcio	0,6305	0,6305	0,6305	0,631	0,6305
Nitrato de amonio	1,2015	1,2015	1,2015	1,202	1,202
Intrafer ® TF	0,66 *	0,66 *	0,66 *	0,66 *	
Nitrato de potasio, CAFESA	1,9429	1,9429	1,9429	1,9429	1,9429
Azufre (Productos Quiflo)		0,0538			0,0538
Micromax Combi			0,3294		
Foliveex Combi				0,704	

* Corresponde a ml.

equiparación molar del Mg de los productos comerciales, con respecto de su nivel en el MS, el resto de elementos quedaron por añadidura. Las dosis empleadas se presentan en el cuadro 2. Se utilizaron, además, las vitaminas del MS, 0,66 ml de Intrafer[®] y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

6. **AMSF:** Este medio se preparó equiparando, según molaridad, los macro y micronutrientes del MS con los productos comerciales N.º 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 12 (Cuadro 1). Las dosis empleadas se presentan en el cuadro 2. Se usaron, además, las vitaminas del MS, 36,7 mg.l⁻¹ de Na-Fe EDTA y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

En todos los casos el pH se ajustó a 5,8 con KOH, se agregó 8 g.l⁻¹ de agar (Riedel-de Haën, Hannover, Alemania). Los medios de cultivo se autoclavaron a 120°C (103 kPa) por 20 min.

Variables evaluadas

Al final de cada subcultivo (4 semanas), se evaluó el número de yemas en el brote principal, la longitud del brote principal (cm), el número de raíces por planta, el número de plantas normales (plantas sin síntomas visuales de deficiencia nutricional, clorosis, albinismo o necrosis). El peso fresco (g) se midió al final del quinto subcultivo. Se utilizó un total de 20 repeticiones por tratamiento. Se utilizó la prueba de Duncan para comparar los pesos frescos (Statística 6.0, StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

Condiciones de cultivo

Durante el crecimiento, los explantes se mantuvieron a una temperatura de 24°C, con un fotoperiodo de 12 h luz (10,9 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, Sylvania Supersaver Cool White, 32 W, F48T12/CW/SS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de los medios de cultivo

La preparación de todos los medios de cultivo fue igual de laboriosa, tanto en aquellos

en los que se usaron las sales minerales con alta pureza, como en los que se utilizaron los fertilizantes foliares. Sin embargo, la compra de los productos comerciales no revistió mayor dificultad ni requirió de permisos, tiempo o trámites engorrosos, como ocurre con la adquisición de productos puros o de grado reactivo, especialmente si es necesario importarlos.

Durante la preparación de los medios de cultivo, se observó una alta solubilidad de la gran mayoría de los productos comerciales empleados en su formulación (Cuadro 3).

Pierik (1987), indica que uno de los problemas más frecuentes, durante la elaboración de un medio de cultivo, es la formación de precipitados cuando se combinan las diferentes sales minerales. El azufre (Productos Quiflo) no se disolvió adecuadamente y presentó una cantidad importante de partículas sólidas de diferente tamaño en suspensión, que se consideraron impurezas. En los productos Micromax Combi y nitrato de amonio también se observaron impurezas: partículas y cristales de diferente tamaño, así como segmentos del recubrimiento del fertilizante, todas insolubles.

En estos casos, es importante considerar que dentro de la formulación del producto comercial, además del elemento nutritivo, se adicionan ingredientes inertes para acondicionar y mejorar su eficiencia en las aplicaciones normales en el campo. Un ejemplo es el uso de diatomita en el recubrimiento externo de algunos fertilizantes (Bertsch 1995). En este experimento, la existencia de estos aditivos, probablemente, se evidenció como impurezas.

En la etiqueta del producto Micromax Combi, se indica que está formulado con micronutrientes metálicos completamente quelatizados; los cuales no son compatibles con productos fuertemente alcalinos o aquellos que contienen microelementos metálicos, en forma de sulfato u óxido, lo cual pudo haber causado los precipitados. Bertsch (1995) indica que, en general, se debe evitar la mezcla de sales que contengan Ca con fertilizantes que tienen S (sulfatos) y fosfato, sales de Mg con fosfatos y fuentes de P con Zn que no sea en forma de quelatos.

Cuadro 3. Solubilidad, formación de precipitados o presencia de impurezas (partículas sólidas en suspensión) de los productos comerciales empleados en la elaboración de los medios de cultivo.

Producto comercial	Solubilidad*	Observación
Ácido bórico Fedecoop	Alta	Sin problemas en el uso
Agromart Óxido de magnesio	Alta	Sin problemas en el uso
Coopecide 101 77 FW	Alta	Sin problemas en el uso
Azufre (Productos Quiflo)	Media	Presentó impurezas
Foliveex Combi	Alta	Sin problemas en el uso
Intrafer ® TF	Alta	Sin problemas en el uso
Metalosato de hierro 250 CC Fol	Baja	Formó precipitado
Micromax Combi	Alta	Presentó impurezas
Nitrato de amonio	Alta	Presentó impurezas
Nitrato de potasio, CAFESA	Alta	Sin problemas en el uso
Sarefix Nitrato de calcio	Alta	Sin problemas en el uso
Super Green	Alta	Sin problemas en el uso
S-Z Fedecoop	Alta	Presentó impurezas

* Escala cualitativa de solubilidad; alta, media y baja, basada en la apariencia visual de las disoluciones.

Otro inconveniente se observó con el uso del Metalosato de hierro 250 CC Fol. Este producto, luego de ser agregado al medio de cultivo favoreció la formación de precipitados, lo que obligó al uso de otra fuente de Fe (Intrafer ® TF, producto farmacéutico). Hughes (1986), menciona que algunas formas de Fe, como citrato y tartrato, son difíciles de disolver y precipitan con mucha facilidad durante la preparación del medio de cultivo. Ello ha motivado el uso de compuestos de Fe quelatado, que presentan mayor solubilidad en el medio de cultivo y una mayor absorción por parte de las estructuras vegetales. La utilización del Na-Fe EDTA como la fuente de Fe, en el medio de cultivo, ha permitido una menor formación de precipitados que las sales con sulfato y cloruro (Pierik 1987).

Basándose en los resultados anteriores, se puede indicar que resulta fundamental considerar el grado de pureza y solubilidad de los fertilizantes, así como su compatibilidad química, cuando son mezclados durante la elaboración de

un medio de cultivo particular, y que es necesario hacer pruebas de compatibilidad y precipitación cuando se use productos nuevos.

En el cuadro 4 se presentan los valores de pH antes del ajuste y el grado de transparencia e impurezas, observados en los medios de cultivo, luego de ser preparados, pero antes de añadir el gelificante. Se puede notar que los valores del pH son particularmente bajos ($\approx 3,45$) para los medios que incluyeron al Intrafer ® TF en su preparación. El medio AMSF presentó un pH (5,78), ligeramente superior al del MS (5,42), pero muy similar al pH ajustado de los medios de cultivo (5,7-5,8), usado para favorecer la disponibilidad de algunos nutrimentos al explante (Thorpe et al. 2008). En este caso, el medio AMSF se aproximó a este valor sin necesidad del ajuste. Debe notarse que visualmente no se observaron precipitados. Bertsch (1995), menciona que los fertilizantes, según su composición, pueden acidificar o basificar el medio. Fertilizantes amoniacales, como el sulfato de amonio, la urea y el fosfato de amonio,

Cuadro 4. Valores de pH antes del ajuste, transparencia e impurezas observadas luego de preparado el medio de cultivo.

Medio de cultivo	pH antes del ajuste	Grado de transparencia	Impurezas
MS	5,42	Transparente	Ninguna *
MF + Intra	3,45	Ligeramente café – rojizo	Algunas impurezas
AMSF + Intra	3,46	Ligeramente café – rojizo	Algunas impurezas
MF + Micro + Intra	3,46	Ligeramente café – rojizo	Algunas impurezas
MF + Foli + Agro + Intra	3,47	Ligeramente café – rojizo	Algunas impurezas
AMSF	5,78	Transparente	Escasas impurezas

* Escala cualitativa visual: Ninguna (valor mínimo), escasas, algunas, muchas (valor máximo).

son considerados de reacción ácida, mientras que el nitrato de sodio, el nitrato de calcio y el nitrato de potasio son de reacción básica. Algunos, como el nitrato de amonio, son relativamente neutros, lo mismo que los fertilizantes potásicos y el superfosfato triple.

Se observó que los medios MS y AMSF presentaron una apariencia translúcida, sin impurezas en el primero y escasas en el segundo. Los demás medios presentaron una apariencia ligeramente café-rojiza, debida probablemente al Intrafer® TF, con algunas impurezas. Si bien el autoclavado puede facilitar la formación de precipitados (Ramage y Williams 2002), en los medios preparados no se evidenció su presencia.

VARIABLES DE CRECIMIENTO

Número de yemas en el brote principal

Los medios de cultivo AMSF, MS y AMSF Intra presentaron el mayor número de yemas en el brote principal en los 5 subcultivos realizados, sin que se observara diferencias significativas entre ellos, con excepción del medio AMSF+Intra en el cuarto subcultivo, que presentó una disminución significativa del número de yemas formadas (Figura 1).

Los medios MS y AMSF presentaron un comportamiento muy similar entre ellos para esta variable. Pollock y Oppenheimer (1999), tampoco observaron diferencias en el crecimiento de

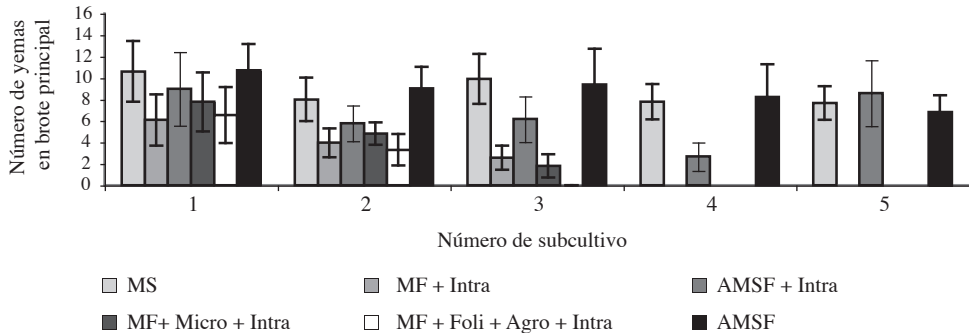


Fig. 1. Número de yemas presentes en plantas de papa, al final de cada subcultivo, según el tipo de medio de cultivo (en los subcultivos 4 y 5 no se continuó con la evaluación de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra).

plantas de *Arabidopsis*, al cultivarlas en un medio suplementado con el fertilizante comercial 20-10-20, comparado con lo obtenido en el medio MS.

En el caso de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra, si bien no presentaron diferencias significativas en el primer subcultivo, con los medios MS, AMSF y AMSF+Intra, en los subcultivos posteriores, se observó una disminución continua y significativa, tanto en el número de yemas como en el crecimiento, particularmente en el tercer subcultivo. Esta baja respuesta motivó que se descontinuara el uso de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra a partir del cuarto subcultivo. Una posible explicación a esta disminución del número de yemas puede deberse a que los 3 medios mencionados se caracterizaron por presentar bajos niveles de B y de Cu, en comparación con los medios MS, AMSF y AMSF+Intra.

Aunque menos estudiados que los macronutrientes, el papel de los micronutrientes es fundamental para el buen desarrollo de plantas in vitro (Ramage y Williams 2002, Kothari-Chajer et al. 2008), y en el caso del B se ha demostrado su importancia para la actividad meristemática (George y de Klerk 2008). De igual forma, los niveles de Cu son importantes en la formación de tallos (Ramage y Williams 2002). Por lo tanto, es posible que niveles de Cu menores,

en los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra afectaran el desarrollo y formación de yemas.

Longitud del brote principal

La respuesta observada al evaluar la longitud del brote principal fue similar a la obtenida con el número de yemas (Figura 1). Los medios de cultivo MS y AMSF presentaron los valores más altos en los 4 primeros subcultivos, con valores entre 7 y 9 cm (Figura 2). En el quinto subcultivo los valores máximos ocurrieron en el AMSF+Intra, y MS, con aproximadamente 6 cm. No obstante, considerando los promedios y la desviación estándar, a excepción del 4^{to} subcultivo, no existió diferencia entre estos 2 medios.

Al igual que en la variable anterior, los medios de cultivo MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra presentaron los valores más bajos. Estos fueron decrecientes del primer al tercer subcultivo, especialmente en el MF+Foli+Agro+Intra, y en el MF+Micro+Intra. Las plantas que se desarrollaron en estos medios presentaron de 1-3 nudos en el eje principal, pero no hubo elongación del entrenudo. La respuesta observada sugiere, como en la sección anterior, que la presencia de bajos niveles de

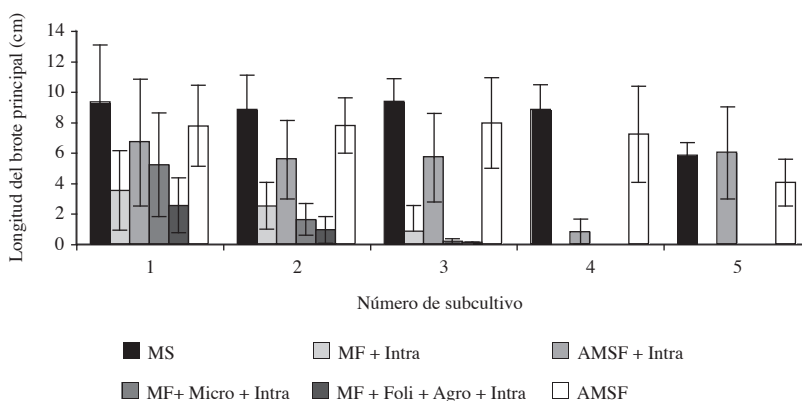


Fig. 2. Longitud del brote principal en plantas de papa, al final de cada subcultivo, según el tipo de medio cultivo (en los subcultivos 4 y 5 no se continuó con la evaluación de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra y MF+Foli+Agro+Intra).

algunos microelementos afectan el crecimiento del tallo (Ramage y Williams 2002, Kothari-Chajer et al. 2008).

Raíces por planta

Los medios MS y AMSF presentaron, en todos los subcultivos, los mayores valores promedio en cuanto al número de raíces por planta, sin diferencias significativas entre ambos (Figura 3). Nuevamente, para esta variable, los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra presentaron los valores más bajos. El medio MF+Intra presentó, en promedio, aproximadamente 2 raíces por planta en el primer subcultivo, en los siguientes decreció a 1 por planta. Debe recordarse que en cada subcultivo se seccionaron microestacas y por lo tanto se eliminaron las raíces presentes. Una disminución mayor se observó con los medios MF+Foli+Agro+Intra y el MF+Micro+Intra, los cuales pasaron de aproximadamente 1,5 raíces por planta a menos de 0,5 en el mismo intervalo de tiempo. Al igual que para la parte aérea, se

ha observado que bajos niveles o una deficiencia de B restringe el desarrollo radical (George y de Klerk 2008).

Plantas normales

Los medios de cultivo MS, AMSF y AMSF+Intra, presentaron la mayor cantidad de plantas sin síntomas de deficiencias nutricionales, clorosis, albinismo o necrosis (Figura 4). Para el MS y el AMSF se obtuvo 100% de plantas normales, desde el primero hasta el cuarto subcultivo, inclusive. En el quinto subcultivo este número decreció en un 10 y 25%, respectivamente. El medio AMSF+Intra, con excepción del cuarto subcultivo, también presentó valores altos, superiores a 80% de plantas normales. Gribble et al. (2002), observaron que plántulas creciendo continuamente en un mismo medio, por varios subcultivos, pueden llegar a desarrollar problemas nutricionales. Ello sugiere la necesidad de transferir periódicamente las plantas a un medio diferente, con el fin de reducir efectos desfavorables al crecimiento.

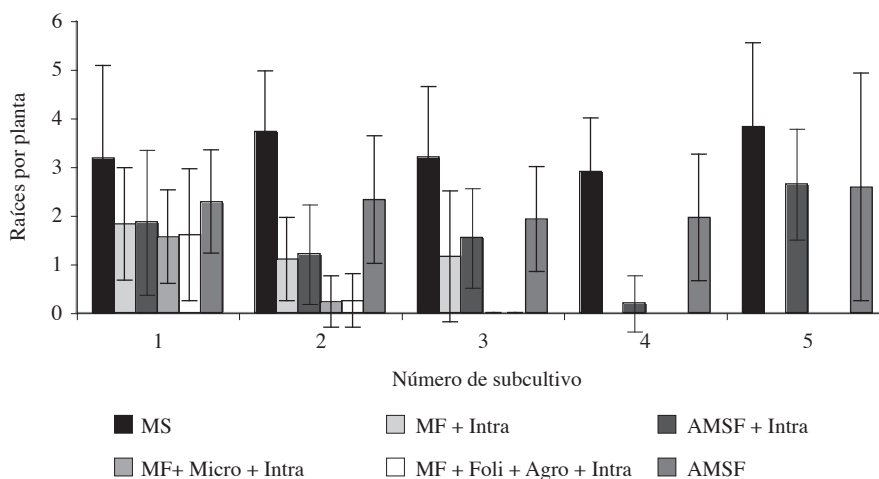


Fig. 3. Número de raíces, presentes en plantas de papa, al final de cada subcultivo, según el tipo de medio de cultivo (en los subcultivos 4 y 5 no se continuó con la evaluación de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra).

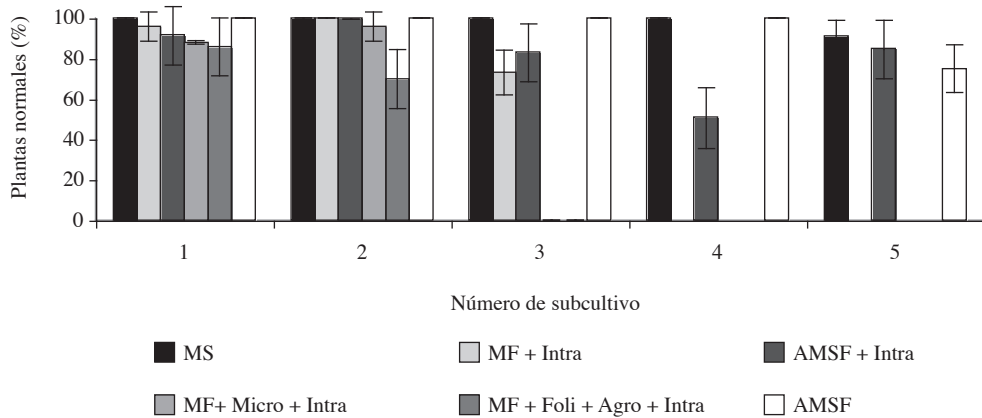


Fig. 4. Plantas de papa libres de síntomas de clorosis, necrosis o albinismo, al final de cada subcultivo, según el medio de cultivo empleado (en los subcultivos 4 y 5 no se continuó con la evaluación de los medios MF+Intra, MF+Micro+Intra, y MF+Foli+Agro+Intra).

La totalidad de las plantas de papa, cultivadas en los medios MF+Micro+ ntra y MF+Foli+Agro+Intra, presentaron clorosis en el tercer subcultivo, menor altura y raquitismo. Por su parte, en el medio de cultivo MF+Intra, el número de plantas normales para el mismo período, fue >70%. No obstante, estas plantas también mostraron raquitismo y escaso crecimiento. Debido a ello, los materiales creciendo en estos 3 medios fueron descartados y no se continuó con la evaluación de los mismos.

Se ha visto, en el caso de híbridos de *Eucalyptus*, que el desarrollo de clorosis en plantas in vitro puede ser el resultado de desbalances minerales en el medio, en particular de altos niveles de K y de P, los cuales pueden causar una deficiencia fisiológica de Fe (Gribble et al. 2002).

Es importante resaltar, que aunque se trató de ajustar, de la mejor manera el tipo y concentración de los productos empleados en la preparación de los medios de cultivo, con la composición del medio MS, siempre existen impurezas o trazas de otros elementos (por ejemplo cloruros y sodio) que no se consideran en el cálculo, o por efecto de la formulación del producto comercial

son imposibles de obviar. Estas impurezas o trazas de elementos pueden influir en la nutrición, metabolismo ó fisiología del explantes (Taiz y Zeiger 2006, Roussos et al. 2007).

Peso fresco

Las únicas plantas que llegaron hasta el quinto subcultivo, momento en que se determinó el peso fresco, fueron, como se indicó anteriormente, las cultivadas en los medios AMSF, MS, y AMSF+Intra, sin que se presentaran diferencias significativas entre ellas ($p \leq 0,05$). Djurdjina et al. (2001), encontraron, en el caso del híbrido de cereza Inmil GM9, que valores de peso fresco mayores, correlacionaron con una mayor absorción de macroelementos en los tallos y por ende en su crecimiento y multiplicación. Esto probablemente ocurrió, en el caso de los cultivos de papa, para los 3 medios que mejor respondieron. Aunque no significativo, es interesante notar que a pesar de que las plantas cultivadas en el AMSF+Intra presentaron en el quinto subcultivo los valores más altos para las variables longitud y número de yemas, así como el segundo valor en el número de raíces, para la variable de peso fresco

presentaron el menor (Figura 5). Esto podría ser atribuido a los niveles de Fe que contiene este medio, ya que en *Citrus sinensis* el peso fresco de los cultivos disminuyó conforme se incrementaron los niveles de este elemento (Niedz y Evens 2007).

Costos

Considerando el valor de mercado de los productos comerciales y reactivos (macro y micronutrientes), empleados en la elaboración de las soluciones nutritivas, se encontró que la formulación más barata fue el medio AMSF, con un valor de US\$ 0,012 l⁻¹ de medio, posteriormente siguió el medio AMSF+Intra, con de US\$0,025 l⁻¹ y, finalmente, el MS, con US\$3,411 l⁻¹. Para este último dato se utilizó el valor de catálogo del año 2007 de los productos SIGMA-ALDRICH M5524-1L y E6760-100G.

Realizando un balance entre las diferentes variables evaluadas, se puede indicar que los mejores resultados se obtuvieron con el medio MS, y en aquellos medios de cultivo que se equipararon molarmente con el mismo (AMSF

y AMSF+Intra). En los demás medios se observó, durante el transcurso de los subcultivos, una disminución gradual del crecimiento de las plantas aunado a un incremento en la aparición de clorosis.

Los resultados obtenidos permiten considerar el uso de fertilizantes foliares, como reemplazo a las sales minerales de alta pureza, empleadas normalmente en la elaboración del medio de cultivo MS, al menos por períodos de tiempo limitados o en un esquema de alternancia con el MS. Como no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones AMSF+Intra y AMSF, con respecto al medio MS, puede considerarse que el medio AMSF sería el más adecuado como alternativo del MS, por su menor costo económico.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la asistencia técnica de la M.Sc. Elena Tavares durante parte del desarrollo de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- BERTSCH F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica. 157 p.
- DJURDJINA R., SARIĆ M., CERVIĆ R., ČULAFIĆ L. 2001. Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM9 shoots during in vitro culture. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76:295-299.
- GANAPATHI T.R., MOHAN J.S.S., SUPRASANNA P., BAPAT V.A., RAO P.S. 1995. A low-cost strategy for in vitro propagation of banana. *Current Science* 68:646-650.
- GEORGE E.F., DE KLERK G.-J. 2008. The components of plant tissue culture media. I – Macro- and micro-nutrients, pp. 65-113. In: E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. The background. 3 ed. Springer, Dordrecht, Holanda.
- GRIBBLE K., CONROY J.P., HOLFORD P., MILHAM P.J. 2002. In vitro uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to

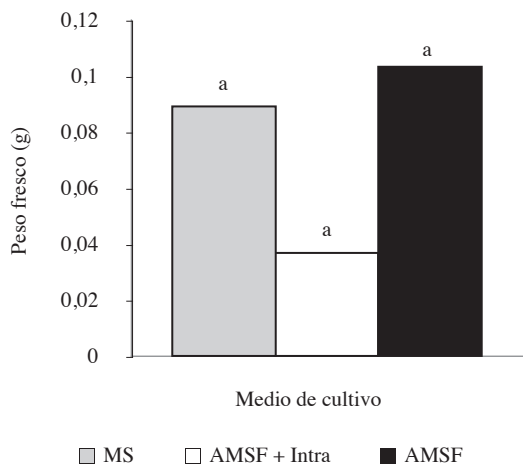


Fig. 5. Peso fresco de las plantas de papa cultivadas en los medios de cultivo MS, AMSF+Intra y AMSF, al final del quinto subcultivo. Columnas con una misma letra no difieren significativamente entre ellas según prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

- media mineral formulation. *Australian Journal of Botany* 50:713-723.
- GUTIÉRREZ C. 1996. Propagación clonal in vitro de *Cattleya* por medio meristemas. In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Vol 1. San José. Costa Rica. p 302. EUNA.
- HUGHES K. 1986. Ornamental species, pp. 5-41. In: B. Conger (ed). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC, Boca Raton, Florida.
- HURTADO D, MERINO M. 1997. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México. 232 p.
- IAEA (Agencia Internacional de la Energía Atómica). 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002. 102 p.
- JAIN N., BABBAR S.B. 2002. Gum katira—a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:223-229.
- KOTHARI-CHAJER A., SHARMA M., KACHHWAHA S., KOTHARI S.L. 2008. Micronutrient optimization results into highly improved in vitro plant regeneration in kodo (*Paspalum scrobiculatum* L.) and finger (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) millets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94:105-112.
- LEITE G.B., FINARDI N.L., FORTES G.R. DE L. 2002. Use of vermiculite as a substrate and effect of light on in vitro rooting of pears, cv. Bartlett and clone OH x F97. *Ciência e Agrotecnologia* (Lavras) 26:977-982.
- LUCYSZYN N., QUOIRIN M., KOEHLER H.S., REICHER F., SIERAKOWSKI M.-R. 2006. Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae* 107:358-364.
- LUCYSZYN N., QUOIRIN M., HOMMA M.M., SIERAKOWSKI M.-R. 2007. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. *Biologia Plantarum* 51:173-176.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NIEDZ R.P., EVENS T.J. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 43:370-381.
- PIERIK R. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht. Holanda. 344 p.
- POLLOCK M.A., OPPENHEIMER D.G. 1999. Inexpensive alternative to MS medium for selection of *Arabidopsis* plants in culture. *Bio/Techniques* 26:254-257.
- RAMAGE C. M., WILLIAMS R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 38:116-124.
- ROUSSOS P.A., GASPARATOS D., TSANTILI E., PONTIKIS C.A. 2007. Mineral nutrition of jojoba explants in vitro under sodium chloride salinity. *Scientia Horticulturae* 114:59-66.
- TAIZ L., ZEIGER E. 2006. *Plant Physiology*. 4 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., EUA. 764 p.
- THORPE T., STASOLLA C., YEUNG E.C., DE KLERK G.-J., ROBERTS A., GEORGE E.F. 2008. The components of plant tissue culture media. II—Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems, pp. 115-173. In: E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. The background. 3 ed. Springer, Dordrecht, Holanda.
- TYAGI R.K., AGRAWAL A., MAHALAKSHMI C., HUSSAIN Z., TYAGI H. 2007. Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* 43:51-58.
- VASIL I.K. 2008. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schlieden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27:1423-1440.
- VIEIRA R.L., LEITE G.B., WAMSER A.F. 2007. Efeito de substratos porosos no enraizamento in vitro do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). *Revista Brasileira de Fruticultura* (Jaboticabal) 29:128-132.
- ZIMMERMAN R., BHARDWAJ S., FORDHAM I. 1995. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43:207-213.