

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO Y CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE DIEZ
GENOTIPOS COMERCIALES DE PAPA (*Solanum* sp.) PROCEDENTES DE LAS
PROVINCIAS: AROMA, INGAVI Y LOS ANDES**

DORA NELLY GUTIÉRREZ QUISPE

La Paz - Bolivia
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO Y CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE DIEZ
GENOTIPOS COMERCIALES DE PAPA (*Solanum* sp.) PROCEDENTES DE LAS
PROVINCIAS: AROMA, INGAVI Y LOS ANDES**

*Tesis de grado presentado como
requisito parcial para obtener el título de:*
INGENIERO AGRÓNOMO

DORA NELLY GUTIÉRREZ QUISPE

TUTOR

Ing. Ph. D. Victor Hugo Mendoza Condori _____

ASESOR

Ing. M. Sc. Jorge Pascuali Cabrera _____

TRIBUNAL REVISOR

Ing. Ph. D. Félix Marza Mamani _____

Ing. Victor Paye Huaranca _____

Ing. Eduardo Oviedo Farfán _____

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

Ing. Ph. D. David Cruz Choque _____

DEDICATORIA

*A los seres que mas amo y eh amado:
Mis padres Luis Gutiérrez Conde (†)
y Dora Z. de Gutiérrez, quienes me
Alentaron durante toda mi vida.
A mis hermanos y sobrinitos*

AGRADECIMIENTOS

A Dios ante todo, por haberme dado el privilegio de la vida.

A toda mi familia, por el apoyo moral e incondicional durante el tiempo que curse mi carrera.

A la consultora Marketing SRL, por la confianza que me dieron para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Agronomía (UMSA), al señor Decano Ing. M Sc. Jorge Pascuali Cabrera y Vicedecano Ing. Félix Rojas Ponce; a todo el plantel docente por la enseñanza y capacitación durante el tiempo permanecido en la carrera; al personal administrativo por la ayuda que me dieron para presentar el presente trabajo de investigación.

A la paciencia de mi tutor Ing. Ph. D. Victor Hugo Mendoza Condori, mi asesor Ing. M Sc. Jorge Pascuali Cabrera quienes con sus consejos y sugerencias contribuyeron para la presentación de mi trabajo.

Al tribunal revisor Ing. Ph. D. Félix Marza Mamani, Ing. Victor Paye Huaranca, Ing. M Sc. Eduardo Oviedo Farfán, a quienes les quedo encarecidamente agradecida por la revisión, correcciones y sugerencias que ayudaron a mejorar el presente trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial a los Ing. Ph. D. Victor Hugo Mendoza y Félix Marza, por su ayuda y colaboración desinteresada, su paciencia; y ante todo su amistad.

Al Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear IBTEN (Laboratorio de Biotecnología vegetal CIN- Viacha), por facilitarme los genotipos de papa.

A todos y cada uno de mis amigos y compañeros, por su amistad desinteresada además de su apoyo moral.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Origen e importancia de la papa.....	4
2.2. Características morfológicas.....	6
2.3. Cultivo de tejidos.....	8
2.4. Medios de cultivo.....	8
2.5. Componentes del medio.....	9
2.6. Propagación <i>in vitro</i>	14
2.7. Biodiversidad y conservación.....	16
2.8. Conservación de germoplasma	16
2.9. Viabilidad de vitroplantas conservadas.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Localización del experimento.....	22
3.2. Materiales y métodos.....	22
3.2.1. Material vegetal.....	22
3.3. Metodología.....	22
3.3.1. Desinfección e inducción de brotes de los genotipos en estudio.....	22
3.3.2. Establecimiento, multiplicación y conservación <i>in vitro</i>	24
3.3.2.1. Preparación de medios de cultivo.....	24
3.3.2.2. Fase de establecimiento <i>in vitro</i> del material vegetal.....	25
3.3.2.3. Fase de multiplicación <i>in vitro</i>	27
3.3.2.4. Fase de conservación <i>in vitro</i> de vitroplantas de papa.....	28

3.3.3.	Prueba de viabilidad del material en conservación.....	29
3.3.4.	Observación y toma de datos.....	29
3.3.4.1.	Fase de establecimiento <i>in vitro</i>	30
3.3.4.2.	Fase de multiplicación de las vitroplantas.....	31
3.3.4.3.	Fase de conservación <i>in vitro</i>	32
3.3.4.4.	Prueba de viabilidad (Refrescamiento o regeneración de vitroplantas).....	32
3.3.5.	Diseño experimental.....	32
3.3.5.1.	Diseño experimental para las etapas de establecimiento, multiplicación y pruebas de viabilidad.....	32
3.3.5.2.	Diseño experimental para la etapa de conservación.....	33
3.3.6.	Análisis estadístico.....	34
3.3.7.	Transformación de datos	34
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
4.1.	Fase de establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i>	35
4.1.1.	Porcentaje de supervivencia.....	35
4.2.	Fase de multiplicación <i>in vitro</i>	35
4.2.1.	Primera multiplicación <i>in vitro</i>	38
4.2.2.	Segunda multiplicación <i>in vitro</i>	42
4.2.3.	Tercera multiplicación <i>in vitro</i>	45
4.3.	Fase de conservación <i>in vitro</i>	48
4.4.	Viabilidad de plántulas conservadas <i>in vitro</i>	62
V.	CONCLUSIONES.....	66
VI.	RECOMENDACIONES.....	68
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	69
VIII.	ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Medios de conservación <i>in vitro</i> preparado con tres diferentes concentraciones de sacarosa (0.5%; 1.5% y 3%).....	28
Cuadro 2. Escala de valores para la evaluación de número de raíces (normales y aéreas), presencia de microtubérculos, ápices amarillos, y bases amarillas (Fase de Multiplicación y conservación <i>in vitro</i>).....	31
Cuadro 3. Factores de estudio empleados en el diseño experimental.....	33
Cuadro 4. Distribución de los tratamientos.....	33
Cuadro 5. Análisis de varianza para las variables: Altura, número de nudos y número de raíces de vitroplantas (Establecimiento <i>in vitro</i>).....	36
Cuadro 6. Análisis de varianza para las variables: Altura, número de nudos y número de raíces de vitroplantas (primera multiplicación).....	39
Cuadro 7. Análisis de varianza en la segunda multiplicación para las variables: Altura, número de nudos y número de raíces de vitroplantas.....	42
Cuadro 8. Análisis de varianza (tercera multiplicación) para las variables: altura, número de nudos y número de raíces de las vitroplantas.....	45
Cuadro 9. Análisis de varianza para las variables de respuesta en la fase de conservación, en función a los genotipos y medios de conservación.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Fig. 1	Genotipos de papa envueltos en papel sábana para el proceso de inducción a la brotación.....	23
Fig. 2	Genotipos seleccionados de papa antes y después de la inducción a la brotación.....	23
Fig. 3	a) Soluciones stock MS; b) Adición de sacarosa al medio MS; c) Ajuste de pH.....	24
Fig. 4	a) Dilución de la carragenina en el microondas; b) Distribución del medio a vasos de vidrio; c) Sellado; d) Embolsado; e) Autoclavado.....	25
Fig. 5	Procedimiento experimental, desde la obtención del material vegetal hasta la regeneración de las vitroplantas después de su conservación.....	26
Fig. 6	Etapas de la desinfección para el establecimiento <i>in vitro</i> de los genotipos de papa: a) Cámara de flujo laminar; b) Desinfección del material vegetal; c) Cortes en las placas petri; d) Siembra y marcaje.....	27
Fig. 7	Etapas de la multiplicación <i>in vitro</i> de los genotipos de papa: a) A tres semanas de crecimiento; b) Extracción; c) Preparación del material vegetal; d) Incubación de las vitroplantas en la sala de crecimiento.....	27
Fig. 8	Vitroplantas en los medios de conservación, después de un mes de evaluación.....	28
Fig. 9	Medición de la altura de vitroplantas en vasos de vidrio.....	30
Fig. 10	Porcentaje de supervivencia por genotipo en el establecimiento <i>in vitro</i>	35
Fig. 11	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Establecimiento <i>in vitro</i>).....	37
Fig. 12a	Desarrollo de vitroplantas de papa en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> a los 21 días.....	38
Fig. 12b	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Primera multiplicación).....	40
Fig. 13	Pasos de la multiplicación de vitroplantas: a) Vitroplanta de papa a los 21 días; b) Cortes para su multiplicación; c) Explantes sembrados; d) Vitroplantas desarrolladas después de 21 días.....	41

Fig. 14	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Segunda multiplicación).....	43
Fig. 15	Vitroplantas en la segunda multiplicación de los genotipos con mejores resultados: a) Phitikilla, b) Ajahuiri negro; y menor resultado c) Sacampaya blanco.....	44
Fig. 16	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplantas, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Tercera multiplicación).....	46
Fig. 17	Tercera multiplicación: a) Genotipo Phiñu rojo al sembrarlo a un nuevo medio; b) Genotipo Phiñu rojo después de los 21 días.....	47
Fig. 18	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables de respuesta medidas en función a los genotipos, a los ocho meses de conservación <i>in vitro</i>	50
Fig. 19	Comparación de medias Tukey (5%) para las variables de respuesta medidas en función a los medios de conservación <i>in vitro</i> (datos tomados a los ocho meses).....	52
Fig. 20	Genotipo Chirimoya en los tres diferentes medios de conservación; a) después de tres meses de conservación; b) después de ocho meses de conservación.....	53
Fig. 21	Genotipos con mayor y menor número de nudos promedio después de ocho meses de conservación: a) Ajahuiri negro; b) Phitikilla; c) Pala roja.	54
Fig. 22	Genotipos que obtuvieron el mayor y menor número de raíces promedio después de los ocho meses de conservación: a) Imilla roja; b) Pala roja.....	56
Fig. 23	Genotipo Imilla roja, que obtuvo mayor número de raíces aéreas en los diferentes medios de conservación.....	57
Fig. 24	Presencia de microtubérculos en los medios de conservación: a) Chirimoya; b) Phiñu blanco.....	58
Fig. 25	Vitroplantas de los genotipos que obtuvieron mayor y menor número de ápices amarillos después de los ocho meses de conservación.....	60
Fig. 26	Vitroplantas de los genotipos: a) Phiñu negro (con mayor número de bases amarillas) y b) Pala roja (con ausencia de bases amarillas).....	61
Fig. 27	Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los	

	genotipos evaluados resultado del medio 1(Sacarosa 0.5%).....	63
Fig. 28	Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los genotipos evaluados resultado del medio 2 (Sacarosa 1.5%).....	63
Fig. 29	Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los genotipos evaluados resultado del medio 3 (Sacarosa 3%).....	64
Fig. 30	Altura de vitroplantas en medios frescos, después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación con respecto a los medios de conservación.....	65

RESUMEN

La papa es considerada uno de los cultivos de mayor importancia en el ámbito mundial y principalmente en la región andina; es así que Bolivia constituye parte de su centro de origen y por lo tanto un área con alta variabilidad genética, de esta diversidad, existen cultivares que pueden tener enorme aceptación por parte de los productores para el mercado nacional e internacional, pero por falta de un manejo adecuado, esta diversidad se va perdiendo con el transcurrir de los años.

Diferentes organizaciones e instituciones están trabajando en la conservación de germoplasma y buscando algunas posibilidades para sacarle un beneficio a las características que tiene el material genético, tal es el caso de la consultora "Marketing SRL." que seleccionó genotipos de papa procedentes del Altiplano Norte, para su aprovechamiento comercial, en este caso los genotipos: Pala roja, Phiñu blanco, Phiñu rojo, Phiñu negro, Chirimoya, Phitikilla, Yaco, Ajahuiri negro, Imilla roja y Sacampaya blanco que en un mediano plazo podrían ser una alternativa para la producción de este cultivo debido a sus posibilidades de industrialización.

Es por esto que el presente estudio, pretende establecer *in vitro* genotipos de papa de importancia comercial para los productores de las provincias Aroma, Ingavi y Los Andes del Dpto. de La Paz, conservando así el material vegetal en un banco de germoplasma y de esta manera generar alternativas de producción.

El material vegetal fue proporcionado por el Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), a razón de un tubérculo de la colección existente en esta institución, los mismos que para su introducción fueron asépticamente llevados a un ambiente oscuro cubiertos con papel sábana para su brotación, proceso que duró 49 días. A continuación, los brotes obtenidos fueron sembrados en el medio basal Murashige and Skoog "MS" (1962), sin la adición de otros componentes mas que sacarosa al 3%, carragenina al 1%, y un pH de 5.7 (este medio fue empleado también en las tres etapas de multiplicación y para las pruebas de viabilidad), y fueron mantenidos en la sala de crecimiento durante 21 días a 16 hr luz y 8 de oscuridad (Durante el tiempo que duró el trabajo de investigación)

Se realizaron tres multiplicaciones a partir de las vitroplantas obtenidas (se preparó un nuevo medio MS con los mismos componentes empleados en introducción), utilizando nudos medios; para las dos primeras multiplicaciones se emplearon esquejes de 0.5cm aproximadamente y la última de 0.3cm o menores, a manera de rejuvenecer el material para su posterior conservación.

Finalmente se paso las vitroplantas a los medios de conservación *in vitro*, utilizando nudos medios, los medios propuestos fueron los mismos empleados en las etapas de introducción y multiplicación, adicionando además un retardador de crecimiento (Manitol 4%) en todos los casos; también realizando una variación en la adición de sacarosa, y reemplazando a la carragenina con agar; obteniendo así tres medios: M₁ (MS+ manitol 4% + sacarosa 0.5%+ agar 0.8%), M₂ (MS + manitol 4% + sacarosa 1.5% + agar 0.8%) y M₃ (MS + manitol 4%+sacarosa 3%+ agar 0.8%), los mismos que fueron conservados durante ocho meses, realizando tres pruebas de viabilidad a los cuatro, seis y ocho meses.

Se concluye que las vitroplantas respondieron satisfactoriamente a la introducción *in vitro* sin evidencia de contaminación de las mismas, lo mismo que en las tres multiplicaciones, en las que el genotipo mejor adaptado fue Phitikilla, en comparación con los demás genotipos, pero sin desmerecer su desarrollo en un corto tiempo para realizar propagaciones. El medio propuesto evidenció que no es necesaria la adición de hormonas para obtener un desarrollo competente en genotipos estudiados.

El medio que reprimió el crecimiento con mejores resultados de viabilidad, fue el medio 1 (sacarosa 0.5%) que hasta los ocho meses de conservación, las vitroplantas de los diez genotipos permanecieron viables; el medio 2 (sacarosa 1.5%) obtuvo resultado similar con una variante en el genotipo Phiñu rojo que a los ocho meses pierde viabilidad; y finalmente, el medio menos recomendado es el medio 3 (sacarosa 3%), pues aunque a los cuatro meses la viabilidad permanece, después de los seis meses el genotipos chirimoya no responde al refrescamiento, y peor aún a los ocho meses se suman los genotipos Yaco, Phitikilla, Phiñu negro y Phiñu rojo; concluyendo que a mayor porcentaje de sacarosa, el desarrollo morfológico es mayor en las vitroplantas y por tanto el tiempo de conservación es menor.

I. INTRODUCCIÓN

Bolivia constituye parte del centro de origen de la papa y por lo tanto un área con alta variabilidad genética, aunque la misma se va erosionando gradualmente con el transcurrir de los años. A su vez la papa es considerada uno de los cultivos de mayor importancia en el ámbito mundial y principalmente en la región andina.

La papa, es superior a todos los otros cultivos en la producción de proteína, por unidad de tiempo y superficie, en la producción de energía. Su proteína es valiosa debido a la gran concentración de aminoácidos esenciales, lo cual no es común en las proteínas de otras plantas. En ello se asemeja a la proteína de la leche, y es sobresaliente la forma en que se complementa con otras proteínas como la de soja. En cuanto al consumo humano, la papa ocupa el quinto lugar, y el cuarto lugar en cuanto al valor de la producción mundial, después del trigo, arroz y maíz (Horton, 1987); mencionado por Estrada (2000).

De esta diversidad existen cultivares que pueden tener enorme aceptación por parte de los productores para el mercado nacional e internacional. Diferentes organizaciones e instituciones están trabajando en la conservación de germoplasma y buscando algunas posibilidades para sacarle un beneficio a las características que tiene el material genético. En el altiplano norte existen genotipos de papa que han sido seleccionados para su aprovechamiento comercial tal es el caso de los genotipos: Pala roja, Chirimoya, Yaco entre otras que en un mediano plazo podrían ser una alternativa para la producción de este cultivo debido a sus posibilidades de industrialización.

La conservación de germoplasma mediante técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* no solo es una opción para el resguardo de estos genotipos de papa, también es importante debido a que durante este proceso se realiza la limpieza de patógenos sistémicos y no sistémicos que en muchos casos inciden directamente en los rendimientos del tubérculo. Las facilidades que se logran en estas tareas es la obtención de material vegetal de alta calidad para la producción de semilla pre-básica.

1.1. Antecedentes

En el país son pocas las instituciones que trabajan con técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* en la conservación de germoplasma de papa y otros, entre ellas la Fundación PROINPA, SEPA y el IBTEN. Las investigaciones realizadas referentes a la conservación de germoplasma nativo de papa, además de la obtención de semilla pre-básica son de gran ayuda para desarrollar este tema, puesto que involucran variedades nativas de gran potencial para su industrialización.

Los productores de semilla trabajan con la ayuda de diferentes instituciones como el SID (Estrategias para el desarrollo internacional), MIF (FOMIN), entre otros formando asociaciones de productores como: APROSEPT (Asociación de Productores de Semilla de papa para tambo), ASEMM (Asociación semilleros multiactiva Murumamani), PROSAN (Productores Semilleros del Altiplano Norte), en la producción de semilla de categorías altas (registrada, fiscalizada, certificada). Cada vez el mercado nacional como internacional busca nuevas alternativas en productos novedosos para su consumo, que también sean competentes con el mercado.

1.2. Justificación

El presente estudio, pretende establecer *in vitro* genotipos de papa de importancia comercial para los productores de las provincias Aroma, Ingavi y Los Andes del Dpto. de La Paz, conservando así el material vegetal en un banco de germoplasma y de esta manera generar alternativas de producción; tal motivación es impulsada por la consultora Marketing SRL, responsable del presente estudio.

A partir del material conservado se obtendrá semilla pre-básica de papa en un tiempo más corto. Atendiendo así las demandas de agricultores semilleros encargados de cultivar esta especie y asegurando de esta manera la cadena de producción.

Existen variedades nativas que se van perdiendo debido a la falta de un mercado adecuado y que podrían tener diversos usos para ser aprovechados. Los genotipos utilizados están priorizados para diferentes usos, como en el caso del genotipo Pala

roja, que actualmente se industrializa para la elaboración de papas fritas y también de tunta; ó como el genotipo Chirimoya que por su forma es deleite de platos extravagantes; también Ajahuri negro y Phiñu rojo que se usan como k'hati o también para la elaboración de chuño, según PROINPA (2005), y algunos para su industrialización, por ello es importante llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Es oportuno mantener un acceso ágil a los bancos de germoplasma para que el material vegetativo pueda ser producido por o con la comunidad agrícola apoyando la selección dirigida a problemas específicos del lugar, entre otros: respuesta a condiciones de baja fertilidad, resistencia a enfermedades locales, resistencia a condiciones ambientales estresantes como calor, frío o falta de humedad, tolerancia a pestes del lugar, selección de líneas con elevado contenido de nutrientes tales como proteínas y evaluación por facilidad de cocción. Estos esfuerzos de largo plazo deben contar con investigadores comprometidos e integrados en un programa con objetivos comunes, Izquierdo (1995).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Conservar el material genético de diez genotipos de papa (*Solanum* sp.) de importancia comercial para el aprovechamiento de productores de semilla y el consumidor, mediante la técnica de conservación *in vitro*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la fase de establecimiento *in vitro* del material vegetal en base a un medio estándar.
- Cuantificar *in vitro* el comportamiento morfológico de los genotipos de papa en base a un medio estándar.
- Evaluar la respuesta de los genotipos de papa en tres medios estandarizados de conservación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origen e importancia de la papa

2.1.1. Origen de la papa

En el altiplano entre Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca, se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas de papa, la cual fue domesticada hace unos 10.000 años por la mujer cuando el hombre se dedicaba a la caza y a la pesca (Estrada, 2000).

La papa o patata, de nombre científico *Solanum tuberosum*, pertenece a la familia *solanaceae*, tiene una antigüedad de ocho mil años y fue domesticada por pobladores de Perú que vivían en las proximidades del lago Titicaca, el más alto del mundo, en la frontera con Bolivia, Antón (1997).

Hawques (1997), establece el origen de la papa en las orillas del lago Titicaca en su estudio “La evolución de las papas cultivadas en Bolivia” Salaman y Hawques, creen que en las regiones montañosas entre 3800 – 4500 msnm situadas sobre el lago Titicaca y el Cuzco, tuvo como su centro de origen a la papa, por que allí alcanza su alto índice de variación específica y varietal.

Datos obtenidos con carbono 14 han demostrado que la papa fue domesticada hace por lo menos 10000 años en el altiplano, al sureste de Perú y noroeste de Bolivia (Engel, 1964). No se conoce con exactitud la especie silvestre que origino las especies cultivadas diploides. Es posible que esa especie desapareciera al cruzarse con otras especies semicultivadas o silvestres. Varias especies silvestres se han citado como posibles ancestros de las cultivadas, entre ellas: *Solanum leptophyes*, *S. canasense*, *S. sparsipilum*, (Hawques, 1978) *S. brevicaule* y *S. vernei* (Grun, 1990), Estrada (2000).

2.1.2. Importancia de los tubérculos

Según Cárdenas (1969), la papa fue el primer tubérculo en ser domesticado en la zona andina, luego otros tubérculos como la oca y papalisa. Desde entonces, la producción de tubérculos tiene una importancia económica y alimentaria para los campesinos. La composición nutricional de los tubérculos hace que estos se constituyan en potenciales fuentes de alimentación.

La papa, también se le consume en forma de chuño que es diferente al del sur y centro, posee diversos nutrientes y carbohidratos, por lo que es llamada la "manzana de tierra" al ser un tubérculo que crece en las raíces de la planta, bajo la tierra. En algunos lugares se la come sin pelarla aprovechándose mejor su valor nutricional. En el mundo hay aproximadamente 5000 variedades de papa de las cuales 3000 se encuentran en Perú; Antón (1997).

La papa según Roca y Mroginski (1991), es el primer tubérculo que ha sido objeto de amplios estudios en las zonas de cultivo, llegando a ser un producto: seleccionado, mejorado y acondicionado a muchos ambientes, obteniéndose material de siembra de alta calidad para ser distribuido.

PROINPA (2005), afirma que la papa es uno de los alimentos mas importantes en Bolivia por ser la base de la dieta alimetaria de la población boliviana, en promedio en el área urbana cada habitante consume 80Kg de papas al año y en el área rural 140Kg de papa al año por habitante, pues provee mas del 60% de calorías diarias. Según datos de la encuesta agropecuaria 1990-1998 realizada en Bolivia, la superficie de papa cultivada es de 131.803 hectáreas con un rendimiento promedio de 4.734Kg/ha (INE, 1998).

En los países industrializados la superficie cultivada de la papa se ha reducido, debido a la demanda intensiva de labor para la siembra, la cosecha y el transporte, y al cambio en los hábitos de consumo; actualmente hay cierta resistencia de los usuarios

al consumir alimentos ricos en carbohidratos. En cambio en los países en desarrollo, donde la provisión de alimentos es mas reducida, constituye un alimento ideal y mas aún en las regiones sobre los 2000 m de altura, en las cuales hay pocas opciones de cultivos y donde el hombre y los animales requieren mas caloría, Estrada (2000).

La papa de consumo, tiene gran importancia socioeconómica al ser un alimento que forma parte de la dieta alimentaria mundial y en especial del altiplano Boliviano que es relativamente constante en cada gestión y actualmente las variedades nativas, satisfacen en alto porcentaje de la demanda anual, pese a esto, existe un mercado insatisfecho del 26%, esperando que se incremente notablemente en los próximos años, si no se asumen políticas productivas adecuadas, KURMI SRL (1996).

2.2. Características morfológicas

La papa, es una planta herbácea; de habito: erecto, semirrecto y postrado; su reproducción es sexual (semilla verdadera) y agámica o asexual (tubérculos). En el primer caso, es una planta anual, y como agámica, es considerada perenne potencial debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos, Pacheco (1997).

Montalvo (1984), menciona que la papa es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea y perenne por sus tubérculos (tallos subterráneos) que se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo principal. Posee un tallo principal y a veces varios tallos, según el número de yemas que hayan brotado del tubérculo. Los tallos son de sección angular, y en las axilas de las hojas con los tallos de forman ramificaciones secundarias.

Las hojas son alternas igual que los estolones. Las primeras hojas tienen aspecto de simples, vienen después de las hojas compuestas, imparipinadas, con tres pares de hojuelas laterales y una hojuela terminal. Entre las hojuelas laterales, hay hojuelas pequeñas de segundo orden. Las raíces se desarrollan principalmente en verticilos, en los nudos del tallo principal. Su crecimiento es primero vertical dentro de la capa de

suelo arable, luego horizontal de 25 a 50 cm., y a veces cuando el suelo lo permite, nuevamente vertical hasta 90 cm, la planta de papa posee un sistema radicular fibroso muy ramificado. Con inflorescencia cimosa; las flores son hermafroditas, tetracíclicas, pentámeras; el cáliz es gamosépalo lobulado; la corola rotacea pentalobulada de color blanco al púrpura, con 5 estambres, cada estambre posee dos estambres de color amarillo pálido, fuerte o anaranjado, que producen polen a través de un tubo terminal; gineceo con ovario bilocular. El fruto es una baya bilocular de 15 a 30 mm de diámetro, color verde, verde amarillento o verde azulado. Cada fruto contiene aproximadamente 200 semillas. El tubérculo de papa es un tallo subterráneo ensanchado. En la superficie posee yemas axilares en grupos de 3 a 5 y protegidas por hojas escamosas (ojos). Una yema presenta una rama lateral del tallo subterráneo. El tubérculo es un sistema morfológico ramificado; los ojos de los tubérculos tienen una disposición rotada alterna desde el extremo proximal del tubérculo (donde va inserto el estolón) hasta el extremo distal, donde los ojos son mas abundantes. La yema apical del extremo distal es la que primero se desarrolla y domina el crecimiento de todas las otras. A este fenómeno se le ha denominado “dominancia apical”, *op.cit.*

2.2.1. Variedades de papa

Huaman (1983), menciona que existen tres sistemas de clasificación de las variedades cultivadas de papa las cuales reconocen 3, 8 ó 18 especies según el grado de variación existente dentro de característica usada para distinguir una especie de la otra. De ellos el que reconoce 8 especies cultivadas es el de mayor aceptación y uso.

La papa puede ser clasificada por niveles de ploidía, que es el número de juegos (x) de cromosomas presentes en la célula vegetativa (somática). Las células vegetativas normalmente contienen como mínimo dos juegos de cromosomas, que constan de 12 cromosomas, es decir; $x=12$. Las células somáticas de las especies cultivadas de papa pueden variar entre el nivel diploide y pentaploide. La expresión $2n$ simboliza el

número total de juegos de cromosomas en las células vegetativas y en consecuencia el número total de cromosomas en cualquier nivel de ploidía, *op.cit.*

Cahuana (1993), afirma que la papa cultivada está constituida por ocho especies:

- Diploides (2n): *S. ajanhuiri*; *S. goniocalyx*; *S. phureja* y *S. stenotomun*.
- Triploides (3n): *S. chaucha* y *S. juzepczukii* (AMARGA).
- Tretraploides (4n): *S. tuberosum*; *ssp tuberosum* y *ssp andigena*.
- Pentaploides (5n): *S. curtilobum* (AMARGA).

2.3. Cultivo de tejidos

El término de cultivo de tejidos vegetales para Barba, Luna y Romero (2001), se utiliza comúnmente para describir el cultivo *in vitro* de cualquier parte viva de la planta colocada sobre un medio nutritivo artificial, bajo condiciones ambientales controladas.

Para Roca y Mroginski (1991), el cultivo de tejidos como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

2.4. Medios de cultivo

El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener. Por estas razones, existen diferentes formulaciones para los medios de cultivo; Roca, Roosevelt y Mafla (1992).

Los meristemas se cultivan generalmente sobre medio sólido, y algunas veces en medio líquido empleando puente de papel. Con pH de 5,4 a 6,0; sacarosa de 2 a 4%; vitaminas: B1, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico; reguladores con concentraciones de 0,1 a 0,5 mg l⁻¹ (son auxinas y citoquininas que promueven división celular); Los tubos con los meristemas se ponen bajo luz fluorescente de 1,000 a 3,000 lux, en con menor irradiancia en los primeros días post aislamiento con fotoperíodo de 14 a 16 horas y a temperatura de 23 a 25 °C, *op.cit.*

Para Cadmo y Villalobos (1990), el éxito del cultivo de tejidos de plantas esta muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados, y otros factores ambientales. Es conocido que para un crecimiento adecuado las plantas necesitan tomar del suelo cantidades importantes de macronutrientes como las sales de nitrógeno, potasio, calcio fósforo, magnesio y azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. El medio de cultivo contiene estos elementos además de carbohidratos (usualmente sacarosa), para reemplazar el carbono, que la planta normalmente fija de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.

Un medio de cultivo según Ramírez (1989), es un conjunto de todos los elementos orgánicos e inorgánicos capaces de suministrar a un cultivo todo lo que el necesita para desarrollarse en condiciones *in vitro*.

2.5. Componentes del medio

Según la FAO (1990), los medios de cultivo, utilizados para el manejo de meristemas y micropropagación de papa, contienen principalmente: sales de Murashige y Skoog (1962), vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa, agar (Agente gelificante).

Los medios de cultivo para Cadmo y Villalobos (1990), se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

2.5.1. Sales inorgánicas

- *Macronutrientes*: Los cultivos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrogeno y oxigeno, los elementos mas requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg y S.
- *Micronutrientes*: Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los mas esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

2.5.2. Vitaminas

Cadmo y Villalobos (1990), indican que las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las mas empleadas son:

- *Tiamina* (Vitamina B₁) se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.
- *Acido nicotínico* (Niacina)
- *Piridoxina* (Vitamina B₆) se añade como piridoxina-HCl.
- *Acido pantoténico*, ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.
- *Acido fólico*, disminuye la proliferación del tejido en la oscuridad, mientras que en la luz aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico.
- *Riboflavina*, inhibidor del crecimiento de raíces.
- *Vitamina E*, ayuda a la formación de callos provenientes de embriones, y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células.
- *Myo-inositol*, es mas propiamente dicho un azucar-alcohol que promueve la formación de ácido galacturónico. Se encuentra en los vegetales, cítricos, cereales y en la carne.

Las vitaminas además de fortalecer el vegetal, permiten el crecimiento de algunas de las partes vegetativas de la planta y hormonas de crecimiento, Ramírez (1989).

2.5.3. Reguladores de crecimiento

Roca, Roosevelt y Mafla (1992), mencionan que los reguladores de crecimiento de tipo hormonal, influyen en la tasa de crecimiento de los cultivos.

Se utilizan generalmente cuatro grupos de reguladores de crecimiento según Cadmo y Villalobos (1990): auxinas, citocininas, ácido giberélico y ácido abscísico. En algunos casos se utiliza el etileno

- **Auxinas**, Se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen movimiento basipétalo (descendente), estimulan la división celular tanto en las yemas existentes, como en la emergencia de yemas adventicias. Promueve el enraizamiento, tiene efecto en las síntesis de enzimas del ARN, de proteínas y en la permeabilidad celular. La actividad de las auxinas en el medio es degradada por las bacterias. Las más conocidas son:
 - Ácido 3-indolacético (AIA), es muy termolabil.
 - Ácido 3-indolbutírico (ABA).
 - Ácido naftalenacético (ANA).
 - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D).

La concentración varía de 0.1–10 mg/l; y el rango más empleado de 0.25 – 3 mg/l.

- **Citocininas**, En la planta, las raíces son el principal centro para la biosíntesis y son traslocadas hacia los brotes y hojas (movimiento acropétalo ó ascendente). Son importantes por que pueden estimular principalmente la división celular ó citocinesis. Son derivados de la adenina y dentro este grupo están:

- N⁶ Bencilaminopurina (BAP).
 - N⁶ Dimetilalilaminopurina (2iP).
 - N⁶ Furfurilaminopurina (Kinetina).
 - N⁶ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina (Zeatina).
- **Acido giberélico (GA₃);** promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.
 - **Acido abscísico;** se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento, *op.cit.*

2.5.4. Aminoácidos

Para Cadmo y Villalobos (1990), ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejido *in vitro*, sin embargo existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno, al tejido y su asimilación puede ser mas rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. También pueden actuar como agente quelantes. Por ejemplo; la glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor.

2.5.5. Carbohidratos

La importancia que tiene el Carbono para el vegetal es que a partir de el, se realiza el metabolismo de muchas sustancias para la planta como son los azúcares, almidones, aminoácidos, etc., por lo que en medios de cultivo, no pueden faltar las sustancias carbonadas dado la importancia en sustancias nutritivas que se forman en el vegetal, Ramírez (1989).

La sacarosa, explica Hurtado (1994), es la fuente de carbono mas ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 3 %; sin embargo en otras especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12 %).

Los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente; le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/l⁻¹, Cadmo y Villalobos (1990).

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono. La sacarosa (2 a 5 %) es el azúcar que mas se utiliza, y se puede reemplazar por glucosa y en menor medida por fructuosa; en general, la maltosa y la galactosa son menos efectivas, Roca y Mroginski (1991).

2.5.6. Agua

Se considera pertinente recalcar que el agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bi-destilada, tri-destilada o desmineralizada, de cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final, López (1990).

2.5.7. Agentes solidificantes

Roca y Mroginski (1991), mencionan que en los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1%). La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos (nutrimentos, azúcar y hormonas) como del agente gelatinizador.

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos según López (1990); las ventajas que representa el agar son:

- a. Con agua, el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b. El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c. El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- d. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar, sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que mas popularidad ha alcanzado es el gelrite, debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte, *op.cit.*

2.5.7.1. Carragenina como agente solidificante

Según Porto (2003), la carragenina es un hidrocoloide extraído de algas marinas rojas de las especies *Gigartina*, *Hypnea*, *Euचेuma*, *Chondrus* y *Iridaea*. Es utilizada en diversas aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, gelificante, agente de suspensión y estabilizante, tanto en sistemas acuosos como en sistemas lácticos. La carragenina es un ingrediente multifuncional y se comporta de manera diferente en agua y en leche; en el agua, se presenta, típicamente, como un hidrocoloide con propiedades espesantes y gelificantes. Con respecto al proceso de producción es refinada (gel claro, transparente, alto grado de pureza). El gel formado es termoreversible y puede ser sometido a ciclos de calentamiento y enfriamiento sin alteración considerable en la estructura del gel (pH neutro).

2.5.8. Suplementos no definidos

Llamados también complejos naturales, algunos de estos son:

- Extracto de levadura.
- Jugos y extractos de varios frutos (plátano, tomate y agua de coco).
- Caseína hidrolizada (proteínas).
- Antioxidantes como el ácido ascórbico.
- Absorbentes como el carbón activo.

2.6. Propagación *in vitro*

Hurtado (1996), indica que desde hace 120 años se vienen utilizando técnicas en cultivo de tejidos, órganos o células vegetales; que consisten en regenerar plantas a

partir de ápices de raíces o tallos, primordios foliares, órganos aislados, óvulos, anteras y polen cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica.

Según Mejía y Vitorelli (1998), la papa se propaga de preferencia en forma vegetativa a diferencia de la sexual. Vegetativamente, se asegura la conservación de las características varietales durante generaciones sucesivas lo cual es una ventaja en el mejoramiento del cultivo. Existen diferentes técnicas para cultivar *in vitro* la papa:

2.6.1. Micropropagación

La técnica consiste en clonar o micropropagar tejidos vegetales en forma aséptica y medios artificiales. Este proceso ha servido para multiplicar y sanear de enfermedades determinadas, variedades de numerosas plantas de forma masiva. Los bancos de germoplasma se beneficiaron de una manera menos costosa y sus colecciones se han mantenido alejadas y libres de enfermedades que se contraen fuera de las cámaras, Izquierdo (1995).

La micropropagación para Hartmann y Kester (1999), consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición.

Salaues, Rocabado y Blanc (1998), sugieren que si bien la micropropagación puede ser considerada como una progresión geométrica, esta debe ser tomada en cuenta solo como un potencial, ya que siendo los vegetales organismos vivos, su variable comportamiento altera grandemente la citada progresión (yemas que no desarrollan, plántulas débiles, infecciones y otras causas de descarte).

Admitiendo que la micropropagación es un proceso que tiende hacia una progresión geométrica, dos factores inciden de manera determinante en el volumen de producción: 1) El factor de multiplicación (FM); que es el número de yemas que una plántula puede producir en determinado tiempo y 2) La velocidad de crecimiento (VC);

que es el tiempo requerido por las plántulas para presentar un desarrollo adecuado para el transplante o una nueva propagación, *op.cit.*

La micropropagación puede iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta: órganos, tejidos o células. La elección dependerá de los objetivos que se persigan y de la especie que se baya a propagar. Cuando se va a iniciar la micropropagación de una especie que ha sido poco investigada *in vitro*, es recomendable probar diferentes fuentes de inóculos (hojas tallos, meristemos, semillas, flores) antes de decidirse por una de ellas, tomando siempre en cuenta la calidad de la planta madre, edad fisiológica (de la planta madre y del inóculo), época de año además del tipo y tamaño del inóculo; Barba, Luna y Romero (2001).

2.7. Biodiversidad y conservación

La importancia de la biodiversidad es amplia, no solo es un recurso para el hombre, sino que es imprescindible para mantener los procesos de evolución en un mundo cambiante, Money (1979).

Es evidente que la conservación y manejo de la biodiversidad por parte del agricultor juegan un rol importante en la práctica de una agricultura con características, adecuadas a un área natural determinada y en simbiosis constante con tecnologías propias desarrolladas para cada región, Esquinas (1979).

2.8. Conservación de germoplasma

Izquierdo (1995), menciona que la conservación del germoplasma, mediante métodos biotecnológicos, además de las ventajas de utilización de un menor espacio, desempeña un rol importante en la preservación de la riqueza fitogenética descubierta en el mundo hispánico poscolombino que debe ser conservada. Las técnicas de manejo de cultivos vegetales favorece la conservación de la riqueza fitogenética de América Latina y el Caribe; hacen mas eficientes las actuales variedades en uso y

posibilitan acelerar los programas de fitomejoramiento, que por medios tradicionales son costosas y a largo plazo.

Hurk (2000), indica que la conservación del recurso filogenético en condiciones *in vitro*, se utiliza como sustituto o por razones de seguridad como complemento de la conservación en campo.

La necesidad de conservación y el tratamiento que se va a aplicar, haría mucho según se trate de especies que se reproduzcan por semillas o vegetativamente, para este fin se debe contar con almacenes apropiados, los cuales constituirán verdaderos “Bancos de germoplasma” o de “Genes”, donde se mantendrán las plantas en forma definitiva (en forma de semillas, plantas o porciones de plantas), en almacenes o cámaras a bajas temperaturas de -13°C; -20°C y a 50 % de humedad relativa, o en forma temporal en cámaras de 5°C-10°C y a 50 % de humedad relativa, Manrique (1989).

Según Espinoza *et al.*, (1992) el cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un periodo breve, y la conservación del germoplasma de papa, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra. El buen estado de sanidad de muchos cultivos *in vitro* facilita enormemente el intercambio internacional de germoplasma.

Un banco de germoplasma, llamado también banco de genes, es un lugar donde los recursos genéticos de una planta son mantenidos en diferentes formas, puede ser como clones (meristemas, tubérculos, plántulas) o como semillas, Huaman (1986).

Roca y Mroginski (1991), arguyen que es grande el rango de especies vegetales cultivadas cuya conservación es accesible a las técnicas *in vitro*. La conservación de los recursos fitogenéticos mediante los métodos de cultivo *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo o extenderlo indefinidamente.

La colección *in vitro* según Villegas (1988), posee ventajas sobre la colección en campo, a saber:

- Ausencia de infecciones de campo.
- Ausencia de peligros ambientales.
- Menores costos de mano de obra.
- Acceso a material para micropropagar.
- Acceso a material para eliminar patógenos.
- Acceso del material para propagar y exportar.

2.8.1. Tipos de conservación de germoplasma

La FAO (1996), afirma que existen dos grandes posibilidades de conservar germoplasma:

- Conservación ***in situ*** preserva las especies y su variabilidad en su hábitat natural sin perjudicar su dinámica.
- Conservación ***ex situ*** que pretende conservar las especies fuera de su hábitat natural (Jardines, bancos de germoplasma *in vitro* y de campo).

Hidalgo (1991); menciona que existen tres alternativas para la conservación *ex situ*:

- 1) **Jardines Botánicos:** son plantaciones en campo, destinadas a conservar plantas enteras para realizar la respectiva clasificación taxonómica de cada especie.
- 2) **Bancos de germoplasma:** pueden ser de varios tipos, dependiendo de la parte de la planta que se pretende conservar, estos pueden ser: Banco de semillas, Bancos de polen o Bancos de clones y/o bancos *in vitro*

- 3) *Técnicas biotecnológicas*: Permiten la conservación de recursos genéticos para el futuro, mediante el mantenimiento de ADN (Bibliotecas de ADN o genotecas)

2.8.2. Métodos de conservación *in vitro*

Entre los métodos de conservación *in vitro* se pueden seguir: crecimiento continuo a tasas normales, limitación de crecimiento a tasas mínimas, supresión total del crecimiento-crioconservación, Roca Y Mroginski (1991).

Para Cadmo y Villalobos (1990), las técnicas para la preservación de germoplasma están basadas en la disminución de la actividad metabólica de las células, tejidos u órganos vegetales, de tal manera que se evite el crecimiento y que se mantenga la posibilidad regenerativa de los mismos. En general los cultivos *in vitro* se pueden almacenar utilizando dos tipos de estrategias:

2.8.2.1. Por el método del mínimo crecimiento

En general el crecimiento se puede limitar, reduciendo la temperatura, modificando la composición química del medio de cultivo, disminuyendo el contenido de agua que se almacena o alterando la atmósfera gaseosa. La reducción del contenido de sacarosa en el medio de cultivo es otra manera en que se puede inhibir el crecimiento de los cultivos *in vitro*. En algunos casos se ha usado el sorbitol, la hidrazida maleica, el cloruro de (2-cloroetil)-trimetil amonio, manitol, como retardadores del crecimiento en los medios de cultivo, *op.cit.*

Roca y Mroginski (1991), explican que este método consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios frescos, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos. Existen procedimientos que pueden inhibir o controlar el desarrollo *in vitro*, los que se describen a continuación:

- Modificando la composición del medio nutritivo.
- Deshidratación por la disminución del potencial osmótico.
- Disminuyendo la presión atmosférica, también conocido como conservación hipobárica. La presión de todos los gases del aire se reducen, sin embargo esto se puede lograr solamente reduciendo la presión del oxígeno. En este caso la presión total permanece a 760mm Hg pero el oxígeno es reemplazado por otro gas, por ejemplo nitrógeno.
- Uso de retardantes e inhibidores de crecimiento de tipo hormonal, como el ácido abscísico (ABA), el cloruro de fosfónio o clorfoniom (phosphón-D), la hidrazida Malpica o daminazida (B995), el cicocel o 2-cloroetil- cloruro de trimetil (CCC); el ácido N-dimetil succínico y el ancimidol; el ácido acetil salicílico (ASA).
- Conservación a bajas temperaturas y por congelación. Para conservación a orto plazo, una temperatura de 2-5 °C es preferida por especies de zonas frías o templadas, de 8-15 °C para especies subtropicales, y de 20-24 °C para especies tropicales. Si la conservación es a largo plazo es necesario que el material se mantenga en nitrógeno líquido (-196°C). El crecimiento es severamente inhibido a bajas temperaturas y completamente retenido bajo congelación.
- Otros factores que también influyen son el tamaño de los tubos de ensayo, la inclusión del carbón activado en el medio y modificaciones en la intensidad lumínica y el fotoperíodo.

2.8.2.2. Por medio de la criopreservación.

Cadmo y Villalobos (1990), explican que el principio básico para el almacenamiento de germoplasma por criopreservación consiste en la congelación del material vegetal a la temperatura del nitrógeno líquido (-196°C). En esas condiciones el metabolismo celular se detiene dramáticamente. Los materiales que se pueden conservar por esta

técnica incluyen ápices, yemas, meristemas, embrioides, embriones, endospermos, óvulos, anteras y semillas.

La criopreservación involucra las siguientes etapas:

- Congelamiento
- Almacenamiento
- Descongelamiento
- Transplante

Dando una mayor atención a la protección de las células, tejidos u órganos contra los daños provocados por el congelamiento. Las dos principales fuentes de daño son la formación de cristales de hielo dentro de las células, y el aumento de la concentración de solutos hasta niveles tóxicos, *op.cit.*

2.9. Viabilidad de vitroplantas conservadas

La evaluación de la viabilidad de los cultivos *in vitro* para Roca y Mroginski (1991), debe realizarse sistemáticamente. En condiciones de crecimiento lento, en que el periodo de transferencia se extiende durante meses o años, la frecuencia de evaluación de los cultivos aumenta en comparación con la evaluación que se haría al material conservado bajo nitrógeno líquido, por ejemplo. Las características mas importantes que se evalúan en el almacenamiento de crecimiento lento de cultivos derivados del ápice de yemas son: contaminación, senescencia de la hoja (la razón hojas verdes hojas muertas), número de brotes verdes (para micropropagación adicional), número de nudos viables (verdes) en relación con la longitud del tallo (verde), presencia o ausencia de raíces, y ocurrencia de callo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía (UMSA), que se encuentra a 3630 msnm de altitud, entre los 16° 30' 00" de latitud sur y los 68° 08' 00" de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado, fue proporcionado por el Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN); que constó de diez genotipos de papa de ámbito comercial: Pala roja, Phiñu blanco, Phiñu rojo, Phiñu negro, Chirimoya, Phitikilla, Yaco, Ajahuri negro, Imilla roja y Sacampaya blanco; los cuales fueron priorizados de acuerdo a sus características y las posibilidades de aprovechamiento para el agricultor.

3.3. Metodología

Para obtener un material limpio en laboratorio con menor riesgo a contaminación por hongos y bacterias, es adecuado realizar una desinfección previa al material vegetal antes de la iniciación de cualquier experimento, por lo que se realizaron las siguientes actividades:

3.3.1. Desinfección e inducción de brotes de los genotipos en estudio

La desinfección, se la realizó con la ayuda de detergente granulado y una esponja suave para no maltratar a los tubérculos, eliminando todos los brotes que estuvieran presentes en ellos; posteriormente se los secó y fueron envueltos en papel sabana y embasados en una caja cerrada para mantener la humedad a temperatura ambiente (18°C +/- 4°C) y así, después de seis semanas (49 días) se obtuvieron los nuevos brotes para la introducción del material vegetal.



Fig. 1 Genotipos de papa envueltos en papel sábana para el proceso de inducción a la brotación

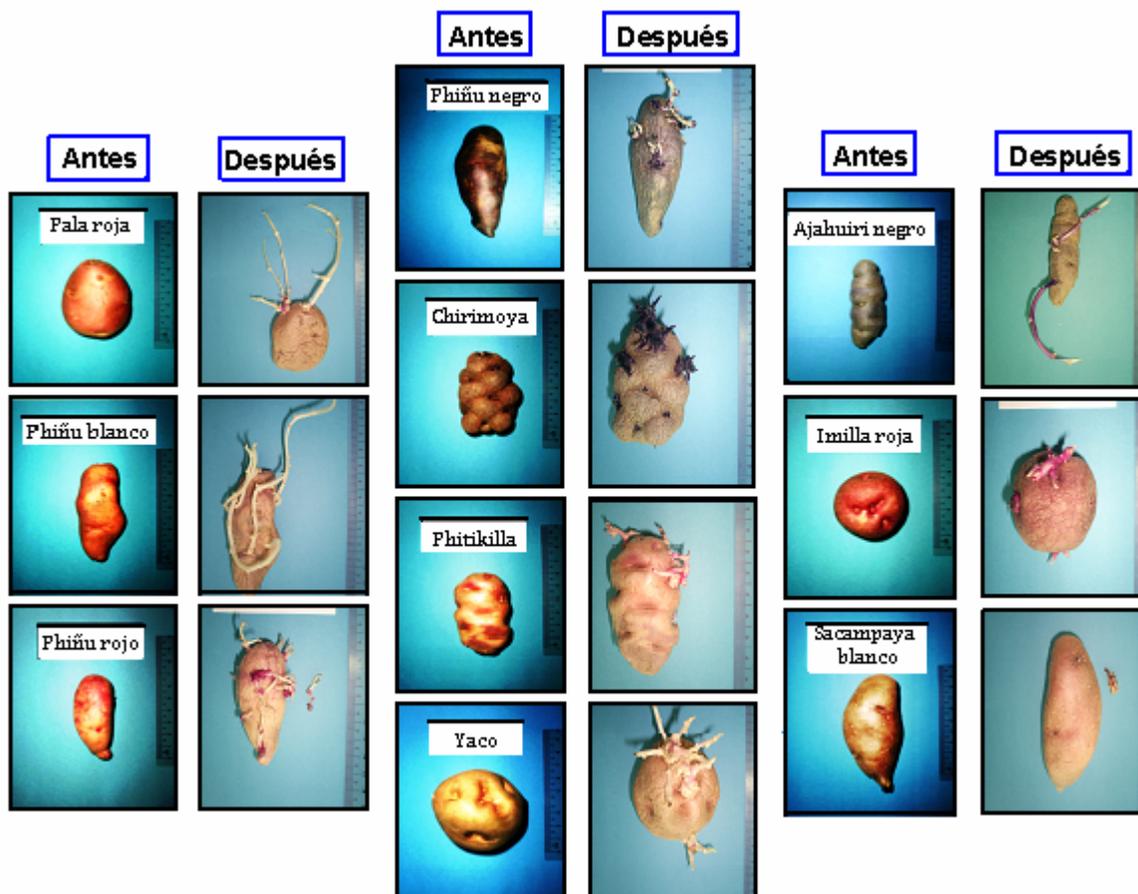


Fig. 2 Genotipos seleccionados de papa antes y después de la inducción a la brotación

3.3.2. Establecimiento, multiplicación y conservación *in vitro*

3.3.2.1. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados en base al medio básico MS de Murashige y Skoog (1962); para ello se preparó soluciones stock, con la ayuda de una balanza analítica, donde se pesaron los diferentes reactivos citados en el Anexo 1, los que fueron diluidos en agua destilada por separado y dejados en frascos para ser mantenidos en refrigeración por el tiempo que duró la investigación.



Fig. 3 a) Soluciones stock MS; b) Adición de sacarosa al medio MS; c) Ajuste de pH.

Con las soluciones stock, del medio “MS”, se preparó el medio de cultivo, adicionando como fuente de energía sacarosa (azúcar) al 3% (w/v) y como medio de soporte “carragenina” al 1% (w/v); el pH se ajustó con hidróxido de sodio (NaOH) al 1 N para reducir la acidez, previa disolución de la carragenina a 5.7 para todas las preparaciones (Anexo 1). Cabe resaltar que los medios de cultivo se formularon sin la adición de reguladores de crecimiento (Anexo3).

La distribución del medio de cultivo se realizó con una pipeta, a razón de 2.5 ml en tubos de ensayo y a 5 ml en vasitos de vidrio. Los mismos que fueron sellados con papel aluminio para evitar su evaporación y envueltos en bolsas de polietileno para evitar derrames y proteger los medios de cultivo.

Los medios preparados fueron utilizados para las etapas de introducción, multiplicación y pruebas de viabilidad (refrescamiento).

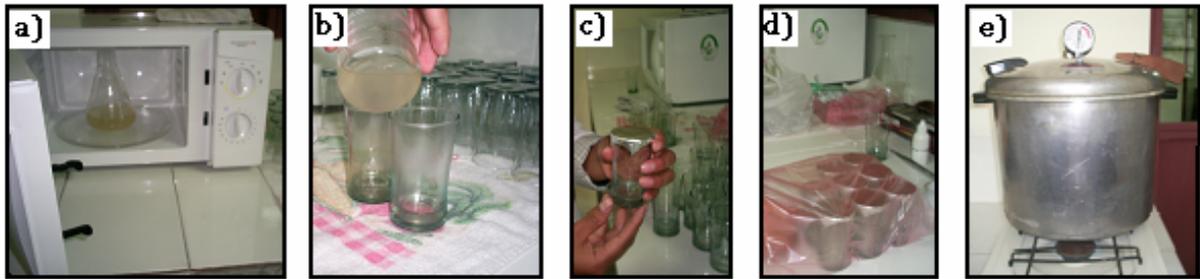


Fig. 4 a) Dilución de la carragenina en el microondas; b) Distribución del medio a vasos de vidrio; c) Sellado; d) Embolsado; e) Autoclavado.

Posteriormente todo el material preparado además de agua destilada, placas petri, bisturí, pinzas entre otros instrumentos fueron llevados al autoclave para proceder a la esterilización por un tiempo de 15 minutos a una temperatura de 121°C y una atmósfera de presión (1psi).

Un día después de la esterilización, se procedió a sacar todo el material a una cámara aséptica para luego trabajar en la cámara de flujo laminar de tipo horizontal.

3.3.2.1. Fase de establecimiento *in vitro* del material vegetal

Después de la inducción a la brotación de los tubérculos, se extrajeron cortes de los brotes de aproximadamente 2cm de tamaño para la desinfección, los que se trasladaron a la cámara de flujo laminar donde se desinfectó en primera instancia en una solución de alcohol al 70% por 30 segundos y luego en hipoclorito de sodio al 1% por 12 minutos, finalmente se realizaron tres enjuagues con agua estéril para eliminar residuos de desinfectantes y se pasaron los brotes a las placas petri, donde se realizaron cortes de aproximadamente 0.5cm (Figura 5), quitando las partes que hubieran sufrido quemaduras por los desinfectantes, dejando dos a tres nudos para obtener una buena brotación y luego con la ayuda de la pinza se pasó el material vegetal al medio de cultivo, sellándolo con plastifilm, anotando la fecha y nombre de los brotes del genotipo sembrado (Figura 6) y pasándolos inmediatamente a la sala de crecimiento que tenía una temperatura promedio de 22°C, una irradiancia de $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, humedad relativa del 70% y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (este tratamiento, tanto de temperatura, irradiancia, humedad y fotoperíodo,

se usaron también en las etapas de multiplicación, conservación y regeneración). La evaluación del material vegetal en la introducción y multiplicación se la realizó semanalmente en tres ocasiones a los 7, 14 y 21 días.

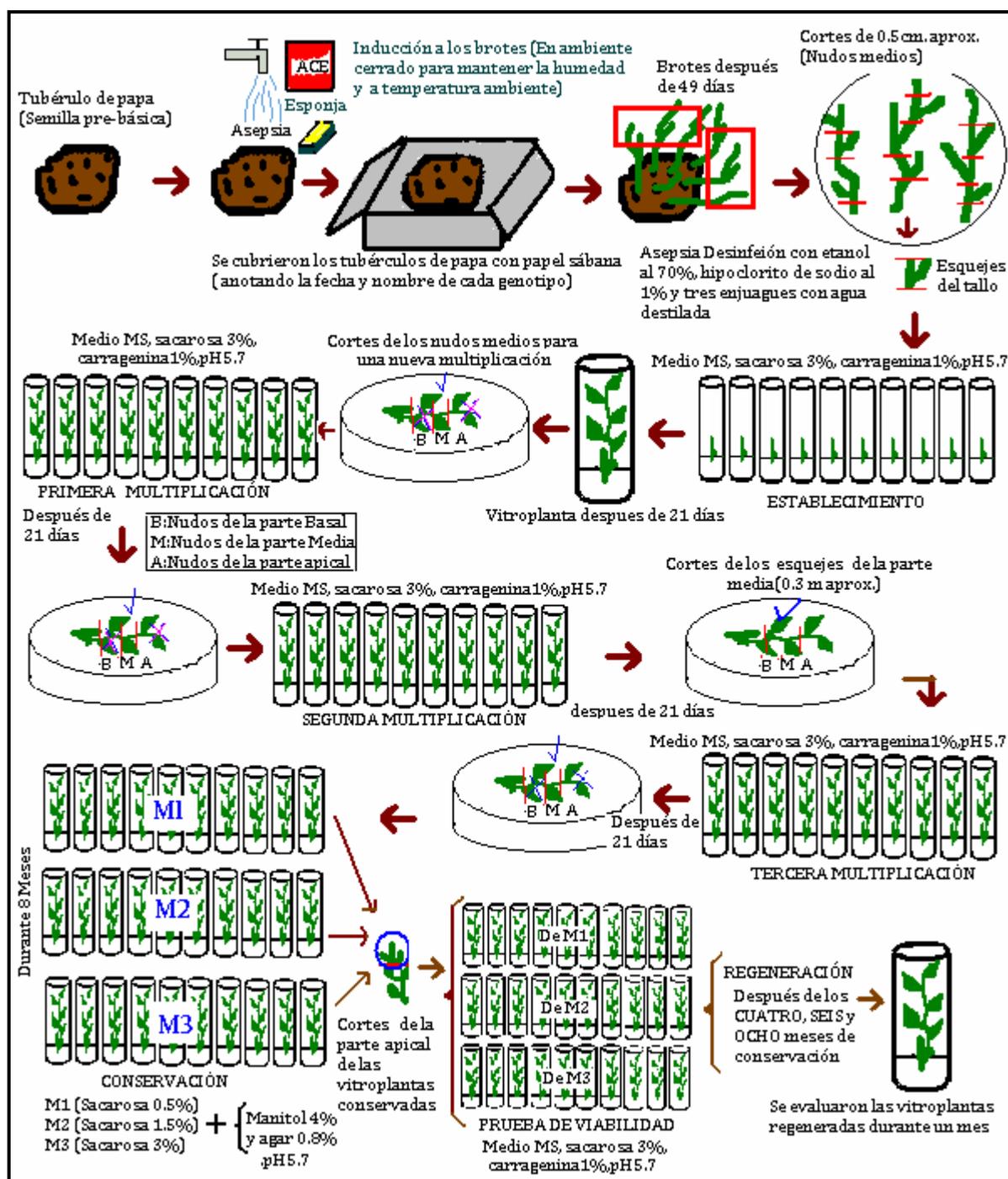


Fig. 5 Procedimiento experimental, desde la obtención del material vegetal hasta la regeneración de las vitroplantas después de su conservación

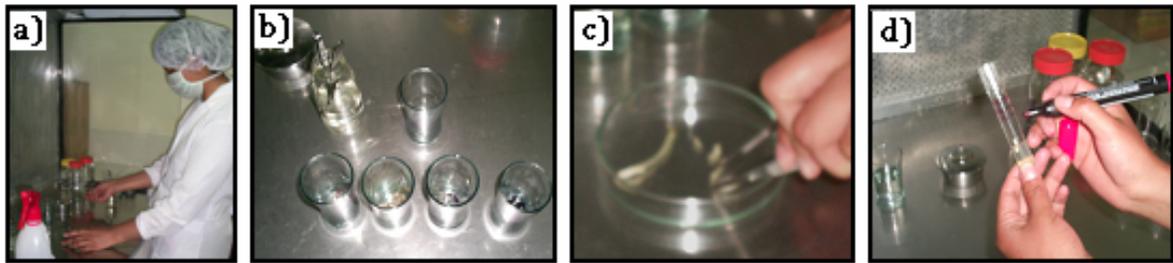


Fig. 6 Etapas de la desinfección para el establecimiento *in vitro* de los genotipos de papa: a) Cámara de flujo laminar; b) Desinfección del material vegetal; c) Cortes en las placas petri; d) Siembra y marcaje

3.3.2.2. Fase de multiplicación *in vitro*

Luego del establecimiento, se realizaron tres multiplicaciones, las vitroplantas se evaluaron en tres ocasiones al igual que en el establecimiento, cabe resaltar que para la multiplicación se utilizaron los nudos de la parte media de cada vitroplanta, tal como lo recomiendan Salgues, Rocabado y Blanc (1998), sugiriendo que las yemas de la parte media se desarrollan más uniformes que las yemas basales y las apicales crecen más rápido que las restantes (debido obviamente a encontrarse en plena actividad). Las dos primeras multiplicaciones se las realizaron con cortes de 0.5cm aproximadamente; la tercera con esquejes de 0.3cm o inferiores (a manera de rejuvenecer el material vegetal); y finalmente luego de su multiplicación fueron llevados a la sala de crecimiento con las condiciones ya mencionadas.

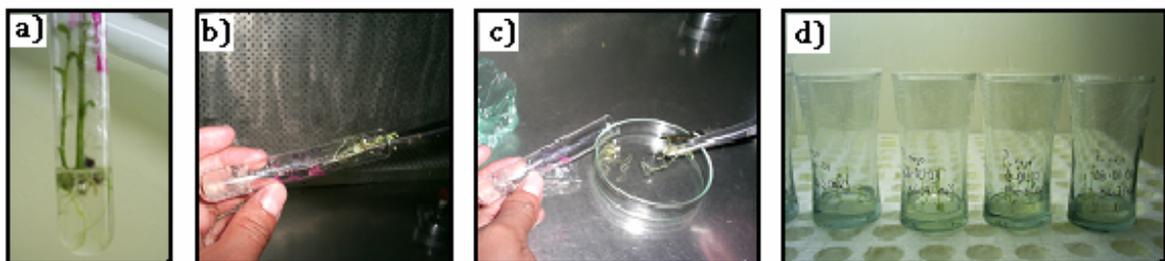


Fig. 7 Etapas de la multiplicación *in vitro* de los genotipos de papa: a) A tres semanas de crecimiento; b) Extracción; c) Preparación del material vegetal; d) Incubación de las vitroplantas en la sala de crecimiento.

3.3.2.3. Fase de conservación *in vitro* de vitroplantas de papa

a) Preparación del medio de conservación

Para la preparación del medio de conservación, se utilizaron formulaciones estandarizadas del CIP (1992). Se utilizó el medio basal MS (Anexo 2) de Murashige y Skoog (1962), al cual se adicionó “manitol” al 4% (w/v) como retardador de crecimiento y agar al 0.8% (w/v), variando en su concentración la sacarosa. Se obtuvo tres medios con diferentes concentraciones: 0.5%, 1.5% y 3% (w/v). El medio de cultivo se dispensó con una pipeta graduada en tubos de ensayo de 12cm en cantidades de 3 ml.

Cuadro 1. Medios de conservación *in vitro* preparado con tres diferentes concentraciones de sacarosa (0.5%; 1.5% y 3%)

Medio de conservación		Sacarosa %	Agar %	Manitol %
M1	MS	0.5	0.8	4
M2	MS	1.5	0.8	4
M3	MS	3	0.8	4

b) Siembra

Para la siembra se utilizó material de 0.5 cm aproximadamente, proveniente de la parte media de las vitroplantas (esquejes) al igual que en las primeras multiplicaciones y llevándolas a la sala de crecimiento a factores de incubación ya mencionados

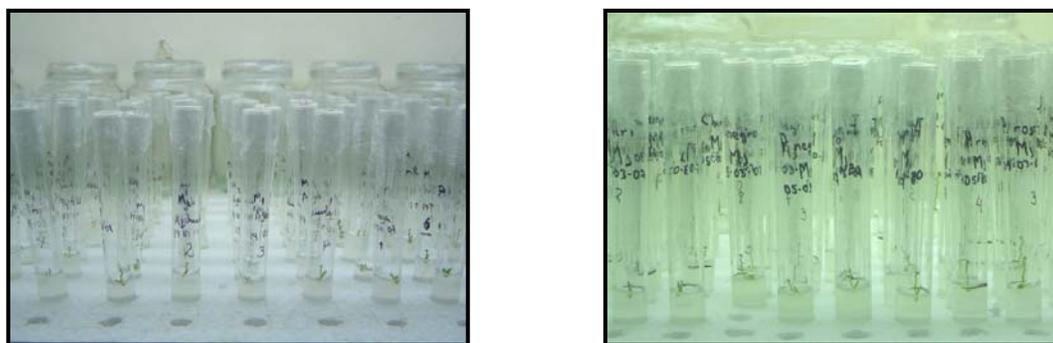


Fig. 8 Vitroplantas en los medios de conservación, después de un mes de evaluación

3.3.3. Prueba de viabilidad del material en conservación

Para asegurar la viabilidad de las vitroplantas en conservación, es necesario realizar pruebas de regeneración para evitar la pérdida de material vegetal *in vitro*, este proceso es llamado “refrescamiento”.

Para esto, se realizaron tres refrescamientos (pruebas de viabilidad) en diferentes tiempos: a los 4, 6 y 8 meses de la conservación. Estas pruebas, consisten en pasar las vitroplantas de medios de conservación a medios frescos MS, con las mismas características de los medios de establecimiento y multiplicación. El material refrescado fue incubado en la sala de crecimiento con las mismas condiciones que en las anteriores etapas, para ser evaluadas por un lapso de cuatro semanas (para las tres pruebas de viabilidad).

3.3.4. Observación y toma de datos

Para la toma de datos, se tomaron en cuenta las siguientes variables de respuesta:

3.3.4.1. Fase de establecimiento *in vitro*

- **Porcentaje de supervivencia;** esta variable, fue evaluada y cuantificada en el establecimiento *in vitro*, hasta las tres semanas. Se descartaron vitroplantas que no desarrollaron o no respondieron a la introducción.
- **Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias;** para ello se realizó un conteo del material vegetal contaminado por hongos y bacterias, generalmente, los hongos aparecen en los medios de cultivo a los 5 a 6 días después de la introducción y las bacterias después de una semana.
- **Presencia de oxidación y fenolización;** la variable, fue medida por simple observación de los explantes, tomando en cuenta el cambio de color en el medio; si el medio se torna café o marrón, entonces existe oxidación del medio; y si el medio se torna plomo en sus diferentes tonalidades, entonces existe fenolización del medio.

- **Formación de callos;** esta variable, fue medida por simple observación de los explantes, se tomó en cuenta pequeñas aglomeraciones de tejido desorganizado formado alrededor de los explantes.

3.3.4.2. Fase de multiplicación de las vitroplantas

- **Altura de plántula;** para la medición de esta variable se utilizó una regla transparente y milimetrada, donde se comenzó a medir desde el inicio de la yema (vástago) de la vitroplanta, hasta la parte terminal de la misma (ápice).

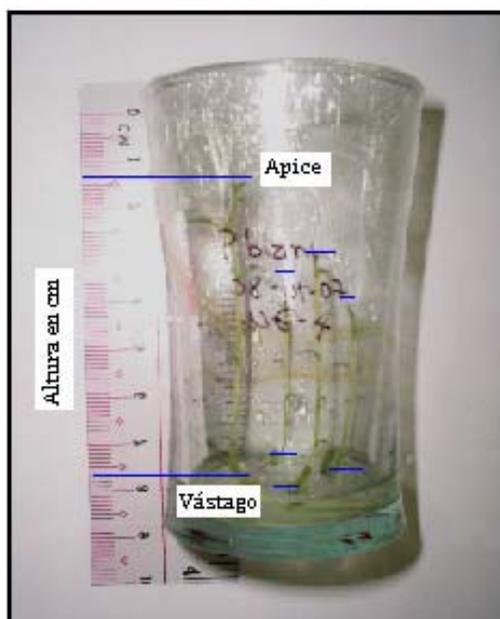


Fig. 9 Medición de la altura de vitroplantas en vasos de vidrio

- **Número de nudos por plántula;** se inicio el conteo de nudos por simple observación para cada vitroplanta tomando en cuenta, el brote principal.
- **Grado de enraizamiento;** fue determinado, siguiendo parámetros de medición vistos en el cuadro 2.
- **Presencia de callos;** la evaluación se realizó de forma similar a la fase de establecimiento.

3.3.4.3. Fase de conservación *in vitro*

En esta fase se evaluaron al igual que en los anteriores casos; presencia de hongos y bacterias, altura, número de nudos, grado de enraizamiento, presencia de oxidación y fenolización de las vitroplantas conservadas, además:

- **Formación de raíces aéreas;** Se cuantificó el número de raíces existentes en cada explante (Cuadro 2), que estuvieran sobre la superficie del medio de cultivo, dentro el tubo de ensayo.
- **Presencia de micro-tubérculos;** al término de ocho meses algunos genotipos formaron microtubérculos, y estos fueron evaluados por simple conteo, siguiendo parámetros de evaluación según el cuadro 2.
- **Presencia de ápices amarillos;** esta variable fue medida, por simple observación, contando el número de ápices amarillos presentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de valores para la evaluación de número de raíces (normales y aéreas), presencia de microtubérculos, ápices amarillos, y bases amarillas (Fase de Multiplicación y conservación *in vitro*)

FASE DE EVALUACIÓN	Variable de respuesta	Nominación	Valor de medición	Valor asignado
MULTIPLICACIÓN Y CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i>	Número de raíces	Ninguna o ausente	0	1
		Regular	1,2,3	2
		Muchas o abundantes	Mayor a 4	3
CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i>	Número de raíces aéreas	Ninguna o ausente	0	1
		Regular	1,2,3	2
		Muchas o abundantes	Mayor a 4	3
	Microtubérculos	Ausente	0	1
		Presente	1	2
	Presencias de ápices amarillos	Ninguna o ausente	0	1
		Muy pocas	1,2,3	2
		Regular	4,5,6	3
		Muchas o abundantes	Mayor a 7	4
Amarillamiento basal de las vitroplantas	Presente	0	1	
	Ausente	1	2	

- **Amarillamiento basal de las vitroplantas;** se la midió por simple observación, contando el número bases que se muestren amarillas o secas (a partir del vástago de las vitroplantas), los parámetros de evaluación se observan en el cuadro 2.

3.3.4.4. Prueba de viabilidad (Refrescamiento o regeneración de vitroplantas)

En esta fase se evaluó la variable: altura de vitroplanta y presencia de callos. Para esto se tomaron en cuenta los mismos parámetros de evaluación citados en multiplicación.

3.3.5. Diseño experimental

3.3.5.1. Diseño experimental para las etapas de establecimiento, multiplicación y pruebas de viabilidad

El análisis de los datos se realizó bajo un diseño experimental Completamente al Azar de 10 tratamientos (genotipos en estudio), con 10 repeticiones (Calzada, 1982). Con el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta cualquiera

μ = Media general

α_i = Efecto j-ésimo factor A (Genotipo)

ε_{ij} = Error experimental

3.3.5.2. Diseño experimental para la etapa de conservación

Al ser un trabajo realizado en condiciones de laboratorio, las unidades experimentales se distribuyeron bajo un diseño Completamente al azar con arreglo bifactorial y 30 repeticiones por tratamiento (Calzada, 1982).

a) Factores de estudio

Factor A: Genotipos de papa (10) **Factor B:** Medios de conservación (3)
Total = 30 tratamientos

Cuadro 3. Factores de estudio empleados en el diseño experimental

Factor A: 10		Factor B: 3		
Genotipos de papa		Medios de conservación		
G ₁	(Pala roja)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₂	(Phiñu blanco)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₃	(Phiñu rojo)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₄	(Phiñu negro)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₅	(Chirimoya)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₆	(Phitikilla)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₇	(Yaco)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₈	(Ajahuri negro)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₉	(Imilla roja)	M ₁	M ₂	M ₃
G ₁₀	(Sacampaya blanco)	M ₁	M ₂	M ₃

Cuadro 4. Distribución de los tratamientos

G ₁ M ₁	G ₂ M ₁	G ₃ M ₁	G ₄ M ₁	G ₅ M ₁	G ₆ M ₁	G ₇ M ₁	G ₈ M ₁	G ₉ M ₁	G ₁₀ M ₁
G ₁ M ₂	G ₂ M ₂	G ₃ M ₂	G ₄ M ₂	G ₅ M ₂	G ₆ M ₂	G ₇ M ₂	G ₈ M ₂	G ₉ M ₂	G ₁₀ M ₂
G ₁ M ₃	G ₁ M ₃	G ₃ M ₃	G ₄ M ₃	G ₅ M ₃	G ₆ M ₃	G ₇ M ₃	G ₈ M ₃	G ₉ M ₃	G ₁₀ M ₃

Donde:

G₁₋₁₀= Genotipos de papa

M₁ = Medio de conservación N° 1 (concentración de sacarosa al 0.5%)

M₂ = Medio de conservación N° 2 (concentración de sacarosa al 1.5%)

M₃ = Medio de conservación N° 3 (concentración de sacarosa al 3.0%)

Los medios de conservación, fueron formulados de acuerdo al Centro Internacional de la Papa (CIP, 1992), con diferentes porcentajes en contenido de sacarosa, citados en anexo 2 y 3.

b) Modelo lineal aditivo

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta cualquiera debido al efecto del i-ésimo genotipo, j-ésimo medio de conservación y k-ésima repetición

μ = Media general del experimento

α_i = Efecto i-ésimo factor A (Genotipo)

γ_j = Efecto j-ésimo factor B (Medios de conservación)

$(\alpha\gamma)_{ij}$ = Efecto de Interacción A*B (Variedad por medios de conservación)

ε_{ijk} = Error experimental

3.3.6. Análisis estadístico

Para la realización del análisis de varianza, prueba de medias, además de la prueba de Tukey con significancia del 0.05 se utilizó, el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows, y para la realización de gráficos de medias se utilizó el paquete estadístico Excel.

3.3.7. Transformación de datos

Algunos datos que fueron tomados durante el proceso de investigación, se encontraban fuera de la curva normal, por lo que se realizó la correspondiente transformación de datos con la raíz cuadrada de x (\sqrt{x}).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Fase de establecimiento del material vegetal a condiciones *in vitro*

4.1.1. Porcentaje de supervivencia

Una de las desventajas para iniciar el cultivo *in vitro*; sin duda es el porcentaje de supervivencia, ya que después de el establecimiento dependerá del manejo adecuado de los explantes, del medio de cultivo y del tipo de órgano a emplear; en este caso, es recomendable utilizar brotes jóvenes de los tubérculos de papa.

Después del establecimiento de los brotes a condiciones *in vitro*, se realizó la última evaluación a los 21 días, para determinar porcentaje de supervivencia (cuantos de los explantes de los diez genotipos pudieron sobrevivir).

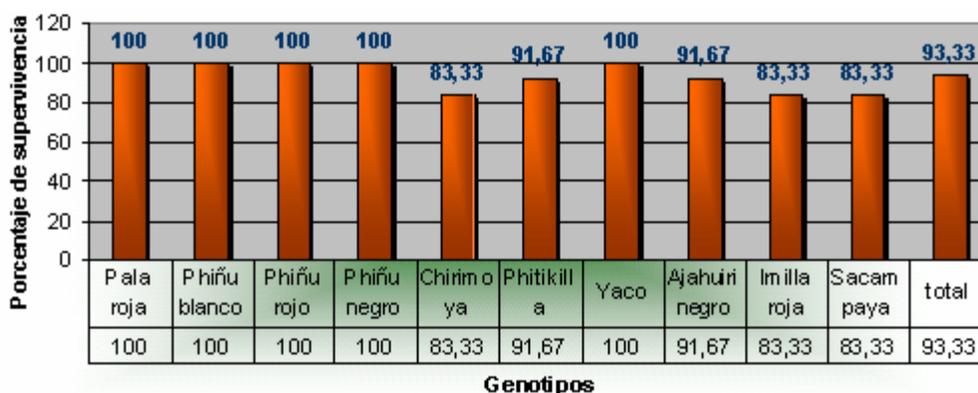


Fig. 10 Porcentaje de supervivencia por genotipo en el establecimiento *in vitro*

La figura 10, muestra el porcentaje de supervivencia obtenido en el establecimiento *in vitro*, los genotipos Pala roja, Phiñu blanco, rojo y negro, además de Yaco, tuvieron un 100%; a diferencia de los genotipos Ajahuri negro y Phitikilla con un 91,67% respectivamente y finalmente, los genotipos Chirimoya, Imilla roja y Sacampaya blanco con 83,33%; dando un total de 93,33% de supervivencia. Una de las causas para la reducción de la misma, pudo deberse a que los explantes fueron quemados con las pinzas o también al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y etanol.

En esta primera etapa (establecimiento y multiplicaciones), se realizó un análisis de varianza simple (factorial), para observar el comportamiento morfológico de las vitroplantas bajo condiciones *in vitro* en un medio de cultivo artificial (Murashige y Skoog, 1992), evaluando las diferencias entre genotipos.

Cuadro 5. Análisis de varianza para las variables: Altura, número de nudos y número de raíces de vitroplantas (Establecimiento *in vitro*).

Variables morfológicas		Altura	Número de nudos	Número de raíces
FV	GL	CM	CM	CM
Genotipos	9	0,88 **	1,13 **	0,117 **
Error	110	0,048	0,209	0,023
Total	119			
CV (%)		12.37	16.95	9.70

** Altamente significativo

4.1.2. Altura de vitroplanta

El análisis de varianza mostrado en el cuadro 5, para la variable altura de vitroplanta, señala que los genotipos muestran un comportamiento estadísticamente diferente en el establecimiento *in vitro* (Figura 11), detallando también un coeficiente de variación de 12.37%, que es inferior al 30% rango que no debe exceder en trabajos de laboratorio, pues perdería su confiabilidad, así lo afirma Castañeda (1995).

En la figura 11, se observa según la prueba de medias y Tukey (5%) que existen ocho grupos diferentes estadísticamente; en primer lugar el genotipo Phiñu negro con la mayor altura de hasta 2.26cm; seguido de: Phiñu rojo, Phiñu blanco, Chirimoya y Pala roja (como segundo, tercer y cuarto grupo) con resultados similares que van de 2.03cm a 1.81cm; Phitikilla con 1.69cm representa el quinto grupo; y con menores alturas los genotipos Yaco (1.63cm), Ajahuri negro (1.61cm), Imilla roja (1.47cm) y Sacampaya blanco con 1.28cm promedio.

Las diferencias encontradas en esta etapa, con relación a la altura de vitroplanta, pueden atribuirse a los diferentes genotipos de papa estudiados, ya que su capacidad de división y regeneración celular son distintos, así lo indica López (2001).

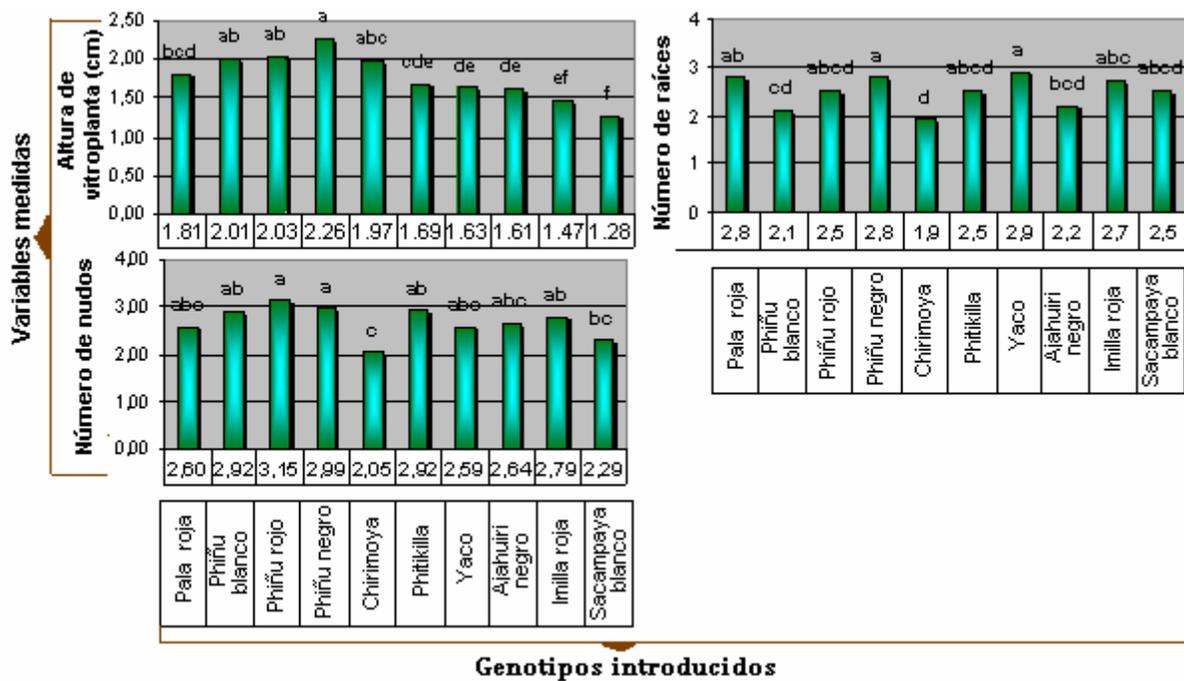


Fig. 11 Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Establecimiento *in vitro*)

4.1.3. Número de nudos

Esta variable de respuesta (Cuadro 5), muestra diferencias estadísticamente existentes entre genotipos con un coeficiente de variación del 16,95%, que demuestra la confiabilidad de los datos (Castañeda, 1995).

Los cinco grupos diferentes estadísticamente expuestos en la figura 11 con respecto al número de nudos, muestran en un primer grupo a los genotipos Phiñu rojo con 3.15 nudos y Phiñu negro con 2.99 nudos (estos genotipos lograron también las mayores alturas); el segundo grupo Phiñu blanco y Phitikilla con 2.92 nudos, e Imilla roja con 2.72 nudos; los genotipos con menor número de nudos fueron Sacampaya blanco (2.29 nudos) y Chirimoya (2.05 nudos) este último obtuvo mayores alturas, lo que indica que la distancia entre nudos es amplia a diferencia de Sacampaya blanco que obtuvo la menor altura y mayor número de nudos en esta fase, por lo tanto las diferencias mostradas son propias de los diferentes genotipos introducidos; similar afirmación da

Gómez (2003), quien sugiere que el diferente comportamiento de las vitroplantas en relación a la altura y al número de nudos, se puede suponer que se debe a los explantes que provienen de diferentes variedades.



Fig. 12a Desarrollo de vitroplantas de papa en la etapa de establecimiento *in vitro* a los 21 días

4.1.4. Número de raíces

Se pueden diferenciar en la figura 11, siete grupos diferentes estadísticamente; con los mayores resultados los genotipos Yaco (2.9 raíces) y Phiñu negro (2.8 raíces), los cuales alcanzaron también mayor desarrollo en cuanto a altura y nudos; posteriormente, Pala roja con 2.8 raíces, Imilla roja con 2.7, Phiñu blanco, Phitikilla y Sacampaya blanco con resultados iguales de 2.5 raíces; y los genotipos que consiguieron menores raíces fueron Phiñu blanco con 2.1 y finalmente Chirimoya con 1.9 raíces. Estos resultados, pudieron deberse en principio por no haber adicionado al medio ningún regulador de crecimiento, ya que la adición de hormonas como ANA, estimulan la formación de raíces abundantes; tal afirmación la hacen Roca y Mroginski (1991).

4.2. Fase de multiplicación *in vitro*

Una vez concluida la fase de establecimiento *in vitro*, se procedió a la multiplicación de vitroplantas, en la que se obtuvieron resultados satisfactorios por no encontrar contaminantes en los medios de cultivo.

Se realizaron tres multiplicaciones a manera de rejuvenecer el material vegetal y asegurar los resultados en conservación; las dos primeras, se realizaron mediante cortes de esquejes de 0.5 cm aproximadamente, y la tercera con cortes menores de 0.3 cm (usando en todos los casos nudos de la parte media de las vitroplantas). Los resultados se describen a continuación:

4.2.1. Primera multiplicación *in vitro*

Para esta etapa, en función a las variables de respuesta, se obtuvieron los siguientes resultados, recalando que no hubo presencia de contaminación en los medios de multiplicación.

Cuadro 6. Análisis de varianza para las variables: Altura, número de nudos y número de raíces de vitroplantas (primera multiplicación)

Variables morfológicas		Altura	Número de nudos	Número de raíces
FV	GL	CM	CM	CM
Genotipos	9	0,25 **	0,61 **	0,917 **
Error	110	0,026	0,125	0,132
Total	119			
CV (%)		8.56	12.29	22.82

** Altamente significativo

4.2.1.1. Altura de vitroplanta

El análisis de varianza, expuesto en el cuadro 6, para la variable altura de vitroplanta, con la prueba de Tukey al 5 % de significancia en la primera multiplicación, da a conocer las diferencias altamente significativas con respecto a los genotipos evaluados, con un coeficiente de variación de 8.56%, demostrando así la confiabilidad de los datos, tal como lo indica Castañeda, 1995.

En la figura 12, se observan grupos de genotipos estadísticamente diferentes, donde el genotipo Phitikilla, tuvo una mejor adaptación al medio de multiplicación, con una altura promedio de 4.42cm, seguido del genotipo Phiñu blanco, con 4.25cm; le siguen los genotipos: Phiñu rojo, Yaco, Ajahuri negro, Chirimoya, Pala roja, con resultados por encima de los 3.33cm de altura, a diferencia de Imilla roja y Sacampaya blanco que

obtuvieron las menores alturas de hasta 2.92cm y 2.60cm respectivamente. Según Barba, Luna y Romero (2001), cada planta tiene necesidades nutricionales específicas, y no existe un medio de cultivo de uso general, puede deberse a esta razón que las plantas no desarrollaron a un mismo nivel, siendo aún del mismo género.

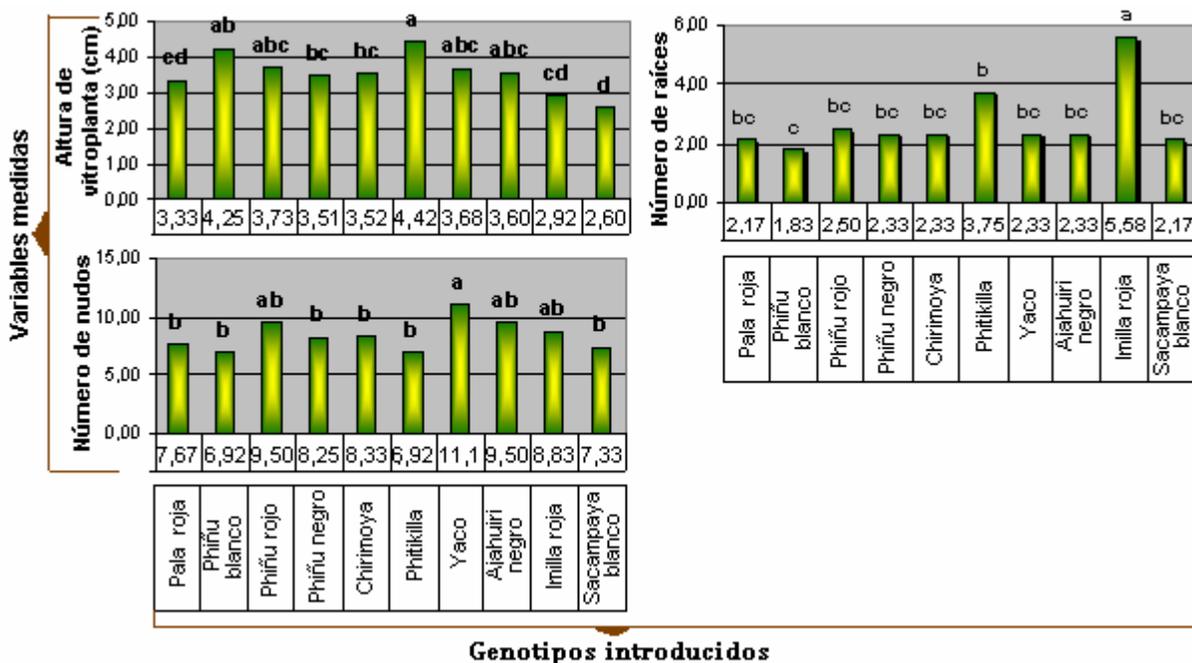


Fig. 12b Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Primera multiplicación)

4.2.1.2. Número de nudos

El ANVA para la variable número de nudos en la primera multiplicación (cuadro 6), indica que existen diferencias altamente significativas entre los genotipos de papa, esto quiere decir que cada uno de los genotipos, tiene un número diferente de nudos por el comportamiento *in vitro*, resultado comprobado con la obtención de las mismas diferencias en cuanto a la altura de vitroplanta (figura 12).

La figura 12 además describe tres grupos diferentes; el genotipo Yaco alcanzó 11.17 nudos siendo el mayor promedio; a continuación los genotipos Phiñu rojo, Ajahuiri negro, Imilla roja, con un promedio de 9.50, 9.50 y 8.83 nudos respectivamente, y

finalmente con resultados menores en un tercer grupo los genotipos Phiñu negro, Chirimoya, Sacampaya blanco, Pala roja, Phiñu blanco y Phitikilla con resultados que van de 7,67 a 6,92 nudos, resultados estadísticamente similares

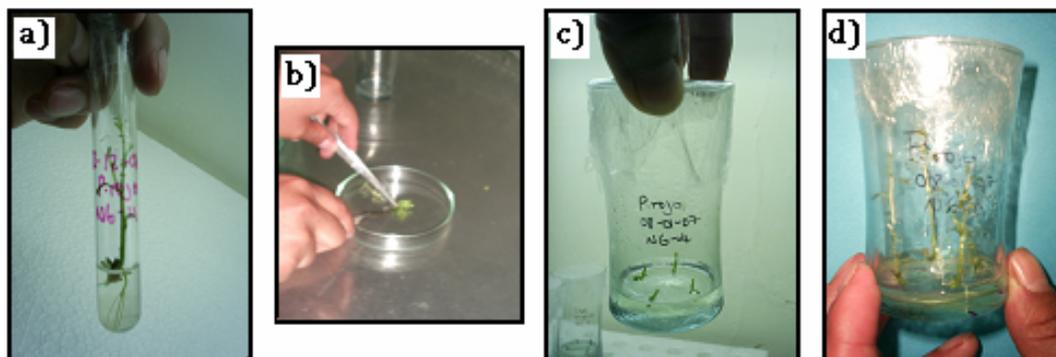


Fig. 13 Pasos de la multiplicación de vitroplantas: a) Vitroplanta de papa a los 21 días; b) Cortes para su multiplicación; c) Explantes sembrados; d) Vitroplantas desarrolladas después de 21 días.

4.2.1.3. Número de raíces

El análisis de varianza para la variable número de raíces, expuesto en cuadro 6, indica las diferentes altamente significativas entre genotipos, de acuerdo a la prueba de de Tukey al 5 %, con un coeficiente de variación de 22.82%, resultado considerado aceptable, según Castañeda (1995).

La figura 12, distingue cuatro grupos estadísticamente diferentes, de ellos el genotipo Imilla roja, con promedio de 5.58 raíces sobresale de los demás; posteriormente esta Phitikilla (con 3.75 raíces), demostrando su abundancia según los parámetros de evaluación; seguido de: Phiñu rojo (con 2.5), Phiñu negro, Chirimoya, Yaco y Ajahuri con un promedio igual a 2.33 raíces; también esta en este grupo Pala roja con 2.17 raíces promedio; y finalmente con menor número de raíces Phiñu blanco (1.83), que aún sean pocas, según los parámetros de evaluación existe la presencia de raíces.

Para obtener respuestas mayores en cuanto al número de raíces, es preciso tener un balance adecuado de auxinas y citocininas, induciendo la formación de raíces y/o

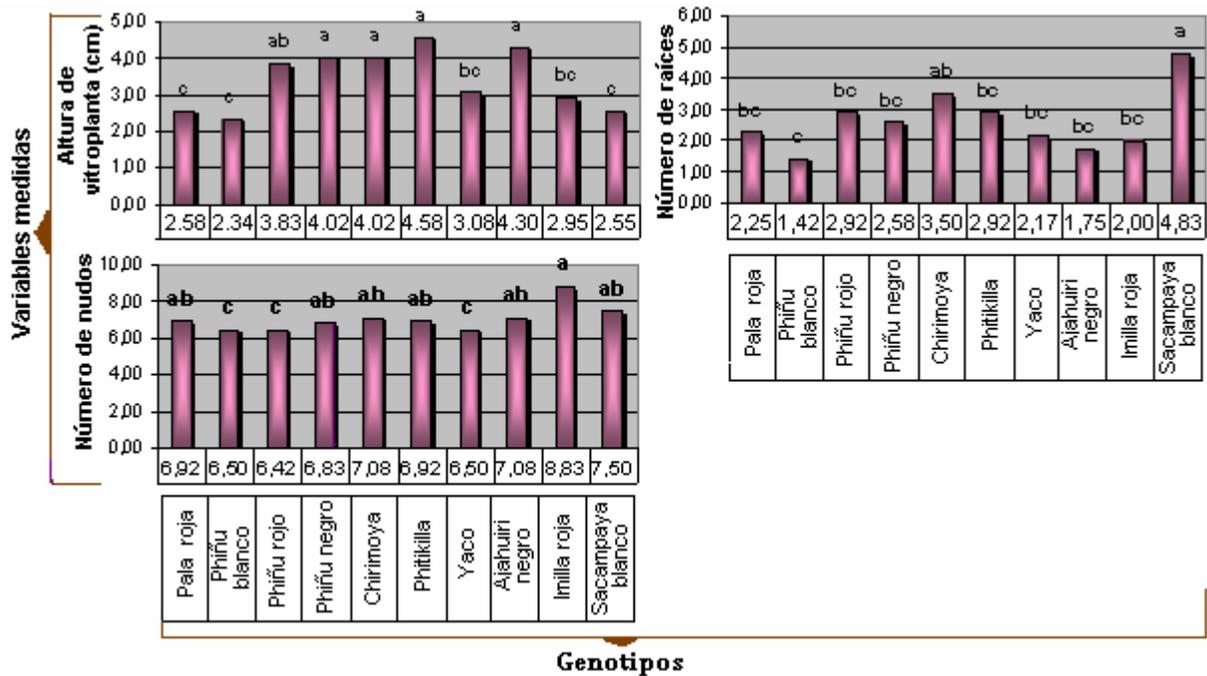


Fig. 14 Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplanta, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Segunda multiplicación)

4.2.2.2. Número de nudos

Esta variable de respuesta, a diferencia de la primera multiplicación, indica que no existen diferencias significativas entre genotipos con respecto al número de nudos, tal respuesta se halla en la figura 14, donde se observan las similitudes en cuanto al número de nudos de cada genotipo, el cuadro 7 muestra también un coeficiente de variación de 11.41% resultado aceptable por estar debajo del 30 % (que es el rango de aceptación).

No existen diferencias en cuanto al número de nudos en la segunda multiplicación, sin embargo, existe un genotipo que resalta de los demás con un promedio de 8.83 nudos como es el caso de Imilla roja; con similares resultados que van de 6.42 a 7.50 nudos promedio están: Sacampaya blanco, Ajahuiri negro, Chirimoya, Phitikilla, Pala roja y Phiñu negro; y finalmente, en un tercer grupo los genotipos: Yaco y Phiñu blanco (con 6.5 nudos) y Phiñu rojo (con 6.42) en promedio (Figura 14). Es así que Roca y Mroginski (1991), mencionan que en cultivos *in vitro* de alfalfa (*Medicago sativa*) las

respuestas varían con el cultivar, e inclusive hay diferencias entre plantas de un mismo cultivar.



Fig. 15 Vitroplantas en la segunda multiplicación de los genotipos con mejores resultados: a) Phitikilla, b) Ajahuri negro; y menor resultado c) Sacampaya blanco.

4.2.2.3. Número de raíces

En esta variable de estudio, se demuestra con la prueba de significancia de Tukey al 5 % en el análisis de varianza (Cuadro 7), que las diferencias entre genotipos son altamente significativas, con un coeficiente de variación menor al 30%.

La prueba de medias generales de cada genotipo (Figura 14), muestra que Sacampaya blanco, alcanza un número de 4.83 raíces obteniendo el mayor promedio de los 4 grupos diferentes estadísticamente; seguidamente Chirimoya (con 3.5 raíces); en el tercer grupo: Phiñu rojo, Phitikilla, Phiñu negro, Yaco, Pala roja, Imilla roja y Ajahuri negro con promedios que van de 2.92 a 1.75 raíces; por último se encuentra el genotipo Phiñu blanco, que obtuvo el menor número en promedio de raíces de 1.42; este es un resultado comprensible, ya que en esta multiplicación este genotipo, es el que obtuvo una menor altura y también un menor número de nudos, por lo que es razonable el que también obtenga un menor número de raíces; además de que no se adicionó reguladores de crecimiento a los medios para obtener mayor número de raíces.

En realidad para la obtención masiva de raíces se requiere adicionar al medio de cultivo auxinas y citoquininas en concentraciones variables, pero en el caso de

micropropagación no es indispensable la obtención de raíces, por lo que no se utilizaron estos reguladores de crecimiento. Por su parte Villegas (1988), menciona que el enraizamiento de los tallos requiere de auxinas, pero raramente de citoquininas.

4.2.3. Tercera multiplicación *in vitro*

En esta última etapa de propagación, se utilizaron esquejes (también de los nudos de la parte media de las vitroplantas), de 0.3cm o inferiores, lo cual es una forma de rejuvenecer, además de sanear el material vegetal para su posterior conservación mediante la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, así lo describen Barba, Luna y Romero (2001), siguiendo este concepto es que se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 8. Análisis de varianza (tercera multiplicación) para las variables: altura, número de nudos y número de raíces de las vitroplantas.

Variables morfológicas		Altura	Número de nudos	Número de raíces
FV	GL	CM	CM	CM
Genotipos	9	0,331 **	0,598 **	0,672 **
Error	110	0,013	0,077	0,121
Total	119			
CV (%)		5.71	9.97	21.37

** Altamente significativo

4.2.3.1. Altura de vitroplanta

Para la variable altura de vitroplanta, el ANVA muestra que las diferencias son altamente significativas según la prueba de Tukey (5%) en cuanto a los genotipos evaluados (cuadro 8), esto quiere decir que cada uno de los genotipos es diferente en cuanto a la altura, el cuadro muestra también un coeficiente de variación muy satisfactorio de 5.71% demostrando su confiabilidad (Castañeda, 1995).

Los promedios obtenidos en la figura 16, muestran seis grupos diferentes; en primer lugar los genotipos: Yaco y Sacampaya blanco, con alturas de 4.68cm y 4.56cm respectivamente; en un segundo grupo Phiñu negro, con un altura promedio de 4.45cm; posteriormente, en un tercer grupo: Phiñu rojo, Phiñu blanco, Phitikilla, con alturas promedio de 4.38cm, 4.31cm, 4.23cm correspondientemente; los genotipos Ajahuiri

negro e Imilla roja, abarcan un cuarto grupo con alturas de 3.93cm y 3.97cm respectivamente; el genotipo Chirimoya con 3.84cm; y finalmente Pala roja, con 2.53cm es el de menor altura a diferencia de los anteriores genotipos; este resultado establece que el genotipo Pala roja, no tiene una respuesta rápida cuando se realizan cortes muy pequeños (en este caso inferiores a 0.3cm), a diferencia de los otros genotipos con altura superiores a los 3.8cm.

Ponce (1998), indica que la capacidad de regeneración de las plantas está estrechamente relacionada con el genotipo, razón por la cual la regeneración de los mismos juega un papel importante sobre todo si será destinada a un programa de propagación masiva.

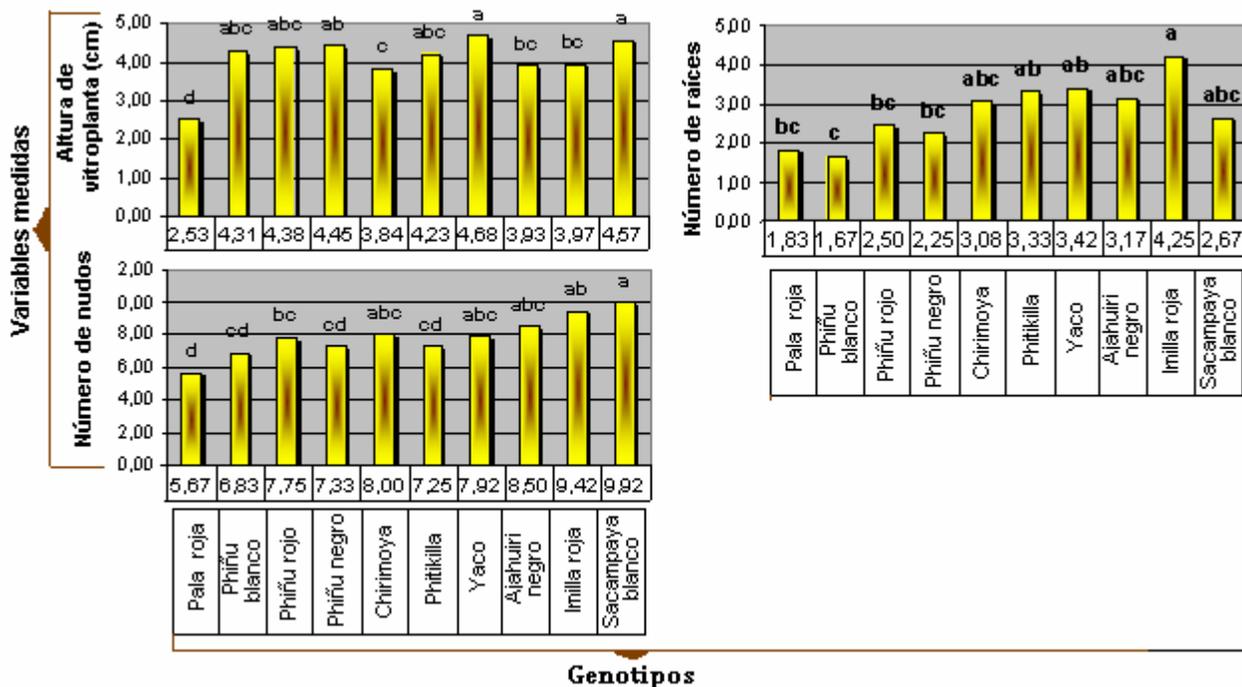


Fig. 16 Comparación de medias Tukey (5%) para las variables: altura de vitroplantas, número de nudos y raíces, en función a los genotipos a los 21 días de evaluación (Tercera multiplicación)

4.2.3.2. Número de nudos

Esta variable de respuesta muestra diferencias altamente significativas (cuadro 8) con respecto a los genotipos evaluados; el número de nudos representa el número de vitroplantas que se formarán, ya que cada nudo constituye una nueva vitroplanta, se obtiene un coeficiente de variación de 9.97%, resultado satisfactorio el cual demuestra la confiabilidad de los datos; en la figura 16, se observa la cantidad promedio de nudos por genotipos en los que se diferencian seis grupos; de los cuales el genotipo Sacampaya blanco, se encuentra en el primero con un promedio mayor de hasta 9.92 nudos; en el segundo grupo: Imilla roja con 94,42 nudos promedio; los genotipos Ajahuiri negro y Chirimoya están en un tercer grupo con 8.5 y 8 nudos respectivamente; Phiñu rojo, Phitikilla y Phiñu blanco alcanzaron de 7.75 a 6.83 nudos; y finalmente el genotipo Pala roja, con menor número de nudos (como en las anteriores multiplicaciones), este es el genotipo que menor altura y número de nudos alcanzo a obtener; para Frías (2005), las variedades de papa difieren una de otra en la morfología de la planta y la composición química del tubérculo., razón por la cual pudieron obtenerse estas diferencias entre los genotipos evaluados.

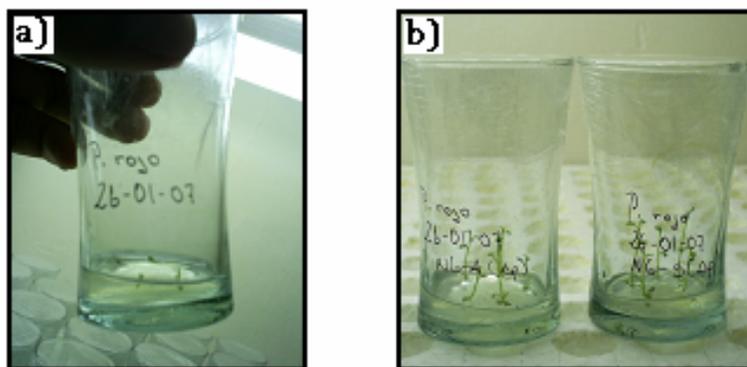


Fig. 17 Tercera multiplicación: a) Genotipo Phiñu rojo al sembrarlo a un nuevo medio; b) Genotipo Phiñu rojo después de los 21 días.

4.2.3.3. Número de raíces

El análisis de varianza para la variable número de raíces en cuadro 8, muestra las diferencias altamente significativas existentes entre genotipos, tal análisis se describe

en la figura 16, con la prueba de medias realizada; expresando también un coeficiente de variación de 21.37%, el cual, esta dentro del parámetro de aceptación según Castañeda, 1995.

La figura 16, muestra además las diferencias explicadas en el cuadro 8, con respecto a las medias generales del número de raíces según los genotipos evaluados; en la misma resaltan cinco grupos diferentes; Imilla roja, obtiene 4.25 raíces promedio como primer grupo; los genotipos: Yaco, Phitikilla Ajahuri negro, Chirimoya y Sacampaya blanco con un promedio de nudos que va de 3.42 a 2.67 raíces; le siguen los genotipos Phiñu rojo, Phiñu negro y Pala roja con promedios de 2.50, 2.25 y 1.83 respectivamente; y al final, a este grupo se asemeja Phiñu blanco, con 1.67 raíces promedio; esto quiere decir que los cuatro últimos genotipos son los que tuvieron cambios en su morfología debido a la última propagación al utilizar esquejes mas pequeños, ya que no todos obtuvieron un número similar de raíces según el rango de evaluación ya descrito en esta etapa, pero el número de raíces es superior a las dos anteriores multiplicaciones.

4.3. Fase de conservación *in vitro*

Para esta etapa, se utilizó el análisis de varianza bifactorial ya definido en base a las variables de respuesta mencionadas con anterioridad y descritas a continuación:

4.3.1. Altura de vitroplanta

Después de las 35 semanas de conservación, se obtuvieron las alturas según los diferentes genotipos en los tres medios de conservación, logrando los siguientes resultados:

Para la variable altura de vitroplanta, según los diez genotipos (Factor A) evaluados, con el respectivo ANVA (Cuadro 9), muestra las diferencias altamente significativas existentes entre genotipos, medios de conservación y su interacción, según la prueba de Tukey al 5% de significancia (Figura 18). El cuadro 9, señala también un coeficiente

de variación de 7.63% resultado satisfactorio que demuestra la confiabilidad de los datos.

Cuadro 9. Análisis de varianza para las variables de respuesta en la fase de conservación, en función a los genotipos y medios de conservación

	Fuentes de variación	GL	SC	CM	Fc	Significancia
ALTURA DE VITROPLANTA	GEN	9	4,534	0,504	44,777	0,000 **
	MED	2	8,921	4,461	396,462	0,000 **
	GEN * MED	18	2,135	0,119	10,54	0,000 **
	Error	270	3,038	0,011		
	Total	299	18.628			
	CV	7,63				
NUMERO DE NUDOS	GEN	9	347,447	38,605	46,216	0,000 **
	MED	2	268,98	134,49	161,004	0,000 **
	GEN * MED	18	229,628	12,757	15,272	0,000 **
	Error	270	225,537	0,835		
	Total	299	1071,592			
	CV	12,5				
NUMERO DE RAICES	GEN	9	347,447	0,563	26,007	0,000 **
	MED	2	268,98	0,938	43,315	0,000 **
	GEN * MED	18	229,628	0,054	2,503	0,001 **
	Error	270	225,537	0,022		
	Total	299	13,766			
	CV	10,16				
NUMERO DE RAICES AEREAS	GEN	9	347,447	1,032	39,144	,000 **
	MED	2	268,98	0,556	21,095	,000 **
	GEN * MED	18	229,628	0,108	4,083	,000 **
	Error	270	225,537	0,026		
	Total	299	19,458			
	CV	10,53				
PRESENCIA DE RAICES MICROTUBERCULOS	GEN	9	2,045	0,227	24,833	,000 **
	MED	2	0,827	0,413	45,188	,000 **
	GEN * MED	18	1,575	0,088	9,562	,000 **
	Error	270	2,471	0,009		
	Total	299	6,918			
	CV	8,98				
VITROPLANTAS CON PRESENCIA DE APICES AMARILLOS	GEN	9	4,039	0,449	6,844	,000 **
	MED	2	0,972	0,486	7,412	,001 **
	GEN * MED	18	7,207	0,4	6,107	,000 **
	Error	270	17,703	0,066		
	Total	299	29,92			
	CV	20,56				
VITROPLANTAS CON PRESENCIA DE BASES AMARILLAS	GEN	9	0,829	0,092	9	,000 **
	MED	2	0,087	0,043	4,248	,015 NS
	GEN * MED	18	0,817	0,045	4,435	,000 **
	Error	270	2,762	0,01		
	Total	299	4,495			
	CV	9,73				

Se puede indicar también según el cuadro 9, y la figura 18, que el efecto de altura es mas afectado por los medios de conservación; afirmación que da también Gómez (2003), al probar cinco diferentes medios de conservación en papas amargas donde proporciona al medio 2 (con 8% sacarosa), una mayor cantidad de sacarosa obteniendo resultados similares.

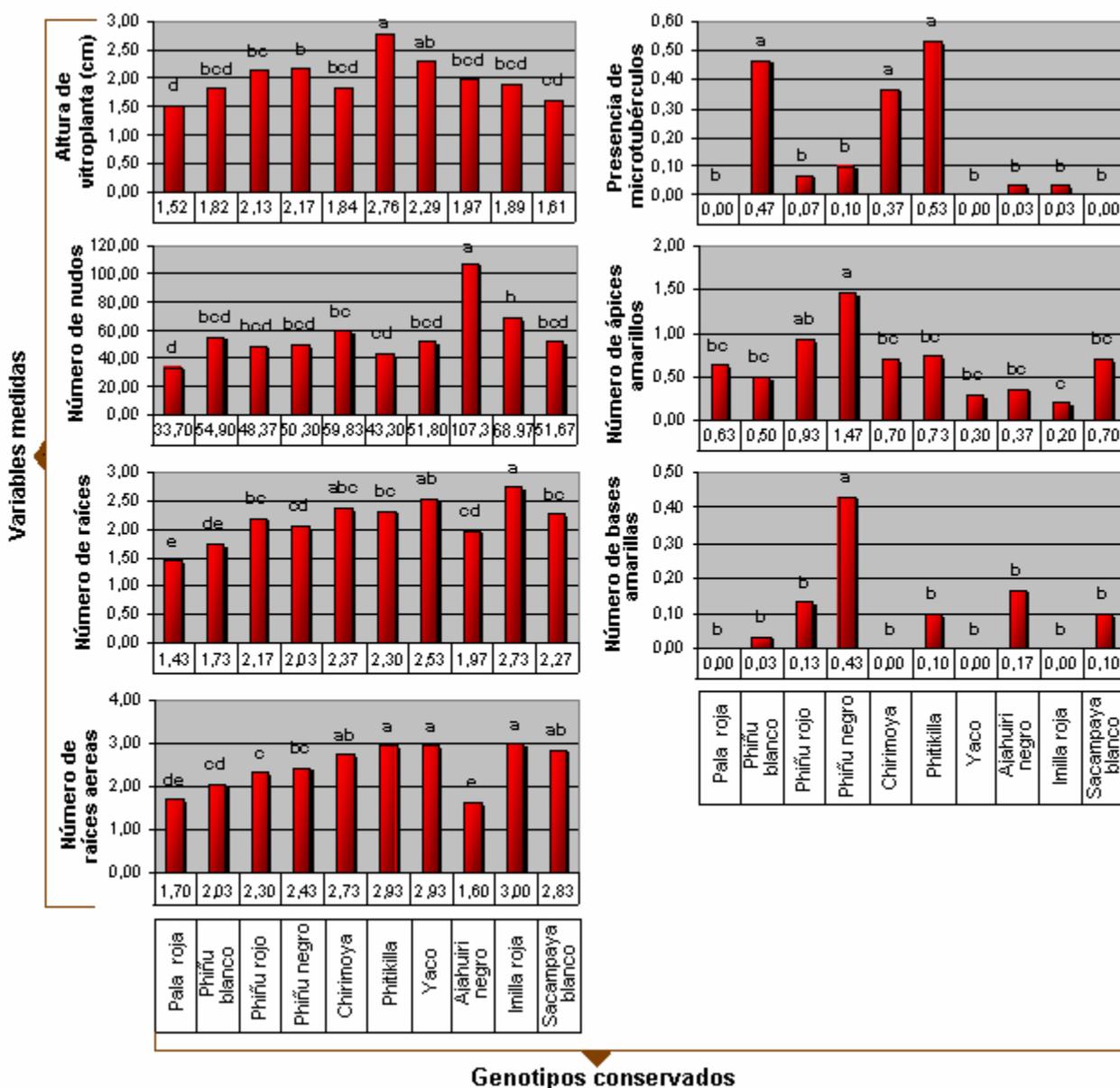


Fig. 18 Comparación de medias Tukey (5%) para las variables de respuesta medidas en función a los genotipos, a los ocho meses de conservación *in vitro*.

La prueba de medias para la variable altura de vitroplanta (figura 18), diferencia a siete grupos de genotipos; de los que Phitikilla, obtiene la mayor altura promedio de hasta 2.76cm; seguido de Yaco con una altura de 2.29cm; Phiñu negro con 2.17cm; en un cuarto grupo Phiñu rojo, con 2.13cm; Ajahuri negro, Imilla roja, Chirimoya, Phiñu blanco y Sacampaya blanco, lograron alturas similares que van de 1.97cm a 1.61cm; y la menor altura obtenida, fue de Pala roja con 1.52cm promedio; al igual que las anteriores multiplicaciones, fue el de menor respuesta a la condición *in vitro*.

La diferencia de estos resultados es evidentemente debido a los genotipos y a factores físicos, biológicos y químicos durante la evaluación, así lo explica Espinoza *et al.*, (1992) “la tasa de crecimiento de la plantas depende de la temperatura de incubación, la composición de los medios y la variedad de la planta, de allí que se requieran para un almacenamiento a largo plazo, modificaciones de los medios y de la temperatura de incubación”.

Como se puede observar también en la figura 19, para la prueba de medias con respecto a los medios de conservación; se destacan tres grupos; en el medio 3 (sacarosa 3%), se obtienen mayores alturas de hasta 2.65cm; a diferencia del medio 2 (sacarosa 1.5%), con alturas de 1.87cm y aún con menores alturas el medio 1 (sacarosa 0.5%), con hasta 1.48cm de altura promedio.

Estos resultados indican que a mayor concentración de sacarosa entonces mayor altura o desarrollo; así lo señala Espinoza *et al.*, (1992) “para la conservación se utiliza el medio E (Sacarosa 2%, Sorbitol 4% y Agar 0.8%) que reduce la tasa de crecimiento por la alta presión osmótica”; sin embargo, en el presente trabajo se observó que a mayor concentración de sacarosa hubo mayor altura; esto con respecto a los genotipos evaluados. Por su parte Roca, Roosevelt y Mafla (1992), mencionan que la limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica posiblemente se debe a la reducción de la absorción de agua y de nutrimentos del medio. Siendo altamente metabolizable, la sucrosa puede actuar osmóticamente en concentraciones altas.

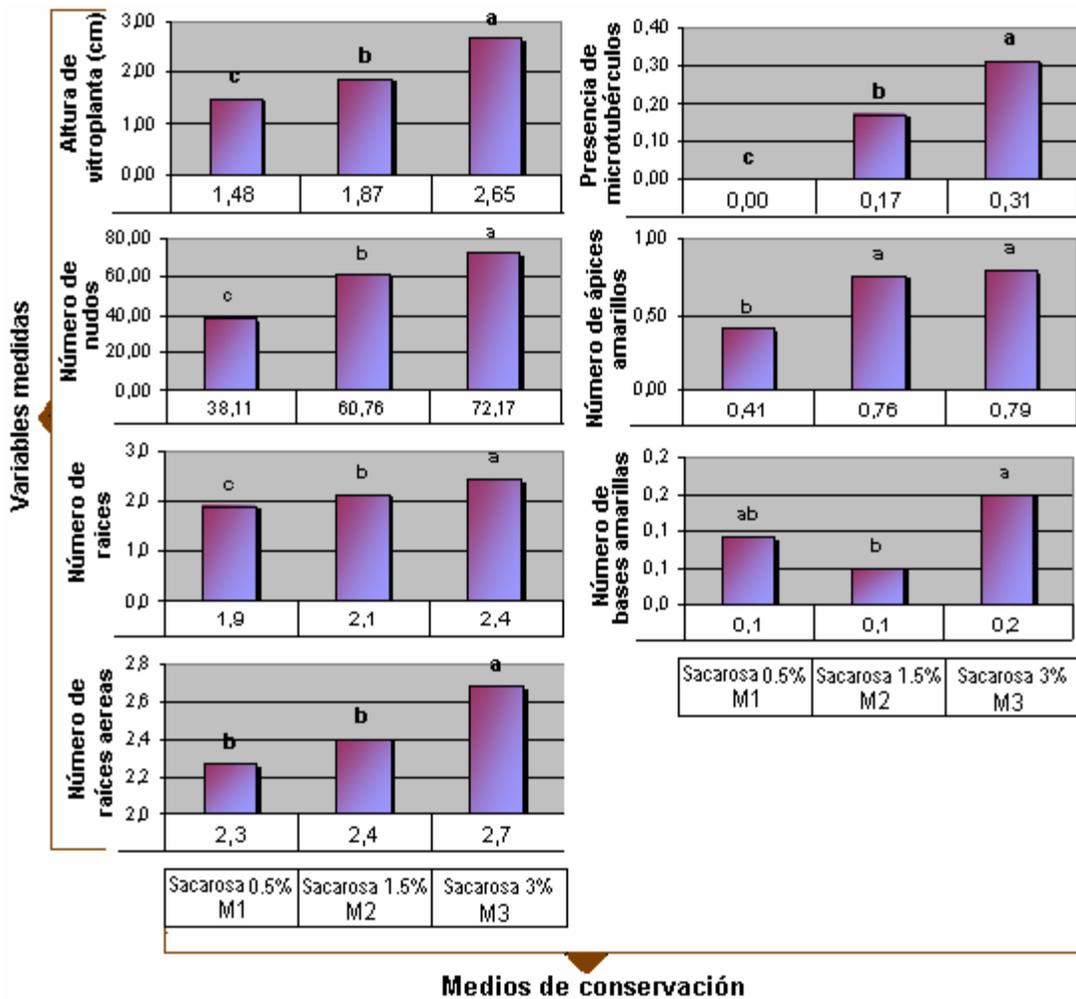


Fig. 19 Comparación de medias Tukey (5%) para las variables de respuesta medidas en función a los medios de conservación *in vitro* (datos tomados a los ocho meses)

4.3.2. Número de nudos

En conservación *in vitro*, otra variable de respuesta fue número de nudos, la misma que se explica a continuación, con el análisis de varianza realizado (cuadro 9) y la prueba de medias, tanto de genotipos (figura 18), como de los medios de conservación (figura 19).

El análisis de varianza para la variable número de nudos (cuadro 9), expone las diferencias altamente significativas existentes entre genotipos (Factor A), medios de

conservación (Factor B) y la interacción de ambos, con un coeficiente de variación del 12.5% que es inferior al 30 %, demostrando la confiabilidad de los datos.

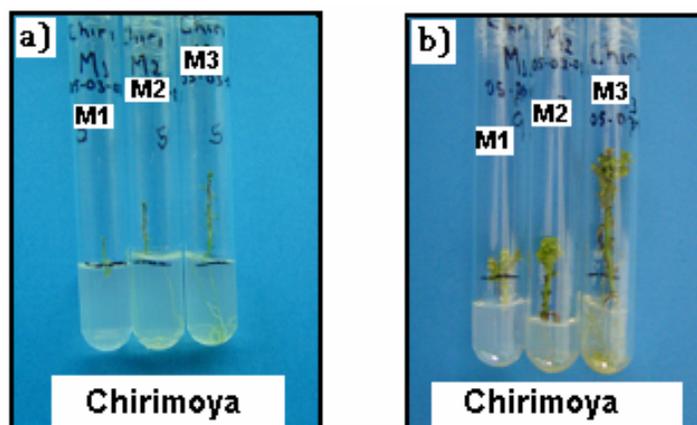


Fig. 20 Genotipo Chirimoya en los tres diferentes medios de conservación; a) después de tres meses de conservación; b) después de ocho meses de conservación

La prueba de medias realizada (figura 18) para genotipos con respecto al número de nudos muestra seis grupos: el genotipo Ajahuiri negro, es el que logró 107.3 nudos; este resultado se debe a que este genotipo presentó un número elevado de yemas laterales como se muestra en la figura 21 y como en todo medio de conservación, las vitroplantas tienen menor altura y mayor número de nudos, debido al estrés ocasionado por el estresante osmótico (Manitol), por lo que los nudos son más próximos entre sí; así lo describen Roca, Roosevelt y Mafla (1992), “los agentes osmóticos no metabolizables como el manitol y sorbitol posiblemente sean más efectivos que la sucrosa en la limitación de crecimiento de los cultivos”; como segundo grupo el genotipo Imilla roja con 68.97 nudos, el mismo que también presentó mayor ramificación; seguidamente en tercer lugar Chirimoya con 59.83 nudos; un cuarto grupo lo comprenden Phiñu blanco, Sacampaya blanco, Yaco, Phiñu negro y Phiñu rojo, con promedio de nudos que van de 54.9 a 48.37; les sigue Phitikilla, que si bien obtuvo la mayor altura, la distancia entre nudos en este genotipo fue también mayor, además de obtener menor número de yemas laterales (Fig. 21); y finalmente el genotipo Pala roja con el menor número de nudos promedio obtenido de 33,7 (Fig.21).

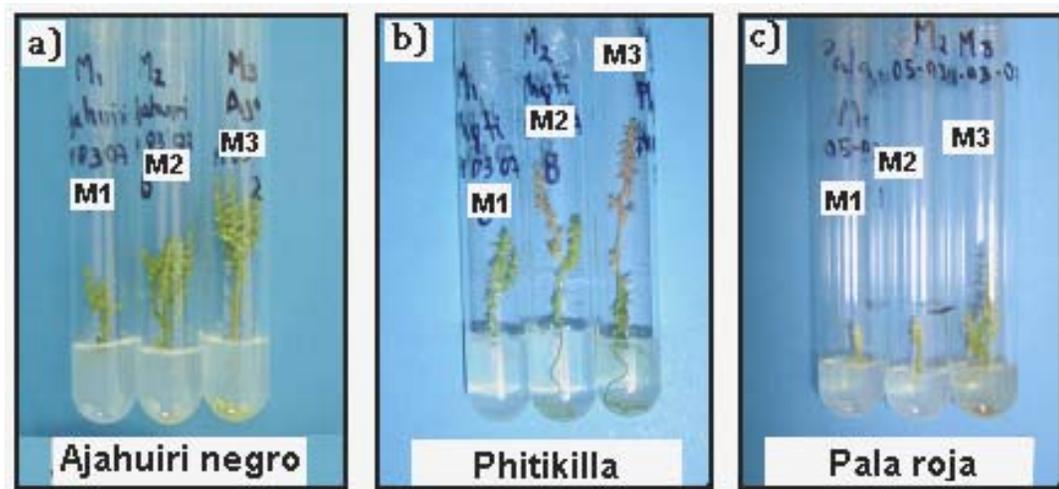


Fig. 21 Genotipos con mayor y menor número de nudos promedio después de ocho meses de conservación: a) Ajahuiri negro; b) Phitikilla; c) Pala roja

Según Huanca (2002), el número de nudos guarda relación con las plantas en crecimiento normal, es decir que el número de nudos incrementa según la longitud de las vitroplantas; con la diferencia de que en las vitroplantas con menor longitud, el entrenudo es mas corto; y en las vitroplantas con mayor longitud los entrenudos son mas largos. Estos resultados son obtenidos también con los genotipos evaluados (Fig. 21), en la que se observa al genotipo Phitikilla con una mayor altura y nudos mas largos; a diferencia de los genotipos Ajahuiri negro y Pala roja con nudos mas próximos.

El número de nudos obtenido con respecto a los medios de conservación, se expone en la figura 19, donde se diferencian tres grupos diferentes; como primer grupo esta el medio 3 (sacarosa 3%), con un promedio de 72.17 nudos; en un segundo grupo el medio 2 (sacarosa 1.5 %), con 60,76 nudos; y en último lugar el tratamiento 1 (sacarosa 0.5%), con un promedio de 38,11 nudos; es evidente que a mayor concentración de sacarosa, existen mayores nudos en las vitroplantas (Figura 21), así lo explica también Espinoza *et al.*, (1992) afirmando que la alta presión osmótica produce entrenudos cortos, razón por la cual en el presente trabajo los genotipos obtuvieron yemas laterales y entrenudos muy cortos, obteniendo estos resultados.

4.3.3. Número de raíces

Es otra variable de respuesta morfológica, la misma que con la prueba de Tukey al 5% de significancia, se pudo obtener los resultados que se muestran a continuación.

El análisis de varianza para los genotipos evaluados (Factor A), medios de conservación (Factor B) y la interacción de ambos (A*B), muestra que existen diferencias altamente significativas en los tres casos, resultados que se observan con mas detalle en el cuadro 9, el mismo muestra también el coeficiente de variación con un porcentaje inferior al 30 % que es de 10.2%, demostrando su confiabilidad.

En la figura 18, se observan las diferencias existentes entre genotipos; apreciando siete grupos; de ellos Imilla roja, es el que mayor número de raíces obtuvo en esta etapa (2.73); en un segundo grupo está Yaco con 2.53 raíces; le sigue Chirimoya (con 2.37 raíces); similar resultado lograron los genotipos Phitikilla, Sacampaya blanco y Phiñu rojo, con 2.30, 2.27, 2.17 raíces respectivamente; en quinto lugar están Phiñu negro y Ajahuri negro, con 2.03 y 1.97 raíces individualmente; los genotipos Phiñu blanco (1.73 raíces) y Pala roja (1.43 raíces), son los de menor número o casi ausencia de esta; en el caso de Pala roja por ejemplo (Fig. 22). Estos son resultados razonables por obtener también menores alturas y número de nudos, por lo que su respuesta debería ser similar; Roca, Roosevelt y Mafla (1992), contribuyen explicando que los materiales en conservación, deben mantener hojas y tallos verdes y las raíces con crecimiento normal.

En cuanto al número de raíces obtenido con respecto a los medios de conservación, según los parámetros de medición aplicados y evaluados a las 35 semanas después de su multiplicación (fig. 19), se puede notar que existen tres grupos estadísticamente diferentes; el primer grupo esta conformado por el medio 3 (sacarosa 3%), con 2.4 raíces promedio; le sigue el medio 2 (sacarosa 1.5%), con 2.1 raíces; y finalmente el medio 1 (sacarosa 0.5%), con 1.9 raíces; estos resultados demuestran la existencia de pocas raíces en los medios propuestos.

Es evidente que a menor concentración de sacarosa el número de raíces también es menor, tal como lo describen Roca, Roosevelt y Mafla (1992) “una forma de reducir el crecimiento de los cultivos es privándolo de ciertos nutrimentos inorgánicos y/o orgánicos”. El balance nitrógeno/carbono en el medio tiende a favorecer el crecimiento de tallos o raíces, lo cual depende de que sea alto o bajo respectivamente; por su parte Jimenes (1995), afirma que la adición de sacarosa al medio de cultivo estimula la formación de raíces y se ha visto que hay una mejor adaptación de las plantas cultivadas in vitro al ambiente.

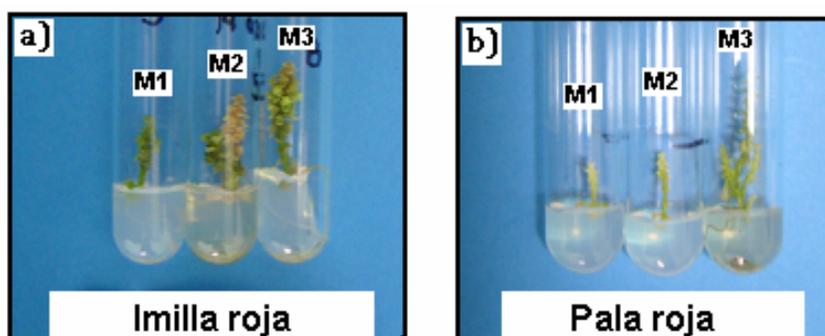


Fig. 22 Genotipos que obtuvieron el mayor y menor número de raíces promedio después de los ocho meses de conservación: a) Imilla roja; b) Pala roja

4.3.4. Número de raíces aéreas

Es otra variable de respuesta morfológica que se manifiesta de forma diferente en los genotipos evaluados, estos resultados fueron obtenidos con la prueba de significancia de Tukey al 5%, los mismos que se describe en el cuadro 9 y las figuras 18 y 19.

Los resultados para el análisis de varianza para el Factor A (genotipos) muestra que existen diferencias altamente significativas entre estos, también el Factor B (medios de conservación) muestran las mismas diferencias, entonces la interacción será también altamente significativa, manifestando un coeficiente de variación de 10.5% demostrando que los datos son confiables (Cuadro 9).

La figura 18, diferencia siete grupos; los genotipos Imilla roja (Fig. 23), Yaco y Phitikilla, según los rangos tomados, presentan una mayor presencia de raíces aéreas; los genotipos Sacampaya blanco, Chirimoya, Phiñu negro, Phiñu rojo y Phiñu blanco, obtuvieron regular número de raíces aéreas; y finalmente los genotipos con menor número de raíces aéreas fueron Pala roja y Ajahuiri negro.



Fig. 23 Genotipo Imilla roja, que obtuvo mayor número de raíces aéreas en los diferentes medios de conservación

La figura 19, muestra el número de raíces aéreas promedio obtenido en los tres medios de conservación, la misma destaca dos grupos diferentes; el medio 3 (sacarosa 3%), con 2.7 es el que representa un mayor número de raíces aéreas promedio; seguidamente los medios 2 y 1 (sacarosa 1.5% y 0.5%), con menores resultados; demostrando que a mayor porcentaje de sacarosa, mayor incidencia de raíces aéreas; según Gómez (2003), la presencia de raíces aéreas no representa una señal de que las vitroplantas se mantengan bien conservadas, mas al contrario, su abundancia dificulta en gran medida otras evaluaciones, así también Cadima (1996), menciona que las raíces aéreas perjudican al momento de transferir el explante al cultivo fresco, afirmando que en una planta *in vitro* se busca que tenga poco o nada de raíces aéreas.

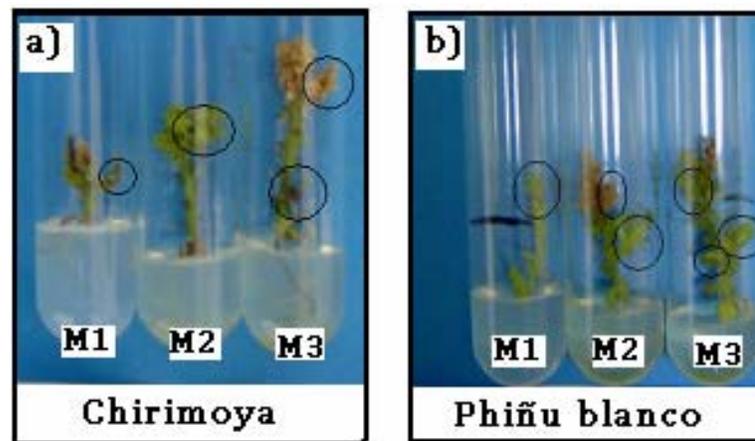
En el presente estudio se observó que los genotipos tuvieron una mayor presencia de raíces aéreas al proporcionarle mayor cantidad de sacarosa al medio, pero al pasar a medio fresco los explantes conservados, no tuvieron problema en cuanto a su desarrollo al ser pasados a un nuevo medio (refrescamiento), estos resultados se

pueden observar en las figura 27,28 y 29, donde se ven los resultados obtenidos después de realizar la prueba de viabilidad de cada genotipo.

4.3.5. Presencia de microtubérculos

Esta variable de respuesta, se la midió a simple vista, contando los microtubérculos que estuvieran presentes en las vitroplantas; cada microtubérculo, se formo a partir de cada yema lateral, obteniendo los siguientes resultados.

El análisis de varianza para la variable formación de microtubérculos en las vitroplantas conservadas detalladas en el cuadro 9, indica que existen diferencias altamente significativas entre genotipos (Factor A), medios de conservación (Factor B) y la interacción de ambos (A*B); mostrando un coeficiente de variación de 8.9 % demostrando así la confiabilidad de los datos.



**Fig. 24 Presencia de microtubérculos en los medios de conservación:
a) Chirimoya; b) Phiñu blanco**

La figura 18, en base a la prueba de medias (con respecto a los genotipos), manifiesta dos grupos diferentes; los genotipos Phitikilla, Phiñu blanco y Chirimoya con 0.53, 0.47 y 0.37 microtubérculos respectivamente, conforman el primer grupo estadístico; los genotipos Phiñu negro, Phiñu rojo, Ajahuiri negro, Imilla roja, Sacampaya blanco, Pala roja y Yaco, con promedios inferiores a 0.1 conforman el segundo grupo; en realidad

estos resultados confirman la ausencia de microtubérculos en las vitroplantas conservadas, según los parámetros de medición. Aún obteniendo estos resultados, la figura 24 muestra los genotipos en los cuales se observaron microtubérculos.

En la figura 19, se observan tres grupos diferentes; de los cuales el medio en el que mayor número obtuvo es el medio 3 (sacarosa 3%) con 0.31; seguidamente con 0.17 microtubérculos está el medio 2 (sacarosa 1.5%); y finalmente el medio 1 (sacarosa 0.5%) con cero, estos resultados también demuestran la ausencia de microtubérculos según los parámetros de medición; similar resultado obtuvo Gómez (2003), cuando formuló mayor cantidad de sacarosa al medio (4% sacarosa+3ml/l AAS) y (8% de sacarosa) y aplicando una menor cantidad, obtuvo también menor número de microtubérculos (sacarosa 3% +manitol 4%) y (Sacarosa 1% + 5 mg/l AAS); asimismo Cadima (1996), explica que los microtubérculos no dificultan en las evaluaciones ni en las transferencias a medio fresco, por lo que considera que no es una variable para determinar el medio más adecuado de la conservación *in vitro*.

4.3.6. Número de vitroplantas con presencia de ápices amarillos

Después de los ocho meses de conservación de los genotipos en los diferentes medios de conservación, se pudo observar que los ápices de las vitroplantas llegaban a obtener una coloración amarillenta, lo que podría significar la pérdida de viabilidad; se obtuvieron los siguientes resultados.

El ANVA para la variable de respuesta amarillamiento apical (Cuadro 9), expone las diferencias altamente significativas que existen entre genotipos (Factor A), medios de conservación (Factor B) y su interacción (A*B), las mismas que se detallan en las figuras 18 y 19 con la prueba de significancia de Tukey al 5%.

La figura 18, señala cuatro grupos diferentes según la prueba de medias realizada; el primero, lo conforma el genotipo Phiñu negro, que presentó un mayor número de ápices amarillos de hasta 1.47 (muy pocos según los parámetros de evaluación); el genotipo Phiñu rojo alcanzó 0.93 ápices amarillos conformando así el segundo grupo estadístico;

el genotipo Imilla roja, es el que menor número de ápices amarillos presentó de 0.20 (según el parámetro de evaluación nulo); y los genotipos restantes obtuvieron similar respuesta de 0.73 a 0.30 ápices amarillos. Según Roca, Roosevelt y Mafla (1992), “Cuando el tejido adquiere un color amarillento y/o marrón, pero aún conserva las yemas axilares verdes, se debe proceder al subcultivo en medio fresco”. Esto quiere decir que los genotipos que mayor número de ápices amarillos presentaron, serán menos viables al realizar las pruebas de regeneración (figs. 27,28 y 29).

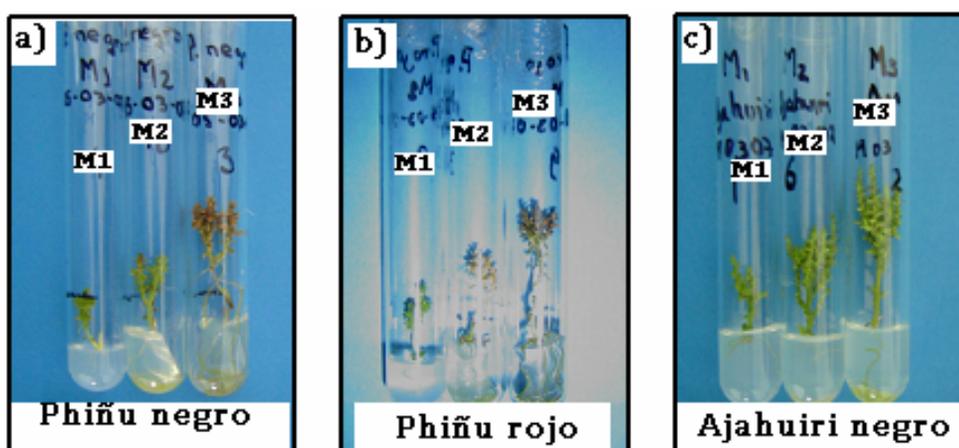


Fig. 25 Vitroplantas de los genotipos que obtuvieron mayor y menor número de ápices amarillos después de los ocho meses de conservación

En cuanto a la presencia de ápices amarillos en los diferentes medios de conservación, se pudo observar (fig.19) dos grupos diferentes, de los cuales el primer grupo lo conforman el medio 3 y 2 (sacarosa 3% y 1.5%) con 0.79 y 0.76 ápices amarillos respectivamente; y el medio 1 (sacarosa 0.5 %) con 0.41 ápices amarillos, demostrando así el retardo de la madurez fisiológica en este último, resultado que es satisfactorio, pues se demuestra que las vitroplantas permaneces aún viables.

4.3.7. Número de vitroplantas con presencia de bases amarillas

Al presentarse el amarillamiento en los ápices durante la etapa de conservación *in vitro*, se pudo notar también el amarillamiento de las bases de cada vitroplanta evaluada (fig. 26), teniendo los siguientes resultados.

El ANVA para la variable amarillamiento basal (Cuadro 9), señala que existen diferencias altamente significativas entre genotipos (Factor A) y no así entre los medios de conservación (factor B), dando como resultado de su interacción resultados altamente significativos, mostrando además un coeficiente de variación de 9.8% demostrando de este modo la confiabilidad de los datos.

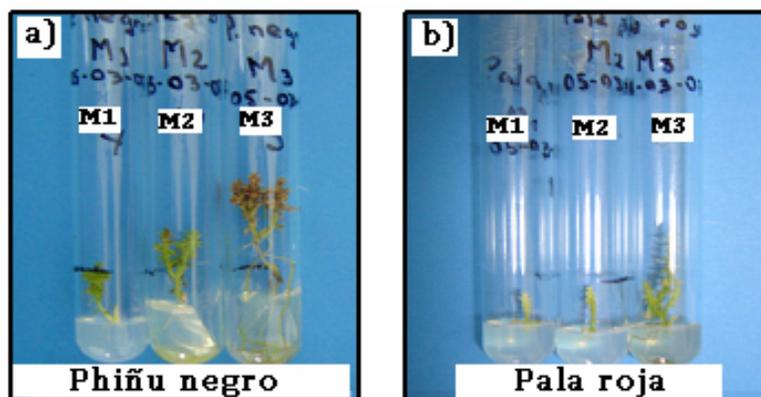


Fig. 26 Vitroplantas de los genotipos: a) Piñu negro (con mayor número de bases amarillas) y b) Pala roja (con ausencia de bases amarillas)

La figura 18, muestra las diferencias encontradas entre genotipos; la misma, señala dos grupos; el genotipo Piñu negro (Fig.26), con 0.43, y con resultados menores de 0.17 hasta 0.03 como en el caso de los genotipos Piñu blanco, Sacampaya blanco, Piñu rojo, Phitikilla y Ajahuiri negro conformando un segundo grupo; pero los genotipos Pala roja, Chirimoya, Yaco e Imilla roja, no presentaron por el resultado, bases amarillas durante el tiempo de conservación. Para Roca, Roosevelt y Mafla (1992), “Los cultivos deben renovarse cuando estén totalmente defoliados o se inicie la formación de una zona de abscisión entre el tallo y la raíz”. Los resultados obtenidos con respecto a esta variable según los parámetros utilizados, afirman que no existen vitroplantas con bases amarillas, pero los genotipos que las presentan (aún sea en menor grado) se observan en la fig. 26.

El número de bases amarillas promedio por genotipo con respecto a los medios de conservación (fig.19), señala tres grupos diferentes estadísticamente, en los que el medio 3 (sacarosa 3%), alcanzó un resultado de 0.2 bases amarillas; el medio 1

(sacarosa 0.5%), obtiene 0.1 y finalmente en un tercer grupo esta el medio 2 (sacarosa 1.5%), también con 0.1 demostrando la ausencia de bases amarillas según los parámetros de evaluación ya descritos.

4.4. Viabilidad de plántulas conservadas *in vitro*

Se realizaron las pruebas de viabilidad de las vitroplantas después de ser pasadas a un medio fresco a los cuatro, seis y ocho meses (durante y después de la conservación), para ver el porcentaje de supervivencia (Viabilidad), ante los tratamientos con los medios de conservación durante el largo tiempo que fueron evaluados.

Para una mejor interpretación de los datos, se realizó una prueba de medias y significancia de Tukey al 5% con resultados de cada medio de conservación; para lo cual, se tomó en cuenta la variable de respuesta: Altura de vitroplanta (Figuras: 27, 28, 29 y 30), la misma que se obtuvo durante el tiempo de evaluación (cuatro semanas), y serán detalladas en las siguientes figuras, dando un resumen de los resultados más considerables.

4.4.1. Altura de vitroplanta

Para esta variable se desglosó en tres figuras los resultados obtenidos a los cuatro, seis y ocho meses (figuras 27, 28 y 29) para tener el detalle de su respuesta después de someter a las vitroplantas a los diferentes medios de conservación (cuadro 1) en cuanto a la altura de vitroplantas después de un mes de su regeneración.

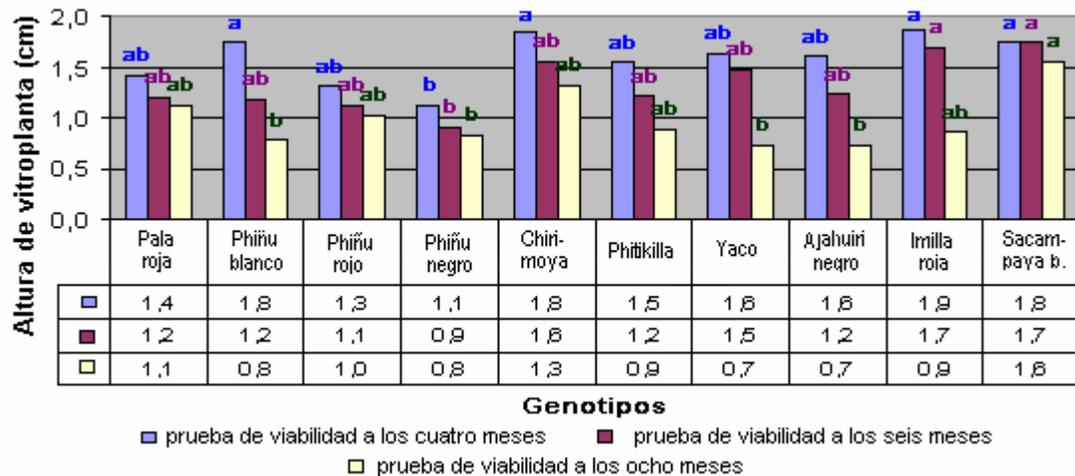


Fig. 27 Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los genotipos evaluados resultado del medio 1(Sacarosa 0.5%)

La figura 27, muestra que los genotipos sometidos a los tres medios de conservación en general, responden satisfactoriamente al medio de regeneración, ya que obtienen después de un mes de evaluación resultados superiores (como en el caso de los genotipos Yaco y Ajahuri negro) a 0.7cm, lo que señala que aún son viables.

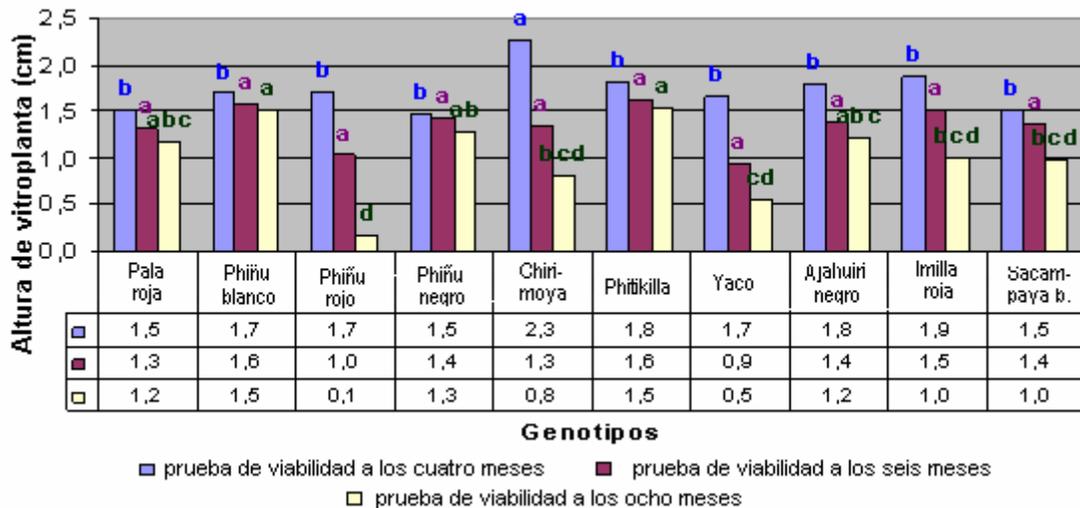


Fig. 28 Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los genotipos evaluados resultado del medio 2 (Sacarosa 1.5%)

La figura 28, muestra los resultados obtenidos en las tres ocasiones de regeneración de vitroplantas de los diferentes genotipos (después de un mes de evaluación); se observa en la misma que el genotipo Phiñu rojo no responde al medio fresco cuando se realiza la prueba de viabilidad a los ocho meses; pero sí responde hasta los seis meses de ser conservados; se puede notar también que el genotipo Yaco tiene poca respuesta como en el anterior caso. Los demás genotipos responden satisfactoriamente a la prueba de viabilidad hasta los ocho meses de conservación cuando son derivados del medio 2 (Sacarosa 1.5%); Roca, Roosevelt y Mafla (1992), obtuvieron resultados similares al trabajar en la conservación de yuca, sometiendo a las vitroplantas a bajas concentraciones de sucrosa y reduciendo la temperatura. En el trabajo de investigación realizado, no se realizaron variaciones de temperatura, para apreciar de mejor manera la respuesta de los genotipos ante la conservación *in vitro* variando los niveles de sacarosa.

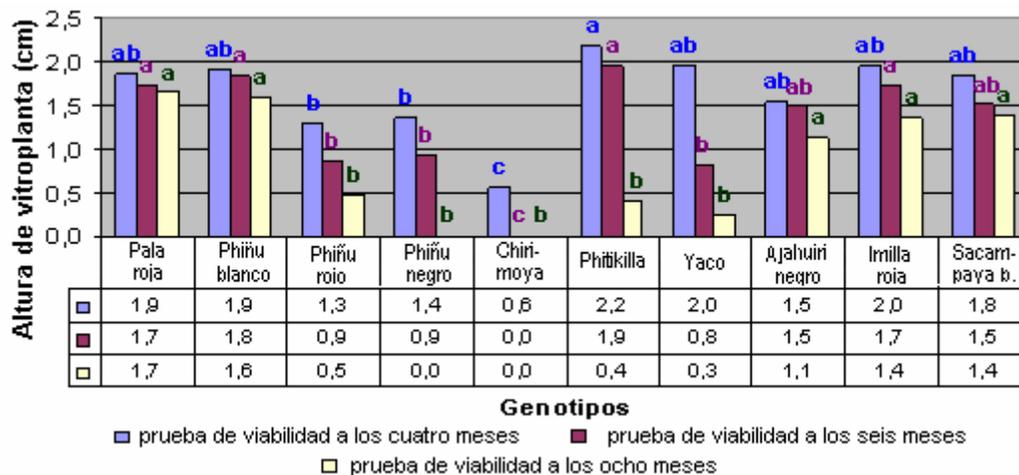


Fig. 29 Altura promedio de vitroplantas en medios frescos (después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación) con respecto a los genotipos evaluados resultado del medio 3 (Sacarosa 3%)

La figura 29 muestra las pruebas de viabilidad realizadas cuando son resultado medio 3 (Sacarosa 3%); la misma señala que a partir de los ocho meses de conservación existe una menor respuesta de las vitroplantas; tal es el caso de los genotipos: Chirimoya, Yaco, Phitikilla, Phiñu negro y Phiñu rojo, que después de los ocho meses de conservación no llegaron a desarrollar al someterlos al tercer medio de conservación

(sacarosa 3 %), y en el caso del genotipo Chirimoya específicamente, a partir del sexto mes es que no tiene respuesta de ser viable cuando es sometido al tercer medio de conservación.

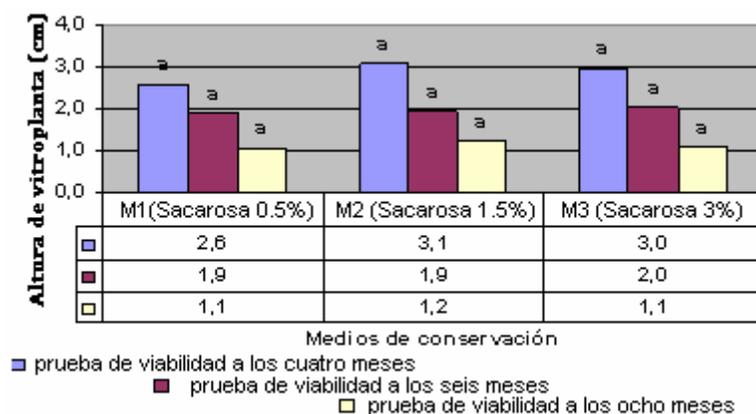


Fig. 30 Altura de vitroplantas en medios frescos, después de los cuatro, seis y ocho meses de conservación con respecto a los medios de conservación.

La figura 30, explica que los resultados de la regeneración con respecto a la altura de vitroplantas, son mayores cuando son conservadas en una concentración con 1.5 % de sacarosa (Medio 2), pero de manera general los tres medios de conservación son aconsejables hasta los 8 meses después; Roca y Mroginski (1991), informan que la colección de clones de papa del CIP almacenó *in vitro*, sin ninguna transferencia y durante un año (con 22-25°C de temperatura, 3000 lux de iluminación y 16 h de fotoperíodo) en un medio que contenía 4% de manitol y 0.5% de sacarosa.

Los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad observando el desarrollo de las vitroplantas llevados a nuevos medios con respecto a la altura (Figs. 27, 28 y 29), denotan que a mayor tiempo de conservación, la viabilidad es menor; y a mayor concentración de sacarosa adicionada al medio de conservación, tendrán una respuesta similar.

Los genotipos que tuvieron una respuesta satisfactoria después de ocho meses fueron: Pala roja, Phiñu blanco, Ajahuiri negro, Imilla roja y Sacampaya blanco, con resultados superiores a 1.1 m de altura después de un mes de evaluación.

V. CONCLUSIONES

- Los genotipos de papa estudiados, obtuvieron porcentajes de supervivencia superiores a 83.33%, logrando establecerse satisfactoriamente *in vitro*.
- Se obtuvieron resultados satisfactorios en cuando a la altura de vitroplantas (con resultados de hasta 2.28 cm obtenido por el genotipo Phiñu negro), número de nudos y número de raíces en la fase de establecimiento *in vitro*.
- En la fase de multiplicación, los resultados fueron satisfactorios, pues, los genotipos en la primera multiplicación lograron alcanzar después de 21 días de evaluación, entre 6 a 11 nudos promedio, con alturas de 2.6cm a 4.5cm; y entre 6 a 8 nudos promedio en la segunda multiplicación, con alturas de 2.3cm a 4.6cm; y en la tercera multiplicación, el promedio de nudos va de 6 a 10, con altura promedio de 2.5cm a 4.7 cm.
- En la etapa de conservación, las vitroplantas retardan su crecimiento al proporcionarle manitol y una menor cantidad de sacarosa (0.5 %), dando como resultado un desarrollo morfológico menor a diferencia de la adición de mayores concentraciones (2.5% y 3%), que muestran un mayor desarrollo de las mismas; las concentraciones de sacarosa al aumentan el desarrollo de las vitroplantas, como en el caso de los genotipos Phitikilla y Yaco con alturas de 2.76 y 2.29cm respectivamente.
- El mayor número de raíces lo obtuvo el genotipo Imilla roja (2.73 raíces), y el menor número Pala roja (1.43 raíces); hubo mayor ocurrencia de raíces aéreas en los genotipos: Imilla roja, Yaco y Phitikilla (de 3 a 2.93 raíces aéreas) y con menor resultado los genotipos Ajahuri negro y Pala roja (1.6 y 1.7 raíces aéreas).
- Hubo mayor presencia de microtubérculos en los genotipos Phitikilla, Phinu blanco y Chirimoya y una ausencia notable en los genotipos Sacampaya blanco, Yaco y pala roja; señalando una mayor presencia de estos en el tercer medio de conservación (Sacarosa 3%); las vitroplantas de los genotipos Phiñu negro y rojo

mostraron mayores ápices amarillos a diferencia de los demás genotipos; la mayor ocurrencia de bases amarillas se presentó en el genotipo Phiñu negro; como resultado del medio 3 (Sacarosa 3%).

- Cabe resaltar que el medio 3 (sacarosa 3%) y 2 (sacarosa 1.5%), provocan un mayor desarrollo morfológico, por tanto, menor posibilidad de conservar los genotipos por un mayor tiempo; y el medio 1(sacarosa 0.5%), ayuda a que el tiempo de conservación sea mayor, pues el desarrollo morfológico es menor.
- Respecto a las pruebas de viabilidad, los explantes se mantuvieron viables a los cuatro, seis y ocho meses cuando son resultado del primer medio de conservación (Sacarosa 0.5%); cuando son sometidos al medio 2 (Sacarosa 1.5%), la respuesta es satisfactoria en las tres ocasiones de refrescamiento; el genotipo Phiñu rojo a los ocho meses ya no tiene respuesta; y finalmente como resultado del tercer medio (Sacarosa 3%), todos los genotipos respondieron hasta los cuatro meses, mas al contrario cuando se realiza una nueva prueba a los seis meses, el genotipo Chirimoya no responde a la prueba de viabilidad, y después de seis meses se suman a este, los genotipos Phiñu negro, Yaco, Phitikilla y Phiñu rojo.
- Finalmente, los genotipos: Pala roja, Phiñu blanco, Ajahuri negro e Imilla roja, son los que tienen una respuesta satisfactoria a los tres medios de conservación sugeridos; a diferencia de Phiñu rojo, Phiñu negro, Phitikilla y Yaco que tienen respuesta hasta el sexto mes; y el genotipo Chirimoya que es considerado el que no resiste la conservación, ya que a los cuatro meses obtiene una menor respuesta. Estos resultados fueron obtenidos con respecto al medio 3 (sacarosa 3%), puesto que cuando se emplean los medios 1(sacarosa 0.5%) y 2 (sacarosa 1.5%) aún existe viabilidad en las vitroplantas.

VI. RECOMENDACIONES

- Tanto para los medios de introducción, multiplicación y refrescamiento, se podría recomendar que no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento, pues obtienen resultados favorables en cortos tiempos de evaluación simplemente con el medio MS, la adición de sacarosa, agente de soporte y un pH de 5.7; esto con respecto a los diez genotipos evaluados.
- Para someter a condiciones de conservación *in vitro* a diferentes especies, es recomendable trabajar con material prebásico en el caso de la papa, para obtener resultados satisfactorios.
- Realizar una nueva prueba con los genotipos estudiados concentraciones de sacarosa inferiores a 0.5 % y por un mayor tiempo de conservación.
- Es recomendable pasar la vitroplantas regeneradas en laboratorio (de *in vitro* a *in vivo*), para tener su respuesta morfológica en campo después de los métodos de conservación proporcionados.
- Se recomienda trabajar con porcentajes de sacarosa menores a 1.5 % para el genotipo Chirimoya a manera de obtener resultados en pruebas de regeneración de vitroplantas.
- Realizar trabajos de investigación referidos a métodos de conservación *in vitro* con otras variedades comerciales de papa, y de otros cultivos de importancia económica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Antón, L. 1997. La producción, consumo e importancia de la papa (Perú).

Monografías.com S.A. Disponible en:

<http://www.monografias.com/trabajos51/produccion-papa/produccion-papa.shtml>

(Último acceso 10 - enero -2008).La Paz, Bolivia.

Barba, A. Luna, B. y Romero J. 2001. Micropropagación de plantas. Ed Trillas. México. Primera edición. 15-58 p.

Cadmo, R. Villalobos, V. 1990. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación). Roma, Italia. 105 p.

Cadima, F. X. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de papa y otros tubérculos andinos. Tesis Ing. Agronómica. UMSS, Facultad de ciencias Agrícolas y Pecuarias. Cochabamba, Bolivia. p 78.

Cahuana, R. Arcos, J. 1993. Variedades de papa mas importantes en puno y lineamientos para su caracterización. CONVENIO: PELT/INADE-IC/COTESU. Programa interinstitucional de waru-waru. Primera edición. Puno, Perú. 57 p.

Calzada, J. 1982. Métodos Estadísticos Para la Investigación. 5ta edición. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima, Perú. 60 p.

Castañeda, P. 1995. Bioestadística Aplicada. Agronomía-Biología-Química. Ed. Trillas. México, D. F. 214 p.

Espinoza, N. et al., 1992. Cultivo de tejidos: Micropropagación; Conservación y exportaron de germoplasma de papa. Guías de investigación CIP. Lima, Perú. s.e.

Esquinas, J. 1983. Los recursos fitogenéticos: una inversión segura para el futuro. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España. 120 p.

- Estrada, N.** 2000. La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA. Bolivia.
- FAO.** 1990. Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Editorial Cadmio. Naciones Unidas. Roma, Italia. 3-41 p.
- Fundación PROINPA.** 2000. Características de la Cadena Agroalimentaria de la papa y su industrialización en Bolivia. PROINPA. La Paz, Bolivia.
- Frías, M.** 2005. Evaluación de tres tipos de cobertores en fase de aclimatación de plántulas de origen *in vitro* en la producción de semilla de papa prebásica (*Solanum tuberosum* spp. andígena y *Solanum x jusepzuickii*). Tesis Ing. Agronómica. UMSA, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 92 p.
- Gómez, E.** 2003. Adaptabilidad de cinco variedades de papas amargas (*Solanum juzepczukii* Back.) en diferentes medios de introducción y conservación *in vitro*. Tesis Ing. Agronómica. UMSA, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 84 p.
- Hartmann, H. Kester, D.** 1999. Propagación de plantas. Principios y prácticas. México. Séptima pre-impresión. Compañía editorial continental S.A. de C.V. México. 647-657-740 p.
- Hawques J.** 1997. La evolución de las papas cultivadas en Bolivia. Universidad de Birmingham. Inglaterra.
- Huaman, Z.** 1983. Botánica sistemática, identificación, distribución y evolución de la papa cultivada. Centro internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 67 p.
- Hurk, A.** 2000. Complementariedad entre la conservación *ex-situ* e *in-situ*. Memorias de la segunda reunión Boliviana recurso filogenéticos de cultivos nativos. Cbba., Bolivia. 64 p.
- Hurtado, M.** 1990. Catálogo de descriptores para el cultivo de la papa. Roma, Italia.

- Hurtado, D. Merino, M.** 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. D. F. 71-48; 79-135; 166 p.
- Ibáñez, D.** 2000. Limpieza viral y conservación de germoplasma *in vitro* de papas amargas y dulces del altiplano Norte y Central del Departamento de La Paz. Tesis de grado. Facultad de Agronomía. UMSA. La Paz, Bolivia. 87 p.
- Izquierdo, J.** 1995. Biotecnología Apropiable. Red Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal REDBIO. Oficina Regional de FAO para América Latina y el Caribe. Santiago-Chile.
- Jimenes, G.** 1998. Cultivo de ápices y meristemos. Propagaron y mejora genética de plantas por Biotecnología. Ed. por J.N. Pérez Ponce. 45-56 p.
- KURMI SRL.** 1996. Estimación del comportamiento de la demanda y oferta de papa-consumo en los principales centros de consumo y abastecimiento de la ciudad de La Paz. Tomo I. Consejo regional de semillas. La Paz, Bolivia. 186 p.
- López, C.** 1990. Fundamentos teórico práctico de Cultivo de tejidos Vegetales. Medios de Cultivo. FAO. Italia, Roma. 15-19 p.
- López, C.** 2001. Reacciones de hipersensibilidad en plantas conservadas *in vitro*. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS26/26reacciones.html>. (Último acceso 05 – enero- 2008). La Paz, Bolivia.
- Manrique, A.** 1989. Conservación de los recursos filogenéticos. I Curso. Utilización de recursos genéticos y estables de interés para América del Sur. La Molina. Lima, Perú. 54 p.
- Mejía, A. Vittorelli. C.** 1988. Cultivo *in vitro* de plántulas de papa. Manual de laboratorio. INIAA. Perú. 51-59 p.

- Murashige T. and Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nieto et al.,** 1983. Guía para el manejo y preservación de los recursos fitogenéticos. INIAP. Quito, Ecuador. 37 p.
- Ochoa, C.** 2001. Las Papas de Sudamérica –Bolivia. IFEA. Primera edición. La Paz, Bolivia. 535 p.
- Ponce, J.** 1998. Propagación y mejora de plantas genéticas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Edición GEO. Santa Clara, Cuba. 87 p.
- Porto, S.** 2003. Agar Brasileiro. Disponible en:
<http://www.agargel.com.br/carragenina.html>. (Último acceso 10-diciembre-2007). La Paz, Bolivia.
- PROINPA,** 2005. Papas Bolivianas. Catálogo de cien variedades nativas. s.e. Cochabamba, Bolivia. 31 p.
- Ramírez, N.** 1989. Cultivo de tejidos. Editorial: Pueblo y educación. México. 96 p.
- Roca, W. Roosevelt, E. Mafla, G.** 1992. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*: Principios y técnicas. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura tropical. CIAT. Cali, Colombia. 60 p.
- Roca, W. Mroginski, L.** 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali Colombia. 970 p.
- Salaues, R. Rocabado, C. Blanc, D.** 1998. La producción de semilla prebásica. Unidad de producción de semilla de papa (sepa). Cochabamba, Bolivia. p 28.
- Uría, V.** 1994. Biotecnología. Facultad de Agronomía. UMSA. La Paz-Bolivia. 21-25 p.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio basal Murashige y Skoog (1962), y su preparación

El medio basal de Murashige y Skoog (1962), esta compuesto de cinco soluciones concentradas (Soluciones stock) y son preparadas de la siguiente manera:

a) SOLUCIÓN A x 10; para 10 litros de medio de cultivo

REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD (mg)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	16500
Nitrato de Potasio	KNO_3	19000
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4400
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	1700
Acido bórico	H_3BO_3	62
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86

Las sales se disuelven por separado en agua destilada y se combinan en una probeta de 1000 cc. de capacidad que tenga 300 cc. de agua destilada desionizada.

Individualmente disolver cada una de las siguientes sales en 100 cc. de agua destilada.

REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD (mg)
Yoduro de potasio	KI	100
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100
Sulfato de cobre penta hidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100
Cloruro cobaltoso hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100

De estas soluciones pipetear a la solución stock, los siguientes volúmenes indicados y finalmente completar el volumen a un litro.

- 8.2 cc de KI
- 2.5 cc de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 cc de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 cc de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

b) SOLUCIÓN B x 10; para 10 litros de medio de cultivo

Pesar 3700 mg de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), y disolver en 500 cc de agua destilada.

c) SOLUCIÓN C x 10; para 10 litros de medio de cultivo

REACTIVO	FÓRMULA	CANTIDAD (mg)
Etilen diamin tetraacetato disódico	Na_2EDTA	372.5
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.5

Disolver el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 25 cc. de agua destilada y el Na_2EDTA en 25 cc. de agua destilada tibia. Dejar enfriar y mezclar ambas soluciones para después completar con agua destilada hasta 500 cc.

d) SOLUCIÓN D x 10; para 10 litros de medio de cultivo

Pesar 1000 mg de myo-inositol y disolver en 500 cc. de agua destilada.

e) SOLUCIÓN E x 25; para 25 litros de medio de cultivo

<u>VITAMINAS</u>	<u>CANTIDAD (mg)</u>
Tiamina	10
Glycina	50
Ácido nicotínico	12.5
Pyridoxina-HCl	12.5

Disolver cada vitamina y completar hasta 250 cc. con agua destilada.

Para preparar 1000 cc. de medio basal, se debe tomar los siguientes volúmenes de las cinco soluciones:

- Solución **A**: 100 cc.
- Solución **B**: 50 cc.
- Solución **C**: 50 cc.
- Solución **D**: 50 cc.
- Solución **E**: 5 cc.

El volumen restante se debe completar con agua destilada.

ANEXO 2. Medios de conservación propuestos por el CIP (1992)

Medio	Detalle	Cantidad (g/l ⁻¹)	Concentración
	MS		
Medio meristema	AG ₃	5.0 ml	0.25 ppm
Tubos de prueba	Pantotenato de Ca	20.0 ml	2.00 ppm
	Sacarosa	30.0 g	3.00 %
	Agar	6.0 g	0.60 %
	MS		
Medio propagación A (erlenmeyer)	AG ₃	8.0 ml	0.4 ppm
	ANA	0.2 ml	0.01 ppm
	BAP	10.0 ml	0.50 ppm
	Pantotenato de Ca	20.0 ml	2.00 %
	Sacarosa	20.0 g	2.00 %
	MS		
Medio propagación B (magenta)	AG ₃	5.0 ml	0.25 ppm
	Pantotenato de Ca	20.0 ml	2.00 ppm
	Sacarosa	30.0 g	3.00 %
	Agar	7.0 g	0.70 %
Medio propagación C (magenta)	MS		
	AG ₃	5.0 ml	0.25 ppm
	Pantotenato de Ca	20.0 ml	2.00 ppm
	Sacarosa	30.0 g	3.00 %
Medio propagación D (magenta)	MS		
	Pantotenato de Ca	20.0 ml	2.00 ppm
	Sacarosa	30.0 g	3.00 %
	Agar	7.0 g	0.70 %
Medio de Conservación E	MS		
	Manitol	40.0	4.00 %
	Sacarosa	5.0	0.50 %
	Agar	8.0	0.80 %
Medio de Conservación F	MS		
	Manitol	40.0	4.00 %
	Sacarosa	30.0	3.00 %
	Agar	8.0	0.80 %

Fuente: CIP, (1992)

ANEXO 3. Medios de introducción, multiplicación y refrescamiento empleados en el trabajo de investigación

Medio	Detalle	Cantidad en g/l ⁻¹	Concentración
Medio de introducción, multiplicación y refrescamiento	MS		
	Sacarosa	30.0	3.00 %
	Carragenina	10.0	1%