

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INGENIERÍA AGRONÓMICA



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA INTRODUCCIÓN DE ÁPICES
VEGETATIVOS DE TRES MORFOTIPOS DE ARRACACHA (*Arracacia*
xanthorrhiza Bancroft) EN CONDICIONES DE *IN VITRO***

MARY CLAUDIA POMA ACARAPI

LA PAZ – BOLIVIA

2014

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

**EFFECTO DE DOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA INTRODUCCIÓN DE ÁPICES
VEGETATIVOS DE TRES MORFOTIPOS DE ARRACACHA (*Arracacia
xanthorrhiza* Bancroft) EN CONDICIONES DE *IN VITRO***

*Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

MARY CLAUDIA POMA ACARAPI

Asesores

Ph.D. Ing. Félix Marza Mamani

Ing. Freddy Porco Chiri

Tribunal Examinador

Ph.D. Ing. Alejandro Bonifacio Flores

Ing. René Calatayud Valdez

Ing. Rafael A. Murillo García

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador

2014

DEDICATORIA

A mis Padres por darme siempre su apoyo y amor, por ser mi fuerza para seguir adelante y alcanzar todas mis metas.

A mis hermanos y a mis amigos que siempre me han brindado su apoyo y buenos deseos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

- *A mi madre por el sacrificio que hizo para apoyarme en toda mi vida y en especial estos años, mi hermano y mis hermanas por ser mi compañía y uno de mis motivos para seguir adelante*
- *A mi novio Carlos Pacheco Candia, a mis amigos y a todos los compañeros, docentes y personal administrativo de mi Facultad de Agronomía*
- *Asesores Ing. Freddy Porco y Ph.D. Ing. Agr. Félix Marza Mamani por haberme brindado todas las facilidades necesarias para realizar este trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Cultivos de Tejidos Vegetales y en especial por su constante impulso y colaboración en el desarrollo y finalización de este trabajo.*
- *A los señores miembros del Tribunal Revisor Ph.D. Agr. Alejandro Bonifacio Flores, Ing. Agr. René Calatayud, Ing. Agr. M.Sc. Rafael Murillo García quienes con sus aportes y recomendaciones enriquecieron este trabajo.*

.....MUCHAS GRACIAS.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES	2
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
II. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Generalidades del cultivo de arracacha	4
3.1.1 Origen.....	4
3.1.2 Clasificación taxonómica de arracacha	4
3.1.4 Descripción morfológica	5
3.1.5 Requerimientos edafoclimáticos.....	9
3.1.6. Propagación	9
3.1.7 Variabilidad Genética	11
3.1.9 Plagas y Enfermedades de arracacha.....	13
3.1.10 Composición nutricional de la arracacha.....	13
3.2 Biotecnología vegetal	15
3.2.1 Cultivo <i>in vitro</i>	15
3.2.2 Propagación a partir de meristemas.....	16
3.2.3 Cultivo de Ápices Vegetativos	17
3.2.4 Asepsia.....	17
3.2.5 Problemas frecuentes en propagación <i>in vitro</i>	18

3.2.6 Medio de Cultivo.....	19
3.2.7 Composición del Medio de Cultivo	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Ubicación del área de estudio	27
4.2. Materiales.....	27
4.2.1. Material biológico.....	27
4.2.2. Equipos	27
4.2.3 Material de Vidrio y Metal	28
4.2.4. Reactivos.....	28
4.2.5 Instrumentos e implementos de laboratorio.....	28
4.2.6 Ambiente de trabajo.	28
4.3. Metodología.....	30
4.3.1 Fase 0. Selección y tratamiento del material vegetal.	30
4.3.2 Fase 1. Preparación de Solución Stock y Medio de Cultivo	30
4.3.3 Fase 2. Introducción a condiciones <i>in vitro</i> y evaluación.....	32
4.4 Diseño experimental para la Desinfección de explantes de arracacha	33
4.4.1 Variables de respuesta para la desinfección de explantes de arracacha	34
4.5 Diseño experimental para los medios de cultivo en morfotipos de arracacha	35
4.5.1 Modelo lineal aditivo	35
4.5.2 Variables de respuesta para el efecto de los medios en morfotipos de arracacha	37
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
5.1 Análisis de variables de respuesta para tratamientos desinfectantes	38
5.1.1 Porcentaje explantes No Contaminados	38

5.1.2 Porcentaje de Necrosis	40
5.1.3 Porcentaje de Oxidación	42
5.1.4 Tiempo que transcurre para la formación de una hoja	43
5.1.5 Elección del mejor tratamiento desinfectante	44
5.2 Análisis de variables de respuesta para el morfotipos de arracacha en medios de cultivo	46
5.2.1 Porcentaje de contaminación (PC)	46
5.2.2 Porcentaje de prendimiento (PP).....	49
5.2.3 Altura de explante (AE)	51
5.2.4 Diámetro de Corona (DC).....	54
5.2.5 Número de brotes por explante (NBE)	56
5.2.6 Número de hojas (NH).....	59
5.2.7 Materia húmeda (MH).....	62

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Rendimiento de los tres cultivares de Arracacha	13
Cuadro 2. Composición química de Arracacha (100 g de materia seca).....	14
Cuadro 3. Características más representativas de los Morfotipos.....	27
Cuadro 4. Tratamientos desinfectantes	34
Cuadro 5. Variables de respuesta	34
Cuadro 6. Factores y niveles del estudio.....	36
Cuadro 7. Variables de respuesta	37
Cuadro 8. Resultados alcanzados con el análisis ANVA, para las variables de respuesta a la desinfección de explantes de arracacha	38
Cuadro 9. Porcentaje de no contaminados, necrosis, oxidación y tiempo que transcurre para la formación de una hoja	44
Cuadro 10. Porcentaje de contaminación de los ápices vegetativos de los morfotipos de arracacha	46
Cuadro 11. Análisis ANVA, para las variables de respuesta de introducción de morfotipos de arracacha en medios de cultivo, evaluadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía	48
Cuadro 12. Comparación de promedios variable porcentaje de prendimiento, para	50
Cuadro 13. Comparación de promedios variable altura de explante (cm),.....	52
Cuadro 14. Comparación de promedios variable altura de planta (cm),.....	53
Cuadro 15. Comparación de promedios variable diámetro de corona (cm),.....	55
Cuadro 16. Comparación de promedios variable diámetro de corona (cm), para	55
Cuadro 17. Comparación de promedios variable Numero de Brotes, para	57

Cuadro 18. Comparación de promedios variable días Numero de brote, para.....	58
Cuadro 19. Comparación de promedios variable Numero de Hojas, para.....	60
Cuadro 20. Comparación de promedios variable Numero de Hojas, para.....	61
Cuadro 21. Comparación de promedios variable Materia Húmeda (gr), para	63
Cuadro 22. Comparación de promedios variable Materia Húmeda (gr), para	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Raíz reservante (<i>A. zanthorrhiza</i>), presente al momento de la cosecha en Toriri.	5
Figura 2. Hijuelo de Arracacha (<i>A. zanthorrhiza</i>), Blas, 2009.	6
Figura 3. Hojas de Arracacha (<i>A. zanthorrhiza</i>), presente al momento de la cosecha en Toriri.	7
Figura 4. Inflorescencia de (<i>A. zanthorrhiza</i>), Blas (2009).....	8
Figura 5. Selección de los brotes que originarán las nuevas plantas de arracacha (Amaya y Julca, 2006).....	10
Figura 6. Las tres principales formas hortícolas: Blanca, amarilla y morada. (Blas,2009).....	11
Figura 7. Cultivo de meristemos. A partir de un meristemo aislado se puede obtener una planta completa. Adaptado de Biotecnología, UNQ 2006 publicado por Segretín (s.f).	16
Figura 8. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes	39
Figura 9. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes	41
Figura 10. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para porcentaje de oxidación, según la prueba de Duncan al 5%.....	42
Figura 11. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para Tiempo que transcurre para la formación de una hoja, según la prueba de Duncan al 5%	43
Figura 12. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para porcentaje de prendimiento.....	51
Figura 13. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para altura de explante.....	54
Figura 14. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para diámetro de corona	56

Figura 15. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para número de brotes	59
Figura 16 . Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha	62
Figura 17. Interacción medio de cultivo por morfotipos de	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Páginas

Anexo 1. Ubicación del lugar de recolección del material vegetal Toriri, Inquisivi ...	77
Anexo 2. Fotografías de Hojas e Hijuelos o brotes de los tres morfotipos en estudio	78
Anexo 3. Plantas madres cosechadas de arracacha.....	79
Anexo 4. Equipos	80
Anexo 5. Fotos del estudio	81
Anexo 6. Solución Stock de Murashige y Skoog (1962).....	84
Anexo 7. Solución Stock de Gamborg <i>et al.</i> (1968).....	87
Anexo 8. Reguladores de Crecimiento usados en la introducción.....	88
Anexo 9. Descripción de los hongos detectados e identificados durante el cultivo <i>in vitro</i> de arracacha (<i>Arracacia xanthorrhiza</i> Bancroft).	89

RESUMEN

La arracacha es parte de una sorprendente variedad de raíces y tubérculos cuyo cultivo está fuertemente limitado al área de los andes sudamericano (Hodge, 1954 citado por Seminario, 2004). La *A. xanthorrhiza* perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae) (Mabberley, 1993), a la cual pertenecen también la zanahoria y el apio.

En la presente investigación sobre el cultivo de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), se planteo la introducción de este a condiciones *in vitro* a partir de apicales vegetativos; previa selección del material adecuado, un proceso de desinfección, utilizando para ello los morfotipos de raíz amarillo claro (M1), raíz blanca (M2) y raíz amarillo intenso (M3).

Para la desinfección se evaluaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión en 8 tratamientos. El procedimiento de desinfección con hipoclorito de sodio (3%) y 10 min elimino eficientemente agentes contaminantes de los explantes. Los porcentajes de contaminación en esta etapa de introducción *in vitro* 13.42% en comparación con la experimentada inicialmente que fue de un promedio del 30.06%.

En el establecimiento, los ápices de arracacha fueron extraídos asépticamente en la cámara de flujo laminar y cultivados en el medio "MCA" y "MCB", el principal el objetivo fue determinar el medio de cultivo optimo. La evaluación fue la Supervivencia de los explantes alcanzando los mejores promedios 95.8 % para el M3, 85.58 para el M2 % y 85.00% para M1; Altura de explante 2.88 cm para el M3, 2.68 cm para el M2 % y 2.20 cm para M1; Diámetro de corona 1.3 cm para el M1, 1.1 cm para el M2 % y 1.0 cm para M3; Número de brotes por explante 7 para el M3 y M2 y 5 para M1; Número de hojas 2.8 para M1 y M2, 2.6 para el M3 en el medio de cultivo MCA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los morfotipos de arracacha demostraron un comportamiento favorable al proceso de introducción en el medio de cultivo MCA.

SUMMARY

Arracacha is part of an amazing variety of root crops whose cultivation is strongly limited to the area of the South American Andes (Hodge, 1954 cited by Seminar, 2004). The *A. xanthorrhiza* belonging to the Apiaceae (Umbelliferae) (Mabberley , 1993), which also belong to the carrot and celery family.

In the research on the cultivation of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), the introduction of such a condition was raised in vitro from vegetative apical; prior selection of suitable material, a disinfection process , using for this purpose the morphotypes yellow root clear (M1) , white root (M2) and bright yellow root (M3).

For disinfecting various sodium hypochlorite concentrations and dipping times of 8 treatments were evaluated. The disinfection process with sodium hypochlorite (3%) and 10 min efficiently remove pollutants from explantes. Los pollution percentages in this stage of in vitro introduction 13.42% compared to that was initially experienced an average of 30.06 %.

In the listing, the apexes of arracacha were extracted aseptically in laminar flow chamber and cultured in medium "MCA" and "MCB ", the main objective was to determine the optimal culture medium. The assessment was the Survival of explants reaching the top averages 95.8 % for M3, M2 for 85.58 % and 85.00 % for M1, 2.88 cm height explant for M3, 2.68 cm for the M2 % and 2.20 cm for M1; crown diameter 1.3 cm for M1, M2 1.1 cm to 1.0 cm % and for M3, number of shoots per explant 7 for the M2 and M3 and 5 for M1, number of leaves 2.8 for M1 and M2, M3 2.6 for in the culture medium MCA.

According to the results, the morphotypes showed a favorable behavior arracacha the process of introducing into the culture medium MCA.

I. INTRODUCCIÓN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es parte de una sorprendente variedad de raíces y tubérculos cuyo cultivo está fuertemente limitado al área de los andes sudamericano (Hodge, 1954 citado por Seminario, 2004), es cultivada en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y el Norte de Chile (Hermann y Heller, 1997 citado por Sánchez, 2003).

La *A. xanthorrhiza* perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae) (Mabberley, 1993), a la cual pertenecen también la zanahoria y el apio. Esta planta se comporta como una especie bianual y alcanza una altura de 1 a 1.50 metros, el tallo presenta ramificaciones cortas o brotes en su parte basal, denominadas colinos o hijuelos que constituyen el material de propagación que contienen yemas (Tapia, 1997).

Amaya y Julca (2006) indica la importante en la alimentación por la fácil digestión por ser rica en calcio, fósforo, hierro, niacina, vitamina A, piridoxina-B6, riboflavina-B2, ácido ascórbico, proteínas, fibras y carbohidratos; características que le otorgan un potencial alimentario y económico a la arracacha. Sánchez y Tapia (1991) citado por Cárdenas (2008), señala que es un potencial productivo importante complementario a los tubérculos, debido a sus variados sabores y a su adaptación a diferentes condiciones ecológicas en los Andes.

El incremento del uso y procesamiento industrial de arracacha en el Brasil (actualmente existen alimentos para bebés y sopas instantáneas); contrasta con lo que sucede con la arracacha en nuestro país, donde sólo se consume fresca. Por ello, son imperantes las investigaciones futuras que posibiliten su desarrollo como un alimento alternativo con amplias y prometedoras perspectivas.

En la actualidad Bolivia se está quedando en un retraso que ya muchos países están avanzando a pasos agigantados en temas de investigación en cultivo de tejidos, cultivo *in vitro*, conservación *in vitro*, etc. El cultivo *in vitro* de cultivos andinos ofrece grandes ventajas, en este momento es escasa la investigación en cultivo *in vitro* en raíces andinas como la arracacha.

1.1 ANTECEDENTES

Entre las aplicaciones de la biotecnología vegetal los cultivos Andinos destacan el uso del cultivo *in vitro* de yemas y meristemos caulinares para la micropropagación, conservación y distribución de recursos genéticos de raíces y tubérculos (Mujica *et al.*, 2002).

La investigación (Landázuri, 1996 mencionado por Hermann, s.f) menciona el cultivo de puntas apicales y la micropropagación de arracacha usando el medio de cultivo MS suplementado con 3% de sacarosa, 5.6 ppm de BAP y 0.05 ppm de ANA.

En dos experimentos realizados en Brasil se evaluaron el efecto de BAP y las concentraciones de GA3 en el desarrollo de arracacha *in vitro* usando el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968) más 0.1 mg L⁻¹ de ANA , con ápices caulinares de 2 mm de los cultivares de Amarela Senador Amaral y Amarela. Concluyeron que los mejores resultados se obtuvieron, con medio G5 añadiendo concentraciones de alrededor de 0.1 mg L⁻¹ de ANA, 0.3 mg L⁻¹ BAP y 0.25 mg L⁻¹ de AG3 (Madeira *et al.*, 2005).

1.2 JUSTIFICACIÓN

La arracacha ha sido mencionada durante muchos años como un cultivo de valor económico potencial y con grandes posibilidades de expansión. A pesar de ser una planta oriunda de nuestra región, existen pocos estudios relacionados con el área de biotecnología.

Una alternativa para obtener material vegetal sano es la Biotecnología Vegetal, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, la cual consiste en cultivar un explante de potencial de diferenciación bajo condiciones asépticas, proporcionándole artificialmente condiciones físicas y químicas para su crecimiento y desarrollo. Esta técnica puede minimizar los problemas resultantes de la pérdida de vigor que va sucediendo en el campo después de ciclos de cultivos sucesivos del material tradicionalmente cultivado, permite la posibilidad de obtener plantas madres de gran vigor, que es lo que interesa al productor.

Además que en nuestro medio, no existen estudios de introducción de morfotipos de arracacha a condiciones *in vitro* comparando medios de cultivo. Otro aporte útil será que en consecuencia la técnica desarrollada se podrá utilizar en trabajos complementarios como la limpieza viral y conservación *in vitro* de arracacha, micropropagación, etc.

Es por esto que se realizó el estudio para aumentar la información sobre el comportamiento y respuesta de la arracacha en condiciones de *in vitro*. En el presente estudio se propagó tres morfotipos de Arracacha en condiciones *in vitro* en base a dos medios de cultivo Murashige Skoog (1962) y Gamborg *et al.* (1968) suplementados con ANA (Acido naftalenacético), BAP (Benzil amino purina) y AG3 (Acido Giberélico).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los diferentes medios de cultivo en la introducción de ápices vegetativos de tres morfotipos de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bacroft.) en condiciones *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer el proceso de desinfección para hijuelos de arracacha para su introducción a condiciones *in vitro*.
- Evaluar el efecto de dos medios de cultivo en la introducción de tres morfotipos de arracacha a condiciones *in vitro*.
- Determinar el comportamiento morfológico y desarrollo de tres morfotipos de arracacha en condiciones *in vitro*.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Generalidades del cultivo de arracacha

3.1.1 Origen

La zanahoria blanca es originaria de los Andes, región en la que se han identificado la mayoría de las especies del género *Arracacia* con una mayor variabilidad genética en el sur de Ecuador. La zanahoria blanca es la única umbelífera domesticada en las Américas y posiblemente su domesticación ocurrió en Colombia. Bukasov (1930), citado por Cárdenas (1969) y Mujica (1990), (científicos destacados por sus estudios en las propiedades de los vegetales), sugiere que la zanahoria blanca es la planta cultivada más antigua de América. Indican, además que el cultivo habría empezado a desarrollarse en época preincaica, pues existen restos arqueológicos de tumbas incaicas.

La especie conocida como apio andino o apio criollo en Venezuela y Puerto Rico; arracacha y racacha en Colombia, Perú, Bolivia, Centro América y Venezuela; virraca en Perú y zanahoria blanca en Ecuador es una planta muy antigua originaria de los Andes (Añez *et al*, 2002).

Rea (1995) en la ruta del Cuzco, pasando por el Collasuyo y el Lago Titicaca Resalta la gran variabilidad genética de los tubérculos y raíces donde posiblemente fueron domesticados y siguen la dirección de La Paz, Oruro y Cochabamba, Chuquisaca y Potosí, llegó esta diversidad parte de lo que hoy es Bolivia.

3.1.2 Clasificación taxonómica de arracacha

La arracacha fue descrita por Bancroft en 1825, como una dicotiledónea. Según Rojas (2006) tiene la siguiente clasificación botánica:

Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Umbellales (Apiales)
Familia:	Umbiliferae (Apiaceae)
Género:	<i>Arracacia</i>
Especie:	<i>A. xanthorrhiza</i> Bancroft

3.1.3 Características Genéticas

El número cromosómico de la arracacha cultivada (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es $2n= 44$. Se sugiere que el número cromosómico básico de *Arracacia* sería $x = 11$ y sería tetraploide de $2n= 4x = 44$ cromosomas. (Blas, 1996).

3.1.4 Descripción morfológica

La planta es herbácea, tiene cuatro partes distintivas (raíz reservante, tallo llamado cepa o corona, los hijuelos o ramas laterales llamados colinos y las hojas e inflorescencias) (Blas, 2005). Hodge, (1954) indica que el cuerpo de la raíz es recto o encorvado, aplanado a menudo en su parte superior por la presión de otras raíces y terminado en un ápice delgado que emite fibras de escasa longitud. Su superficie casi lisa, está cubierta por una delgada película que presenta cicatrices transversales, como las raíces de la zanahoria. Así mismo indica que las raíces más jóvenes tienen una epidermis lisa, las raíces viejas desarrollan unas capas corchosas de color pardo, que dan a las raíces cosechadas una ligera apariencia de yucas.

Añez *et al.*, (2002) señalan que la cepa en su parte inferior emite de 4 a 10 raíces laterales, ovoides o cónicas de 5 a 25 cm de largo por 2.5 a 6 cm de diámetro. Cada raíz se une a la cepa mediante un cuello estrecho extendiéndose hacia una base ancha y redondeada.



Figura 1. Raíz reservante (*A. xanthorrhiza*), presente al momento de la cosecha en Toriri.

Álvarez (2001), menciona que el tallo se compone de una cepa llamada corona de forma cilíndrica corta, de 4 a 10 cm de largo por 4 a 15 cm de diámetro, de su parte superior salen ramificaciones cortas o brotes denominados colinos y a partir de ellos se forman una planta nueva, en estructura similar a la cepa.

Hijuelos de yemas axilares de la parte superior de la cepa emergen brotes adheridos a aquella, por medio de una base angosta y curvada, ensanchándose hacia arriba semejando un cono invertido. Presentan gran cantidad de entrenudos angostos cubiertos de escamas foliares. En su extremo superior brotan de cuatro a diez hojas en cada hijo. Una vez separados de la cepa, emiten raíces en sus entrenudos inferiores formando una nueva planta (Añez *et al.*, 2002).



Figura 2. Hijuelo de Arracacha (*A. zanthorrhiza*), Blas, 2009.

Robles y Hashimoto (2006), infiere que entre el tallo y las raíces se encuentran en una corona que da origen a la parte aérea y a las raíces tuberosas. En la parte superior de la corona aparecen ramificaciones conocidas como hijuelos, brotes, hijos o propágulos, utilizados para la propagación vegetativa, el número variable de 10 a 13 y de donde nacen las hojas.

Los hijuelos o propágulos son estructuras que se utilizan para la multiplicación de la especie. Una planta puede producir de 8 a 31 propágulos los que tienen un periodo de conservación muy corto (Mujica, 1990).

Álvarez (2001), menciona que las hojas son tripinnatifidas, largamente peciolada y a su vez muy cortada, las hojas son muy parecidas al apio. En cuanto al color es un poco difícil establecer diferencias. La lámina de la hoja se forma de varios pares de folíolos opuestos y una terminal.

Así mismo menciona (Mujica, 1990) que las hojas son compuestas, con 3 o 4 pares de folíolos opuestos, miden hasta 50 cm de largo, con un número que varía de 55 a 95 hojas por planta. El mismo autor indica que la lámina de las hojas inferiores son pecioluladas y se dividen en pinadas de forma irregular, las superiores son sésiles y están divididas en lóbulos, los bordes son dentados.

Mujica (1990), el peciolo es abierto y envolvente en la base y se cierra arriba en forma de tubo, de color verde oscuro, verde glauco, verde limón, púrpura, violáceo o vinoso, con la base más oscura o más clara.



Figura 3. Hojas de Arracacha (*A. zanthorrhiza*), presente al momento de la cosecha en Toriri.

De acuerdo a Blas (2005), el eje floral presenta alrededor de 15- 20 umbelas compuestas, la inflorescencia es una umbela compuesta con 8-14 umbelas, cada umbela lleva 10-25 flores. La flor es perfecta en la parte externa de la umbela (flores con gineceo y androceo funcional), sin embargo en la parte interna solo existen normalmente flores estaminadas, las flores son muy pequeñas y el fruto desarrolla solamente un máximo de dos granos (Hermann, 1997).

La flor es umbela compuesta con flores purpuras o amarillas (Higuita, 1968). Con dos ramas laterales y una terminal, las flor se forma de un cáliz diminuto, 5 pétalos verdosos que alternan con estambres largos y finos. Las semillas tienen bajo poder germinativo (Cárdenas, 1969, citado por Mujica, 1990).

Una prueba de inducción floral fue efectuada, utilizando los “colinos” de las 3 principales formas hortícolas de arracacia blanca, amarilla y púrpura. Se deshidrataron los colinos a tres niveles de pérdida de peso, y se aplicaron tres niveles de estrés hídrico en el substrato (cantidad de agua disponible). Los resultados concernientes al estrés hídrico y la deshidratación de los “colinos” no permitieron poner en evidencia una tendencia clara sobre la inducción floral de la arracacha (Blas *et al*, 2006).



Figura 4. Inflorescencia de (*A. zanthorrhiza*), Blas (2009).

Knudse (2009), indica que la inducción floral en la arracacha dependería del genotipo; es decir que ciertos genotipos serían más aptos para la floración que otras en condición de estrés hídrico.

En las flores femeninas como masculinas existen cinco pétalos, estos son más erectos y ovales en las masculinas y más recurvadas en las extremidades de las flores femeninas. En los dos tipos de flores los pétalos presentan una coloración rosada, blanca, gris o marrón; las brácteas son simples y en la mayoría de las veces están localizadas a un lado de la base de la flor femenina (Robles y Hashimoto, 2006).

Hermann (1997), manifiesta que en los Andes rara vez se observa la floración, pero es más frecuente en zonas que se encuentran sobre los 900 m.s.n.m. de altitud y 20° latitud sur. Se considera que los factores que influyen en la floración de la arracacha no están claramente definidos.

El fruto es un diaquenio lanceolado oblongo de 6 a 15 mm de largo y de 4 a 5 mm de ancho. Presenta un ápice puntiagudo, siendo comprimido lateralmente en toda su extensión. El fruto es el resultado de la unión entre dos carpelos y termina con la formación característica de un ápice bífido (Bustamante *et al.*, 1993).

3.1.5 Requerimientos edafoclimáticos

La arracacha requiere de un clima subtropical, sin presencia de heladas, por lo cual se encuentra en la parte de debajo de las zonas agroecológicas. En general la altitud óptima para su producción se ubica entre 1200 y 3000 msnm dependiendo de la latitud (Tapia, 1997).

Rea (s.f.) la racacha (amarilla, blanca, morada), la mayor concentración se da a 3 100, 1 700 y 1 500 msnm, lo más alto en 2 600 m y lo más bajo a 400 msnm. Tapia (1997) menciona a Cárdenas (1950) quien indica que para las condiciones de Bolivia, la arracacha no produce bien por debajo de los 1000 msnm ya que no llega a formar raíces; en pruebas efectuadas a nivel del mar, en la costa del Perú, se encontró que los suelos arenosos el rendimiento era sustancialmente menor debido a un ataque muy severo de nematodos (Moreno, 1995 citado por Tapia, 1997).

3.1.6. Propagación

3.1.6.1 Propagación por semillas

Amaya y Julca (2006) indica lo siguiente:

Dependiendo de la época de siembra y condiciones ambientales, las plantas de arracacha florecen y producen semillas botánicas o sexuales viables.

La propagación a través de semillas botánicas muestra ser promisoría en la reducción y eliminación de algunas restricciones asociadas con la propagación vegetativa.

La germinación de las semillas se inicia normalmente entre los 20 y 30 días, dependiendo de la temperatura.

El mejor sustrato utilizado para obtener una buena germinación, emergencia uniforme de las plántulas y reducción de patógenos, es la arena esterilizada.

El bajo porcentaje de germinación de semillas es atribuida al fenómeno de la dormancia.

3.1.6.2 Propagación vegetativa

La propagación de arracacha con fines comerciales se realiza vegetativamente a partir de los brotes que crecen en la parte aérea de la planta. Al contrario de las semillas botánicas, mantienen la uniformidad y las características del clon que las originó. Ellas no están en reposo absoluto pues ocurren modificaciones bioquímicas y morfológicas desde su origen hasta su enraizamiento y producción de una nueva planta (Amaya y Julca, 2006).



Figura 5. Selección de los brotes que originarán las nuevas plantas de arracacha (Amaya y Julca, 2006).

3.1.7 Variabilidad Genética

Se pueden reconocer hasta tres tipos de arracacha según la coloración de la raíz que es muy heterogénea: color externo puede variar de blanco, blanco con manchas grises, violáceas o crema, crema con jaspes rosados, amarillo y amarillo ligeramente bronceado. Mientras el color interno puede ser blanco, amarillo y morado entero o con anillos y rayos medulares de color violáceo o morado (Ríos 1982 citado por Tapia 1997).



Figura 6. Las tres principales formas hortícolas: Blanca, amarilla y morada. (Blas,2009).

Según Higuítia, 1977; las diferentes formas hortícolas se reconocen por el color del follaje y el color externo e interno de la raíz, así tenemos:

- Amarilla: Esta arracacha produce raíces amarillas de muy buen sabor y el follaje es verde.
- Blanca: Produce raíces blancas y presenta follaje verde.
- Morada: El follaje es de color carmín y las raíces son amarillas.

En general, existen unas nueve diferentes formas hortícolas resultantes de la combinación de color de la raíz y del follaje.

3.1.8 Siembra y Rendimientos

Amaya y Julca (2006), manifiestan lo siguiente:

- Existen algunas controversias en relación al tiempo transcurrido entre el corte de las plántulas y la siembra, así como entre la cosecha y siembra, las que podrían influenciar en el desempeño de la próxima planta.
- Algunos autores recomiendan que luego de la preparación de los brotes, éstos deben ser sembrados inmediatamente, otros prefieren guardarlas 3 a 4 días después de la preparación de los brotes para facilitar la cicatrización de los cortes, colocándolos en un lugar ventilado cuyo almacenamiento no debe pasar de 60 días.
- Un método para almacenar los brotes consiste en cortar parte de la corona después de la cosecha de la planta, colocándolas inmediatamente en contacto con el suelo, en terreno limpio, cubriéndolos con capas de pasto seco de forma que permita un sombreado y aireación, tratando de no amontonarlas para evitar la pudrición.

Después de la preparación de los hijuelos se deja orear 3 a 5 días, según familias comunidad de Chullina, provincia Bautista Saavedra, esto para tener mayor capacidad de brotamiento. Existe tres épocas de siembra en el año, a) la misca que se realiza en los meses de agosto, septiembre, octubre en asociación con el maíz, b) la siembra grande (Jatuy Tarpuy). Se siembra en los meses de noviembre, diciembre y enero, c) siembra atrasada (Kepa tarpuy). Se siembra en los meses de febrero, marzo (Álvarez, 2001).

El autor anterior señala que los sistemas de siembra estas en función a la topografía, estructura del suelo: Siembra normal, una vez aperturado los hoyos en terrenos planos se depositan a los colinos perpendicularmente a la superficie del suelo. Siembra en terrenos con pendiente, que tengan textura suelta y con poco contenido de humedad, se siembra colocando los propágulos contra al pendiente o sea, con la base hacia la pendiente con la finalidad de facilitar el aporque y la cosecha.

Cuadro 1. Rendimiento de los tres cultivares de Arracacha

Morfotipos	Rendimiento Kg /planta	Rendimiento media kg /planta	Rendimiento kg /Ha	Rendimiento Tn/Ha
Racacha Blanca	0.50 a 1.80	1.15	33823.5	33.8
Racacha Amarilla	0.90 a 1.80	1.35	39705.8	39.7
Racacha Corazón Morado	0.80 a 1.80	1.3	38235.2	38.2
Media Total	0.73 a 1.80	1.2	37254.8	37.2

Fuente: Álvarez (2001)

3.1.9 Plagas y Enfermedades de arracacha

En cuanto a enfermedades la principal es la pudrición de la raíz, *Sclerotium rolfsii*. En épocas de lluvia intensa es atacada por la enfermedad denominada mela mela o melado, *Septoria sp.* , que afecta las raíces con la consiguiente mella calidad del producto (Silva y Normanha, 1964 citado por Álvarez, 2001)

Está comprobado que algunos virus constituyen un factor limitante en los cultivos de propagación vegetativa. El control de los virus se logra a través de su erradicación en el material que servirá para su propagación y mediante el uso de variedades resistentes. Aun se conoce muy poco acerca de los virus en las raíces andinas. Hasta 1993, cuando se inició la Fase I del Programa Colaborativo de Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos (RTAs), se sabía de la existencia de dos virus en *Arracacia xanthorrhiza* (arracacha, zanahoria blanca) posteriormente se descubrieron 5 virus (Jones y Kenten, 1978; Kenten y Jones, 1979 citado por Lizárraga, s.f.).

3.1.10 Composición nutricional de la arracacha

León (1994), señala que la raíz contiene un almidón muy fino, formado por granos de perfil redondeado o alargado, de 8 a 10 micras de ancho y de tamaño poco variable. Es la combinación de almidón, fino, uniforme y de olor dado por las resinas, que hacen agradable el sabor de la arracacha.

El cultivo se ha extendido; se industrializa como saborizante y ingrediente de sopas instantáneas, su sabor supera a la papa (Tapia, 1997). Son recomendadas en dietas para niños, personas convalecientes, por su contenido de calcio, fósforo y niacina. El almidón de esta raíz, pues contiene alrededor de 23% de gránulos redondos que varían de 5 a 27 μm , haciéndolo altamente digeribles. (Amaya y Julca, 2006).

En Bolivia hay emprendimientos proyectos como PIC-Harinas por PROINPA. Alternativas con harina de arracacha: complementación y sustitución parcial de harinas y almidones con productos nativos con alto potencial productivo y nutritivo para la soberanía alimentaria.

Cuadro 2. Composición química de Arracacha (100 g de materia seca).

Composición	Promedio	Variación
Agua	74 g	64.12 – 81.37 g
Sólidos totales	26g	16.83 – 34.14 g
Hidratos de carbono	24.91g	19.25 – 29.87 g
Proteínas	0.96 g	0.60 – 1.85 g
Lípidos	0.26 g	0.18 – 0.35 g
Cenizas	1.3 g	1.05 – 1.38 g
Fibras	0.85 g	0.6 – 1.24 g
Almidón	23.51 g	16.91 – 26.49 g
Azúcar	1.66 g	0.65 – 1.98 g
Calorías (cal)	104 g	96.00 – 126.00 g
Acido ascórbico	23 mg	18.26 – 28.40 mg
Vitamina A	1759.87 mg	254.75 – 6878.53 mg
Vitamina B3	3.45 mg	1.00 – 4.50 mg
Vitamina B6	0.03 mg	0.01 – 0.07 mg
Calcio	65.25 mg	45.10 – 127.62 mg
Hierro	9.51 mg	3.60 – 15.41 mg
Fosforo	55 mg	32.50 – 158.70 mg
Potasio	2.4 mg	1.86 – 3.04 mg
Magnesio	64.12 mg	55.00 – 97.64 mg

Fuente: Pereira, 1995 consultado por Salas (2004).

3.2 Biotecnología vegetal

La biotecnología consiste en un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología "tradicional", largamente establecidas y ampliamente conocidas y utilizadas (fermentación de alimentos, control biológico), hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del DNA recombinante (llamadas de ingeniería genética), los anticuerpos monoclonales y los nuevos métodos de cultivo de células y tejidos. (Osorio, s.f.).

La biotecnología vegetal a diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos, esta técnica es de gran utilidad en la obtención de plantas libres de patógenos (Roca y Mroginski, 1991).

Marza (2009), sostiene que la biotecnología vegetal tiene una tremenda importancia para el desarrollo tecnológico del país, especialmente en la investigación de nuevos productos a partir de las especies con potencial y de los recursos genéticos, es una técnica empleada sobre vegetales como ser los organismos vivos o sobre alguna de sus partes (células, tallos, orgánulos, meristemas, hojas) para la obtención de un producto nuevo o genotipos, que abarca desde la micropropagación hasta el cultivo de células y protoplastos.

3.2.1 Cultivo *in vitro*

Los términos micropropagación, propagación *in vitro* y propagación por cultivo de tejidos son sinónimos que se usan para denominar procedimientos que consiste en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro* (Barba *et al.*, 2001).

El cultivo *in vitro*, 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, donde se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1995).

3.2.2 Propagación a partir de meristemos

Es el cultivo *in vitro* del domo apical (meristemo apical que como media mide 100x100 μm) más los primeros primordios foliares. El cultivo de meristemos es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma (Penacho *et al*, s.f.)

Penacho *et al* (s.f.) la razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan los virus que van contaminando a la planta. Existen otros factores:

- El meristemo apical tiene una mayor velocidad de crecimiento y en consecuencia el virus "no alcanza" al meristemo.
- En una célula meristemática el virus tiene mayor dificultad de acoplamiento con los ribosomas, debido a que estas células tienen un código de trabajo muy definido.
- Existe una competencia por uso de algunos metabolitos entre células y virus.

En la yema apical se encuentran un grupo de células que conforman el meristemo apical (tiene un tamaño entre 0,01 y 0,3 mm), tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta. A partir de ellos se pueden regenerar plantas completas (Figura 7).

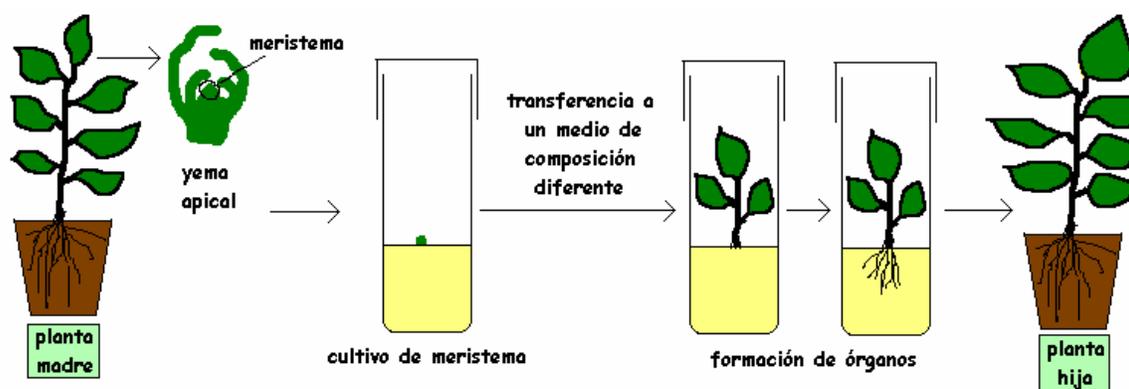


Figura 7. Cultivo de meristemos. A partir de un meristemo aislado se puede obtener una planta completa. Adaptado de Biotecnología, UNQ 2006 publicado por Segretín (s.f).

El cultivo de meristemos tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La potencialidad de la técnica se demuestra con un ejemplo: a partir de una yema apical, se pueden obtener 4.000.000 de claveles en un año. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa o acelerar la producción de plantas bianuales (Segretín, s.f.).

3.2.3 Cultivo de Ápices Vegetativos

De manera general, el cultivo *in vitro* a partir de ápices vegetativos consiste en cultivar asépticamente dichas estructuras provenientes de hijuelos laterales, en el medio de sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con reguladores del crecimiento en especial del tipo citocininas, después de una rigurosa desinfección del material. Luego, mediante un incremento en la concentración del regulador se promueve la brotación múltiple, permitiendo la realización de ciclos de multiplicación y finalmente el desarrollo y obtención de plantas completas debido a la capacidad totipotente inherente en las células vegetales (Sandoval, 1991 citado por Buro, 2001).

Jiménez (1998), menciona que el cultivo aséptico de ápices y meristemos da la formación de una plántula y posteriormente la inducción de brotes axilares. Este procedimiento constituye la base de la mayoría de los métodos de propagación *in vitro* por vía organogénesis

3.2.4 Asepsia

Perla (2007), menciona que es importante tomar los siguientes aspectos respecto a la desinfección: La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito.

Para establecer cultivos asépticos es necesario:

- a) trabajar en ambientes adecuados;
- b) esterilizar los medios de cultivo;
- c) desinfectar superficialmente los explantes, para liberarlos de microorganismos exógenos
- d) Manejar adecuadamente las normas de asepsia.

Es generalizado el uso de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 %. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio $[Ca (ClO)]_2$, del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio ($HgCl_2$) del 0.1 al 1.5 %. En algunos casos es útil agregar algún agente tenso activo (por ejemplo, Tween-20, del 0.01 al 0.1 %). No es necesario cuando se incluye un primer lavado con etanol.

Posteriormente es necesario dar varios lavados con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar. Por último vale tomar en cuenta que la desinfección debe eliminar los microorganismos con el menor daño al explante.

3.2.5 Problemas frecuentes en propagación *in vitro*

Los problemas más frecuentes en propagación *in vitro* podrían resumirse en: contaminación, oxidación y vitrificación de los tejidos.

- **Contaminación:** Ocasionada por fallas en la esterilización del medio de cultivo o instrumentos, ineficiente desinfección del material, manipulación inadecuada y presencia de contaminantes endógenos, cuya incidencia aumenta en las estaciones de mayor humedad relativa.
- **Oxidación:** Causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco, produciendo una coloración rojiza, amarillenta o café. Depende del tipo de material que se emplee (Pocasangre, 1994).

Así Buro (2001) indica, que los compuestos fenólicos actúan como inhibidores del crecimiento emitidos por el propio explante, capaces de causar el envejecimiento y muerte del mismo. Se han documentado incluso diferencias en los grados de oxidación entre los cultivares de una misma especie (Arias, 1993).

- **Vitrificación:** Fenómeno llamado también hiperhidricidad que consiste en el aumento del potencial hídrico de las células que causa el enverdecimiento de los tejidos y los torna quebradizos. En algunos casos se hace referencia a esta como una enfermedad fisiológica (Buro, 2001).

3.2.6 Medio de Cultivo

Pospisilova *et al.*, (1999), infieren que el medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y del agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento, los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta.

También Seelve *et al.* (2003), menciona que sin agua, nutrientes y minerales una planta no puede vivir ni *in vivo* ni *in vitro*. También se debe añadir sacarosa al medio de cultivo, ya que las plantas no son completamente autótrofas cuando se desarrollan en estas condiciones.

George *et al.*, (1999), en el libro “Plan Culture Media” recogen los medios más utilizados para el cultivo de células y tejidos vegetales “*in vitro*” describiendo su fórmula y usos. Por lo general los medios en formulaciones ya establecidas, definidas por Heller (1952), Murashige y Skoog (1962), Gamborg (1968), Schenck y Hildebrandt (1972).

Castillo (2004), expone que las cantidades a ocupar de macronutrientes, micronutrientes, hierro y vitaminas son bastante pequeñas, sería bastante lento e impreciso tener que pesarlas cada vez que se prepara un medio; por tanto es una práctica habitual en todos los laboratorios preparar soluciones stock concentradas de los distintos componentes, agrupados de forma que no se produzcan fenómenos de

precipitación. De esta manera, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar.

Abdelnour y Escalant (1999), sugiere que una vez elaborado el medio de cultivo se tiene que ajustar el pH a valores prefijados mediante la adición de NaOH y/o HCl 0.1-1 N. Dependiendo de que se vaya a preparar un medio sólido o líquido, se añadirá en el primer caso el agente solidificante (agar), se fundirá por calentamiento breve para, finalmente, ser dosificado en los contenedores adecuados.

Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones concentradas 10 o 100 veces (Soluciones Madre o Stock). En la solución madre se pueden mezclar varias sales minerales siempre que no se produzcan problemas de precipitación. Algunos elementos, como el Fe, se utilizan en forma de quelatos para mantener su disponibilidad durante el cultivo (Rey *et al.*, s. f.).

3.2.7 Composición del Medio de Cultivo

La composición de los Medios de cultivos son los siguientes:

- a) Sales Inorgánicas o Minerales
- b) Compuestos Orgánicos
- c) Complejos Naturales
- d) Sustancias Antioxidantes
- e) Materiales Inertes de Soporte

3.2.7.1 Sales Inorgánicas o Minerales

Gómez (1999), comenta que los nutrientes utilizados en cultivo *in vitro* son los mismos requeridos normalmente por las plantas macro y micronutrientes. Por su parte, Mejía (1998) citado por Conde (2002) menciona que las plantas necesitan tomar del medio algunos iones inorgánicos que son indispensables para el crecimiento de las plantas y están constituidos por: nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio, azufre, cloro y sodio.

Ramírez (1989) y López (1990), coinciden en que los micronutrientes intervienen en el crecimiento y desarrollo. Los más esenciales para una adecuada actividad metabólica de las células son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para síntesis de la clorofila y la formación de cloroplastos.

3.2.7.2 Compuestos Orgánicos

Darías (1983), comenta que los compuestos orgánicos se clasifican en tres grupos: Carbohidratos (fuentes de carbón), sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados con el empleo de ciertos aminoácidos, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

a) Fuentes de Carbono

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2 - 4%. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructuosa, almidón, lactosa, maltosa sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados (Gómez, 2002).

Según López (1990), los carbohidratos son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar mas empleado universalmente. La concentración a la cual se utiliza es de 20 a 45g/L. Asimismo Darías (1983) indica que la sacarosa puede ser sustituida por el azúcar refinada obteniéndose óptimos resultados en cultivo *in vitro*.

b) Reguladores de Crecimiento

Weaver (1976) citado por Quezada (1999), menciona que las sustancias de crecimiento extraídas de los tejidos y las sustancias sintéticas que tienen efectos reguladores no pueden ser llamados hormonas sino mas bien reguladores de crecimiento. Estos se definen como compuestos orgánicos producidos por la plantas, siendo suficiente utilizar bajas concentraciones para regular los procesos fisiológicos.

Ramírez (1989) y Hurtado & Merino (1997), coinciden en que los reguladores de crecimiento son un conjunto de sustancias químicas y orgánicas distinto de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

De acuerdo con Hurtado y Merino (1997) actualmente los reguladores de crecimiento están agrupadas y divididas en:

- Promotores de Crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas)
 - Inhibidores de crecimiento (ácido abscísico)
 - El etileno
- **Auxinas**

Según Gómez (2002); las 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), estimula la división celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias. Promueve el enraizamiento, tiene efecto en la 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:

Acido 3-indolacético.....	AIA (Muy termolábil)
Acido 3-indolbutírico.....	AIB
Acido naftalenácético.....	ANA.
Acido 4-clorofenoxiacético.....	CPA.
Acido 2,4-diclorofenoxiacético.....	2,4-D
Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico.....	Dicamba
Acido 2,4,5 triclorofenoxiacético.....	2,4,5-T
Acido 4 amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico.....	Picloram

- **Citocininas**

Las citocininas fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Poco después de su descubrimiento Skoog y Miller propusieron que la formación de órganos en las plantas se debe al balance existente entre las citoquininas y las auxinas (Wikipedia, 2007). Al respecto, Pierik (1990), indica que el cultivo *in vitro* de plantas superiores las auxinas y las citocininas juegan un papel importante en la morfogénesis *in vitro*.

Según Gómez (2002); las raíces son el principal centro para la biosíntesis y son trastocadas hacia los brotes y hojas (movimiento acropétalo o ascendente). Son muy importantes porque pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis, inducción en la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces. Son derivadas de la adenina y dentro de este grupo están:

- N₆ Bencil aminopurina.....BAP.
- N₆ Dimetilalil aminopurina.....2iP.
- N₆ Furfuril aminopurina.....Kinetina.
- N₆ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina.....Zeatina.

- **Giberelinas**

Existen varios tipos de giberelinas, siendo los más comunes: GA1, GA3, GA4, GA7 y GA9. Las funciones que llevan a cabo en la planta, se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Incrementan el crecimiento en los tallos
2. Interrumpen el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizan las reservas en azúcares
4. Inducen la brotación de yemas
5. Promueven el desarrollo de los frutos
6. Estimulan la síntesis de mRNA (RNA mensajero)

c) Vitaminas

López (1999), menciona que las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas concentraciones. Las vitaminas más empleadas son: tiamina, ácido nicotínico, mioinositol, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y el tocoferol.

Según Olmos, (1998); las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, forman parte de un grupo de compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento celular y, en general, para el buen funcionamiento del organismo vegetal. Las vitaminas más 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.

Al respecto Gómez (2008), indica que, el extracto de quinua es utilizado en el cultivo de tejidos por su contenido alto en tiamina (0.840mg), esta vitamina aporta metabolitos esenciales para el desarrollo fisiológico y metabólico de las vitroplantas.

- Ácido nicotínico :(Niacina).
- Piridoxina: (Vitamina B6): se añade como piridoxina-HCl.
- Mio-inositol: no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.
- Ácido pantoténico: ayuda al crecimiento y regeneración de tejidos.
- Ácido fólico: disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz.
- Riboflavina: es inhibidor del crecimiento de raíces.

- Vitamina E: ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.

3.2.7.3 Complejos Naturales

Gómez (1999) y Murillo (2002), coinciden en que muchas preparaciones de diversos medios de cultivo se han empleado diferentes compuestos a fin de enriquecerlos, entre los cuales podemos citar: el agua de coco, extracto de malta, hidrolizado proteico, jugo de tomate, extracto de levadura, jugo de naranja y pulpa de plátano y banano, etc.

3.2.7.4 Sustancias Antioxidantes

Según Gómez (1999), una de las principales dificultades del cultivo *in vitro* en especies tropicales es la oxidación de fenoles. Estas sustancias si no son controladas pueden en la mayoría de los casos, provocar la muerte de explante. Para esto se han empleado diferentes antioxidantes los cuales en su mayoría no realizan un control total de la enzima polifenoloxidasas.

Una mayor efectividad se puede lograr al adicionar el antioxidante en medio líquido o hacer cortes de los explantes en una solución con estas sustancias: ácido ascórbico, L-cisteína, tiourea, peróxido de hidrógeno, policlar, polivinilpirrolidone. También el carbón activado es otra sustancia que evita la oxidación de los explantes.

3.2.7.5 Materiales Inertes de Soporte

López (1990), indica que comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- 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.
- El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes de medio.

Según Hurtado y Merino (1997), el agar es el material de soporte más ampliamente usado en cultivo de tejidos vegetales, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo.

Sin embargo, fisiológicamente no es inerte puesto que es fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes al crecimiento. De acuerdo, a Gómez (1999) el agar debe ser añadido en concentraciones de 6 a 9 g/L (medio solido) y de 2 a 4 g/L (medio semisólido).

3.2.7.6 Agua

La calidad del agua es importante ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se recomienda utilizarla destilada o desionizada (Pierik, 1990).

El agua corriente apta para el consumo humano no es lo adecuadamente pura para el cultivo de plántulas debido a que presenta un alto contenido de minerales, aceites, óxidos metálicos, productos corrosivos, microorganismos, material orgánico y sales disueltas (Rosell y Villalobos, 1990)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz.

4.2. Materiales

4.2.1. Material biológico

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron hijuelos (colinos) de arracacha (Anexo 1) pertenecientes a los morfotipo 1 (raíces amarillas claras y follaje de color carmín), morfotipo 2 (raíces blancas y follaje es verde) y morfotipo 3 (raíces amarillas intensas y follaje verde) recolectadas de la comunidad Toriri (Anexo 2 y 3); ubicada a los 16° 47' 5'' de latitud sur, a 60° 7' 75'' de longitud oeste, a una altura promedio de 2550 msnm, la comunidad pertenece al cantón Licoma, al municipio de Villa Libertad Licoma, provincia Inquisivi del departamento de La Paz.

Cuadro 3. Características más representativas de los Morfotipos.

Morfotipo	Color de Raíz	Color de Hojas	Numero de brotes	Número hojas/brote	Ciclo Vegetativo	Rendimiento (Tn/Ha)
M1	amarillas claras	Rojo carmín	21.90	3.67	355	11.69
M2	blanco	verde	23.20	3.67	262.33	16.64
M3	amarillas intenso	verde	18.63	4.97	257.67	25.6

Fuente: Placencio, 2012.

4.2.2. Equipos

Los equipos que se usaron en el laboratorio fueron: Temporizador (Control de horas luz - oscuridad), Termómetro de máximas y mínimas, Destilador de agua, Autoclave, balanza analítica, agitador magnético, pHmetro, Cámara de flujo laminar, Microondas, Refrigerador y Cámara fotográfica (Anexo 4).

4.2.3 Material de Vidrio y Metal

Vasos precipitados (50 y 100 ml.), Probetas de 100, 250 y 500 ml., Gradillas, Matraz Erlenmeyer (500 ml.), Cajas Petri, Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml) y Pipetas graduadas (4, 10 y 25 ml.).

4.2.4. Reactivos

Sales Minerales, Vitaminas de MS (Murashige y Skoog, 1962) ver Anexo 6 y de B5 Gamborg *et al.*, 1968) ver Anexo 7, Hipoclorito de sodio, Agar, Agua destilada, Alcohol. Acido clorhídrico, Hidróxido de sodio, agua destilada, Reguladores de Crecimiento ANA (ácido α -naftalenacético), BAP (bencil amino purina) y AG3 (Acido giberélico). Y también un antioxidante acido cítrico.

4.2.5 Instrumentos e implementos de laboratorio.

Propipeta, Pinzas, Magos de bisturí, Hojas de bisturí N° 9 y 11, Papel madera, Papel aluminio, Parafilm, Algodón, Mechero de alcohol, Espátulas, Pipetas, Pipetómetro, marcador permanente.

4.2.6 Ambiente de trabajo.

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal, cuenta con los siguientes ambientes:

a) Área de lavado y preparación de medios.

En este ambiente se procedió al lavado de todo el instrumental y material de vidrio necesario para la investigación, el detergente líquido es el más recomendado por tener un menor efecto residual (Peróxidos) sobre el material de laboratorio además de la eficiencia en la eliminación de partículas y la facilidad de enjuague, el mismo se realizó en múltiples sesiones de agua limpia y finalmente con agua destilada tibia.

La preparación de medios, conlleva diferentes aspectos, desde, la utilización de soluciones stock, el pesado de los reactivos, el ajuste del medio de cultivo, la distribución del medio en los tubos de ensayo, y finalmente el sellado de los tubos con papel aluminio.

De la misma forma, la preparación del material de apoyo exige ciertas normas de importancia, como ser: la cobertura del instrumental metálico con papel aluminio (en las puntas), recipientes con agua destilada, placas petri cubiertas con papel sábana. Todo este procedimiento se realizó en el área de preparación de medios.

b) Área de esterilización.

Este ambiente cuenta con equipos específicos para la esterilización, uno de ellos es la autoclave, aparato que sirve para esterilizar objetos y sustancias situados en su interior, por medio de vapor y altas temperaturas. Una vez ya preparados los medios de cultivo y material de apoyo, se procedió a la esterilización a una temperatura de 121 °C, a una presión de 15 lb/pulg², durante 15 minutos, para después de 24 hrs. ser utilizados en la sala de siembra y transferencia.

c) Área de siembra y transferencia de explantes.

Este ambiente reúne las condiciones necesarias para la transferencia y siembra de explantes en forma aséptica, condiciones proporcionadas por la cámara de flujo laminar, donde 24 hrs antes se realizó una limpieza minuciosa con hipoclorito de sodio (lavandina) al 3% (v/v) y alcohol al 70% (v/v) con la finalidad de eliminar cualquier elemento contaminante.

d) Sala de crecimiento.

Sala de crecimiento, este ambiente reúne las condiciones adecuadas para el desarrollo de las vitroplantas, cuenta con estantes metálicos a los que se adaptaron tubos fluorescentes blancos de 40 y 60 W, que proveen una intensidad lumínica aproximada de 1200-1500 lux (lumen por metro cuadrado) y una temperatura de 22 a 25 °C, el fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad debidamente controladas por un temporizador automático, todos estos datos fueron tomados durante los 2 meses de investigación.

4.3. Metodología

Durante el trabajo de investigación se usó, la metodología empleada por Murashige y Skoog (1962) y Gamborg *et al.* (1968) que fue adecuada a las condiciones requeridas, a esta se añadió las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, planteados durante el desarrollo de la investigación, con el fin de cumplir con los objetivos del trabajo este se dividió en tres fases las cuales se describen a continuación.

4.3.1 Fase 0. Selección y tratamiento del material vegetal.

El 20/07/2011 se colectó las plantas madres en la comunidad de Toriri. Se realizó una segunda recolección en 29/07/2012. Para la obtención de plantas madres, la selección se realizó tomando en cuenta las características propias del cultivo, plantas que no presentaron enfermedades o plagas. Una vez elegida las plantas madres y antes de extraer los hijuelos se realizó el lavado con agua para eliminar fragmentos de suelo y la desinfección se hizo con etanol al 70% (v/v) para eliminar los contaminantes externos, como ser los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente, posteriormente fueron guardados en el conservador de plastroformo. A continuación se realizó el traslado a la ciudad de La Paz, traslado los hijuelos o colinos al laboratorio donde fueron cultivados en el medio y se aplicaron los tratamientos propuestos.

4.3.2 Fase 1. Preparación de Solución Stock y Medio de Cultivo

Se realizó la limpieza, esterilización de todos ambientes con hipoclorito de sodio al 3% y los mesones con etanol 90 %, esta operación se hizo cada vez que se usó los ambientes y equipos. El desinfectado de la cámara de flujo laminar se hizo solo con etanol al 90% y hipoclorito de sodio al 3%.

El lavado de los cristales: probetas, vasos de precipitados, elermeyers, los frascos, cajas Petri, gotero, varilla, las espátulas y los recipientes de cristal: se realizó el lavado con detergente, se enjuago de cuatro aguas el último enjuague se realizó con agua destilada, luego se volteo sobre el mesón desinfectado.

Para ejecutar la preparación de las soluciones Stock están basadas en sales y vitaminas, la primera solución Stock de Murashige y Skoog (1962); compuesta por cinco soluciones stock: A, B, C, D y E. La preparación de la segunda solución Stock Gamborg *et al.* (1968); compuesta por cinco soluciones stock: Macronutrientes, micronutrientes, cloruro de calcio, quelatos de hierro y vitaminas-aminoácidos.

Para preparar el medio de cultivo se siguió los siguientes pasos: en una probeta de 500ml se añadió las 5 soluciones stock del MS y se completo con agua destilada; se lo vacio a un recipiente de 500 ml en erlenmeyer. En seguida se añadió sacarosa 3 % (p/v) a la solución, se procedió a agitar hasta homogeneizar la mezcla seguidamente se añadió 0,1 mg L⁻¹, ANA, 0,3 mg L⁻¹ BAP y 0,25 mg L⁻¹ GA3, se ajusto el pH a 5.6 a 5.7 y finalmente se procedió a agregar el agente solidificante agar 0,55 % (p/v) el cual se debe calentar para diluir y homogenizar el medio de cultivo.

Cuando el medio estuvo casi transparente homogéneo se distribuyó en los vasitos y magentas, con 5 ml y 15 ml e inmediatamente se sello con el papel aluminio y papel madera, se lo apretó con una liga. La misma operación se siguió para preparar el medio de cultivo (MCB), se uso el medio basal GB, sacarosa 3 % (p/v) y se añadió reguladores de crecimiento 0,1 mg L⁻¹, ANA, 0,3 mg L⁻¹ BAP y 0,25 mg L⁻¹ GA3.

Para la esterilización de los medios de cultivo se situó los vasitos con medio dentro del autoclave, así mismo; se ubico las cajas petri envueltos en papel madera cada par, las pinzas y los mangos de bisturí con papel aluminio (en las puntas), materiales como los algodones en un frasco sellado con papel aluminio y plasfilm, el agua destilada (para enjuagar los explantes), luego se aseguro muy bien el autoclave.

Una vez ya preparados los medios de cultivo y material de apoyo, se procedió a la esterilización a una temperatura de 121 °C, a una presión de 15 lb/pulg², durante 15 minutos, para después de 24 hrs. ser utilizados en la sala de siembra y transferencia.

4.3.3 Fase 2. Introducción a condiciones *in vitro* y evaluación

Desinfección

La concentración y el tiempo a utilizar se determinaron a través de tratamientos previos que se realizaron en las cuales se trabajó con 8 tratamientos de desinfección (% hipoclorito de sodio y tiempos de inversión).

La desinfección se realiza en el área siembra y transferencia. Este ambiente reúne las condiciones necesarias para la transferencia y siembra de explantes en forma aséptica, condiciones proporcionadas por la cámara de flujo laminar. Se realiza una desinfección física a través de rayos ultravioleta en la cámara de flujo laminar a las soluciones de etanol, lavandina, los bisturís, pinzas, el algodón, el agua destilada, las cajas petri, los frascos para enjuagar, plastiflix, marcador indeleble, guardapolvo, guantes, barbijo, gorra y los mecheros por espacio de 30 minutos, después se procedió a apagar el UV y se espera unos 15 minutos antes de entrar al ambiente.

Previa entrada del material vegetal a la cámara de flujo laminar se dejó bajo el chorro de agua para evitar el estrés del hijuelo, con la ayuda de un cuchillo, se cortan hojas y parte de raíz aun existente en el hijuelo, recién se introdujo el material vegetal a la cámara flujo laminar y se procedió de la siguiente manera:

Se sumergió en etanol 70 % (p/v) por espacio de 10 segundos los explantes, posteriormente se introdujo al hipoclorito de sodio al 3% por espacio de 10 minutos y se hicieron tres lavados con agua destilada, el cual contenía Acido cítrico 0,1% (p/v) para disminuir la oxidación del explante.

Introducción a condiciones *in vitro*

Para la siembra inicial se procedió a la limpieza del tablero (de la cámara flujo laminar) este procedimiento se realizó cada vez que se uso, empleando alcohol antiséptico y algodón estéril; paralelamente se realizó el encendido del mechero de alcohol, se flamearon los instrumentos (tapa de cajas petri, el bisturí, mango de bisturí y las pinzas).

Con la ayuda de una pinza se procedió a sujetar los hijuelos para realizar cortes para obtener ápices en la caja Petri con el bisturí; una vez cortado el explante de 5 a 10 mm aproximadamente, se destapo el medio de cultivo e inmediatamente se realizó la introducción del explante. Una vez realizada la siembra se flameó rápidamente y en seguida se sella con el plastiflix, luego se llevó a la sala de crecimiento (área estéril y ambiente controlado).

La evaluación se hizo con respecto a las variables de respuestas, se utilizó muestreo destructivo para algunas variables (número de hojas, número de hijuelos) al no existir la planta para sus posteriores mediciones se tomó en cuenta a la siguiente muestra hasta obtener todos los datos deseados. Una vez concluidas la toma de datos y al considerarse que no existían nuevos eventos entonces se procedió a realizar el análisis de los datos obtenidos.

4.4 Diseño experimental para la Desinfección de explantes de arracacha

Para los tratamientos desinfectantes en ápices de arracacha se utilizó para su análisis el Diseño de Bloques al azar, donde la variable estudiada son los tratamientos de desinfección y el bloque corresponde a las repeticiones. Se utilizó el siguiente modelo lineal matemático (Calzada, 1970).

$$X_{ijk} = \mu + \beta_j + \alpha_i + \epsilon_{ijk}$$

DONDE:

X_{ij} = Observación cualquiera

μ = Media general

β_j = Efecto i -ésimo repetición (Bloque)

α_i = Efecto del j -ésimo Tratamiento de Desinfección

ϵ_{ijk} = Error Experimental

Cuadro 4. Tratamientos desinfectantes

Tratamiento	Concentracion de hipoclorito de sodio (%)	Tiempo (min)
A1	4	15
A2	4	10
A3	3	15
A4	3	10
A5	2	20
A6	2	15
A7	1	20
A8	1	15

4.4.1 Variables de respuesta para la desinfección de explantes de arracacha

El Cuadro 5, nos muestra las variables analizadas durante el proceso de desinfección

Cuadro 5. Variables de respuesta

Variable	Símbolo	Características	Operacionalización de la variable
Porcentaje explantes No Contaminados	PNC	Se registro la cantidad de explantes que no presento agentes contaminantes(Bacterias hongos y levaduras)	ANVA, Prueba de promedios
Porcentaje de Necrosis	PN	Se realizo el conteo de explantes muertos.	ANVA, Prueba de promedios
Porcentaje de Oxidación	PO	Se realizara en los que respondan a la producción de brotes.	Por conteo del número brotes y calculo de promedios. ANVA, Prueba de medias Duncan
Tiempo que transcurre para la formación de una hoja	TFH	Se realizara en los que respondan a la producción de hojas.	Conteo del número, calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios

Las variables de respuesta con las que se trabajaran nos coadyuvaran para comparar los tratamientos desinfectantes.

4.5 Diseño experimental para los medios de cultivo en morfotipos de arracacha

El diseño experimental empleado en el presente estudio fue el completamente al azar con arreglo bifactorial; el factor A fue el medio de cultivo y el factor B los morfotipos de arracacha; sus combinaciones constituyeron 6 tratamientos con 10 repeticiones, la unidad experimental consistió en 2 magentas con 4 explantes en cada magenta, totalizando 60 unidades experimentales.

4.5.1 Modelo lineal aditivo

Según Romero, 2009, menciona que el modelo lineal aditivo corresponde a diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, y el modelo es el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

DONDE:

- X_{ij} = Observación cualquiera
- μ = Media general
- α_i = Efecto i-ésimo nivel del factor medio de cultivo
- β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor morfotipo de arracacha
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel del factor medio de cultivo con el j-ésimo nivel del factor morfotipo de arracacha
- ϵ_{ijk} = Error Experimental

Cuadro 6. Factores y niveles del estudio

Factor A: Medio de Cultivo	Símbolo
a₁ = MS + (ANA, BAP y GA3)	MCA
a₂ = B5 + (ANA, BAP y GA3)	MCB
Factor B: Morfotipo de Arracacha	Símbolo
b₁ = Raíz amarillo claro	M1
b₂ = Raíz blanca	M2
b₃ = Raíz amarillo intenso	M3

MS = Murashige y Skoog (1962) (Anexo 6)

B5 = Gamborg *et al.*, (1968) (Anexo 7)

Reguladores de crecimiento = 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,3 mg L⁻¹ BAP + 0,25 mg L⁻¹ GA3)

Los tratamientos fueron los siguientes:

T₁= Medio Cultivo (A) + Morfotipo (1)

T₂= Medio Cultivo (A) + Morfotipo (2)

T₃= Medio Cultivo (A) + Morfotipo (3)

T₄= Medio Cultivo (B) + Morfotipo (1)

T₅= Medio Cultivo (B) + Morfotipo (2)

T₆= Medio Cultivo (B) + Morfotipo (3)

4.5.2 Variables de respuesta para el efecto de los medios en morfotipos de arracacha

El Cuadro 7, nos muestra las variables analizadas durante el desarrollo del presente estudio.

Cuadro 7. Variables de respuesta

Variable	Símbolo	Características	Operacionalización de la variable
Porcentaje de contaminación	PC	Se registró la cantidad de explantes que presenten contaminación fúngica, bacteriana u oxidación.	Conteo del número de vitro plantas contaminadas, calculo de porcentajes
Porcentaje de Prendimiento	PP	Se realizó en conteo de vitro plantas que se adaptaron, inician el proceso de formación de partes vegetativas.	ANVA, Prueba de promedios
Altura de planta	AP	Se procedió a medir con una regla y en centímetros cada planta. Se midió cada semana y se considerará desde el momento de la siembra.	ANVA, Prueba de promedios
Número de brotes por explante	NBE	Se realizó en los que respondan a la producción de brotes.	Por conteo del número brotes y calculo de promedios. ANVA, Prueba de medias Duncan
Número de hojas	NH	Se contabilizó aquellas hojas bien estructuradas, en los que respondan a la producción de hojas.	Conteo del número, calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios
Diámetro de Corona	DC	Se medirá en mm	ANVA, Prueba de promedios
Materia húmeda	MH	Pesaje de las vitro plantas frescas Se realizara al finalizar los tratamientos a las 8 semanas	Calculo de porcentajes, prueba de promedios. ANVA

Las variables de respuesta con las que se trabajaran nos coadyuvaran para comparar los dos medios de cultivo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los explantes evaluados provinieron de hijuelos colectadas de la comunidad Licoma en perteneciente al municipio Inquisivi de plantas madres sanas, con alto potencial de rendimiento. Con el análisis de los datos obtenidos en la investigación se llegaron a los siguientes resultados y conclusiones:

5.1 Análisis de variables de respuesta para tratamientos desinfectantes

Cuadro 8. Resultados alcanzados con el análisis ANVA, para las variables de respuesta a la desinfección de explantes de arracacha

VARIABLES DE RESPUESTA	FV	PNC		PN		PO		TPH	
		GL	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM
Bloque	9	174.479		233.507		52.083		0.500	
Tratamiento	7	5945.313	0.000**	5320.3125	0.000**	1959.821	0.000**	7.429	0.000**
Error	63	116.939		124.380		40.179		0.563	
Total	79								
		CV:15.24		CV:13.95		CV:18.43		CV:11.54	

CV = coeficiente de variación; ** = altamente significativo; * = significativo; ns = no significativo

5.1.1 Porcentaje explantes No Contaminados

El análisis de varianza para el Porcentaje explantes No Contaminados (Cuadro 8) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable porcentaje de explantes no Contaminados. Esta reportó un coeficiente de variación de 13.95 % que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales.

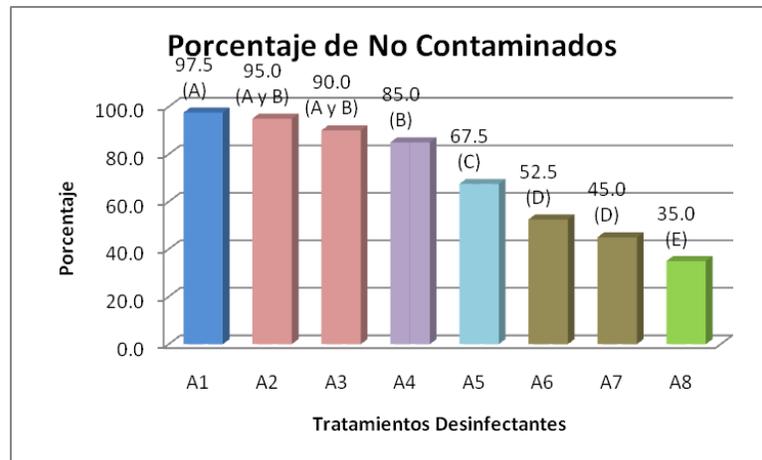


Figura 8. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para porcentaje de No contaminados, según la prueba de Duncan al 5%

En el Figura 8, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que existen diferencias en los tratamientos desinfectantes como resultado de la introducción de los explantes, que cuando se utilizó: A1 (4 % de NaClO durante 15 min), A2 (4 % de NaClO durante 10 min) y A3 (3 % de NaClO durante 15 min) obteniendo 97.5%, 95% y 90% de no contaminados respectivamente lo negativo de estos tratamientos son que posteriormente causaron necrosis en los explantes introducidos, resultaron ser muy altas las concentraciones de hipoclorito de sodio y el tiempo de inmersión.

El tratamiento más apropiado para el porcentaje de no contaminados es el A4 (3 % de NaClO durante 10 min) ya que demostró ser muy efectivo en la eliminación de microorganismos externos presentes en la superficie del explante sin causar necrosis, como se observa en los resultados en la figura 9. Y los tratamientos desinfectantes A5 (2 % de NaClO durante 20 min), A6 (2 % de NaClO durante 15min), A7 (1 % de NaClO durante 20 min) y A8 (1 % de NaClO durante 15 min) fueron concentraciones muy bajas para eliminar microorganismos presentes en los hijuelos tratados.

La diferencia de los resultados obtenidos en la variable de No Contaminados se asume al hecho que los hijuelos de arracacha se encuentran casi en contacto directo con el suelo lo que favorece que el tejido este más expuesto a agentes contaminantes lo cual dificulta la total eliminación.

Por este motivo que los tratamientos como el (A5, A6, A7 y A8) resultaron ser inapropiados para poder eliminar agentes contaminantes, debido a las bajas concentraciones de hipoclorito de sodio.

Al respecto, Villalobos y Pérez (1979) citado por Sánchez (2004) mencionan que el contacto directo con el suelo inducen alta contaminación de los explantes, especialmente cuando estos son extraídos de plantas provenientes de campo.

Observando que la mayoría de los explantes contaminados hubo la presencia de bacterias. Jiménez (1999) menciona que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de bacterias asociadas a los tejidos de las plantas *in vivo*; muchas son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores quedando protegidas, de esta manera, de los agentes químicos. Esto podría explicar los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de una mayor proporción de contaminantes bacterianos.

5.1.2 Porcentaje de Necrosis

El análisis de fuentes de variación para el Porcentaje de Necrosis (Cuadro 8) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable No Contaminados. Esta reportó un coeficiente de variación de 18.43 %.

Los resultados presentados en la figura 9, mediante prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que el mejor tratamiento desinfectante para los hijuelos de arracacha en la variable de necrosis es A4 (3 % de NaClO durante 10 min), presentando 25% de necrosis cuando el hipoclorito de sodio tiene una concentración casi intermedia comparadas con las otros tratamientos y un tiempo también intermedio contrastadas con los demás tiempos usados.

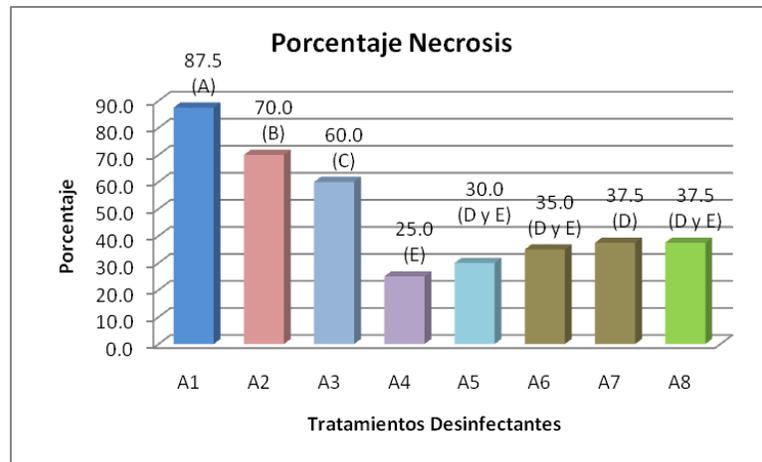


Figura 9. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para porcentaje de necrosis, según la prueba de Duncan al 5%

También se observó que los tratamientos no adecuados para este fin son: A1 (4 % de NaClO durante 15 min), A2 (4 % de NaClO durante 10 min) y A3 (3 % de NaClO durante 15 min) causando 87.5%, 70% y 60% de necrosis respectivamente (ver Figura 9).

Los resultados obtenidos para porcentaje de necrosis concuerdan con Sánchez (2004), quien menciona que las concentraciones altas o períodos de inmersión más prolongados causan necrosis en los explantes, dicho autor obtuvo bajos porcentajes de necrosis utilizando 20% de blanqueador comercial (1.05 NaClO) durante 20 min de inmersión.

Al respecto, Gómez (1999) menciona que la concentración y el tiempo de exposición necesaria para una desinfección adecuada, varían en función al tipo de explante utilizado y su posterior regeneración. Vega *et al.* (2007), señala que mayor tiempo exposición al NaClO permite una mayor penetración del agente químico de tal manera que no solo produjo la eliminación de los microorganismos contaminantes, sino también pudo haber afectado a los tejidos internos y por tanto a la viabilidad del material vegetal.

5.1.3 Porcentaje de Oxidación

El análisis de varianza para el Porcentaje de Oxidación (Cuadro 8) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable No Contaminados. Esta reporto un coeficiente de variación de 11.54 % que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales.

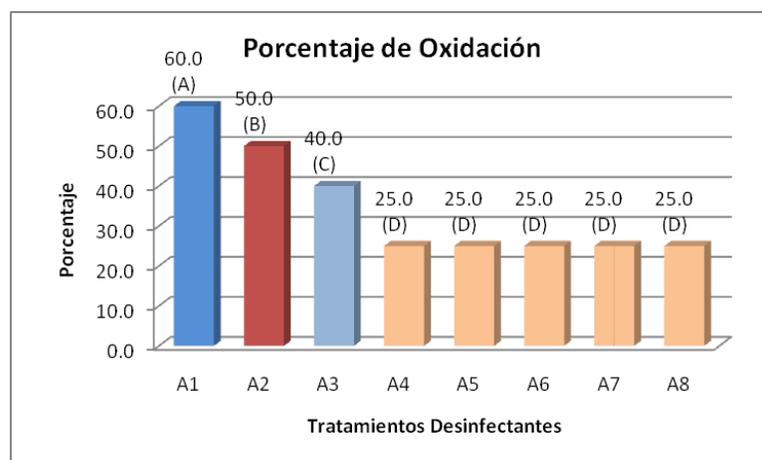


Figura 10. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para porcentaje de oxidación, según la prueba de Duncan al 5%

Los resultados presentados en la figura 10, mediante prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa altos porcentajes de oxidación en los tratamientos A1 (4 % de NaClO durante 15 min), A2 (4 % de NaClO durante 10 min) y A3 (3 % de NaClO durante 15 min) con 60, 50 y 40% de oxidación respectivamente, y los demás tratamientos tuvieron un 25% de oxidación. Se observó que el mejor tratamiento fue A4 (3 % de NaClO durante 10 min) ya que los tres primeros tuvieron mucha oxidación causando lento desarrollo y muerte de los explantes.

Por su parte los demás (A5, A6, A7 y A8) tuvieron baja oxidación pero las concentraciones y tiempos de inmersión son insuficientes para una buena desinfección del explante. En la mayoría de los explantes de hijuelos, los tratamientos desinfectantes presentaron baja oxidación, el cual, con el transcurso del tiempo se difundió en el medio.

Debido que el NaClO además de ser un desinfectante también es un agente Oxidante, Roca y Mroginski (1991); es probable que las altas concentración de NaClO y las características del explante, el enjuague de los explante no haya sido suficiente para eliminar los restos de hipoclorito.

Así mismo se puede señalar que durante la incisión de los explantes ocurren daños celulares, en respuesta de ellos se activan el metabolismo de fenoles, la cual se manifiesta con el empardecimiento del medio de cultivo, que se inicia en la zona central del explante y puede extenderse por todo el medio de cultivo, como consecuencia del proceso de oxidación (Quezada, 1999).

5.1.4 Tiempo que transcurre para la formación de una hoja

El análisis de fuentes de variación para el Tiempo que transcurre para la formación de una hoja (Cuadro 8) indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la variable No Contaminados. Esta reportó un coeficiente de variación de 15.24 % que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales.

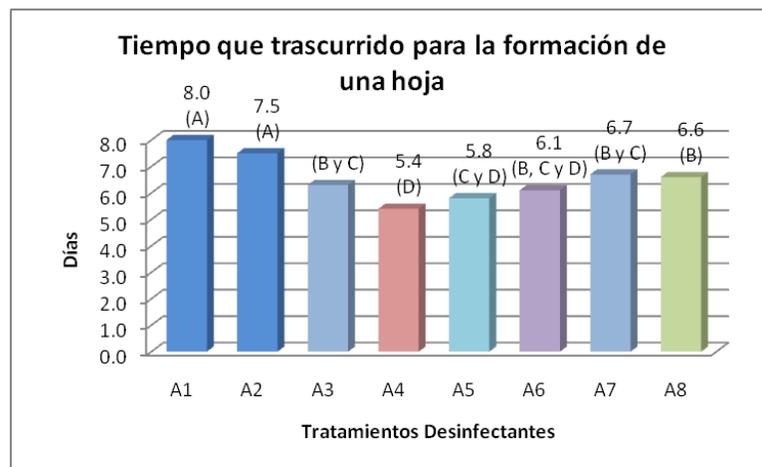


Figura 11. Efecto de los tratamientos desinfectantes en explantes provenientes de hijuelos para Tiempo que transcurre para la formación de una hoja, según la prueba de Duncan al 5%

Los resultados presentados en la figura 11, mediante prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$, nos muestra que el mejor tratamiento corresponde al A4 (3 % de NaClO durante 10 min) con un promedio de 4.5 días en que llegaron a formar una hoja.

Los resultados obtenidos para el tiempo de formación de una hoja se deberían al desinfectante y tiempo de inmersión del explante a emplearse, ya que si exponemos mucho tiempo el explante al desinfectante ocasionamos que este se absorba compuestos del desinfectante, lo que genera una lenta regeneración.

Podemos ver que el tratamientos A1 (4 % de NaClO durante 15 min) tardo mucho mas es regenerase y A7 (1 % de NaClO durante 20 min) aunque tengan menor concentración de NaClO también su regeneración tardó debido a que el tratamiento A7 tiene mayor tiempo de inmersión lo cual generó que el explante absorba compuestos del NaClO.

5.1.5 Elección del mejor tratamiento desinfectante

Cuadro 9. Porcentaje de no contaminados, necrosis, oxidación y tiempo que transcurre para la formación de una hoja

Tratamientos	PNC (%)	PN (%)	PO (%)	TFH (Días)
A1	97.50	87.50	60	7.5
A2	95.00	70.00	50	8.0
A3	90.00	60.00	40	6.3
A4	85.00	25.00	25	5.4
A5	67.50	30.00	25	5.8
A6	52.50	35.00	25	6.1
A7	45.00	37.50	25	6.3
A8	35.00	37.50	25	6.6

En base a la información recopilada por el análisis de las diferentes variables establecidas, se pudo establecer que el tratamiento A4 se presentó como óptimo para la desinfección inicial de apicales vegetativos de *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft debido a que a través de este procedimiento los explantes fueron menos afectados (menor grado de oxidación menores proporciones de necrosis y rápida regeneración del explante), como se observa en el cuadro 9.

Como se observo oxidación para disminuir este problema para la fase de establecimiento se uso acido cítrico.

Respecto Vega *et al.* (2007) indica que un optima desinfección, permite un mejor desarrollo del material vegetal, traducido en términos de mayor tamaño de los individuos establecidos y un menor tiempo de generación de las primeras estructuras foliares, aspectos que son indicativos de una respuesta favorable del material vegetal a las condiciones de cultivo *in vitro*.

Utilizar en el proceso de desinfección superficial hipoclorito de sodio puesto que es de fácil manejo y no fue tóxico en concentraciones 2 y 3 % el material a sembrar. Es generalizado el uso de etanol (70 % v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 % por sus buenos resultados para la desinfección, con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)_2]$, del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1 al 1.5 %. (Perla, 2007).

Por último es muy importante tomar en cuenta, que la desinfección debe eliminar los microorganismos con el menor daño al explante, por esta razón es importante el tiempo de inmersión y la concentración del desinfectante que se va utilizar con un determinado material vegetal para generar una introducción exitosa.

5.2 Análisis de variables de respuesta para el morfotipos de arracacha en medios de cultivo

En esta fase se observó un buen porcentaje de prendimiento, atribuible a un especial cuidado en la extracción de ápices, un adecuado manejo en la cámara de flujo laminar y al efectivo protocolo de desinfección utilizado. Las variables en estudio evaluadas son el, porcentaje de contaminación, porcentaje de prendimiento, altura de explante, diámetro de corona, número de brotes, número de hojas y materia húmeda elementos que reflejan un adecuado establecimiento *in vitro*.

5.2.1 Porcentaje de contaminación (PC)

Cuadro 10. Porcentaje de contaminación de los ápices vegetativos de los morfotipos de arracacha

Morfotipos de Arracacha	Ápices Introducidos	% de Contaminación	% de Necrosamiento
Raíz Amarillo Claro (M1)	20	13.75	15
Raíz Blanco (M2)	20	10	10
Raíz Amarillo Intenso (M3)	20	17.5	0
Sub Total	60	13.42	8.33

En el cuadro 10, se observa que el porcentaje de contaminación es de 13.75 % para todos los morfotipos como promedio, el mayor porcentaje de vitroplantas contaminadas se obtuvo en morfotipo Raíz Amarillo Intenso (M3) con 27.5% y un porcentaje menor para Raíz Blanco (M2) con 20%. Durante las 8 semanas de evaluación se observaron las principales causas de muerte fueron por oxidación y por fenoles.

En la realización del presente trabajo los hongos contaminantes correspondieron a los géneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Penicillium*. Los hongos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. *Alternaria* sp. los hongos con mayor predominancia, *Curvularia* sp., y *Cladosporium* sp. se presentaron el menor porcentaje. Los contaminantes como ser *Penicillium* y *Aspergillus* son contaminantes comunes de laboratorio.

Estos resultados son análogos a los encontrados por Borges *et al.*, 2005 quienes detectaron los hongos *Fusarium* sp. *Botryodiplodia* sp. *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. Sin embargo, contrastan con los observados por Vilorio (2003), quien indicó al hongo *Fusarium* sp. como el microorganismo que predominó en los segmentos de diferentes especies cultivadas en condiciones *in vitro* y en menor cuantía a otros tales como: *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Curvularia* sp., *Syncephalastrum* sp en diferentes cultivos de raíz.

Estas diferencias pueden estar afectadas por el momento o época de recolección del material vegetal y a la técnica de desinfección superficial utilizada. Lo anterior se fundamenta en el hecho que durante la época lluviosa se ha registrado en otros cultivos que los porcentajes de contaminación son altos, lo cual coincide con lo indicado por Amin y Jauwal (2003), quienes señalaron que la época del año tiene influencia sobre la contaminación de los explantes, ya que durante los meses secos encontraron menor contaminación.

En relación a la desinfección superficial utilizada en el presente trabajo, también podría haber diferencias con respecto a los contaminantes presentes, ya que no todos los desinfectantes superficiales permiten remover en igual forma las bacterias y hongos exógenos en el explante. Los contaminantes pueden estar en la superficie o en el interior, o en ambas partes.

Según Serrano (1993), una vez desinfectado el material vegetal que se va a utilizar como fuente de explante, resulta muy importante evaluar su crecimiento posterior, ya que los vapores del cloro pueden afectar las capas celulares externas y necrosarlas porque penetran profundamente y, aunque por lo general, se obtiene una buena desinfección, también pueden afectar los tejidos internos y darse el caso que el tratamiento utilizado para la desinfección del explante sea efectivo, pero afecte el crecimiento del explante.

El cuadro 11 muestra los resultados alcanzados en el análisis ANVA, para cada una de las variables de respuesta para el efecto de los Medios de cultivo en morfotipos de Arracacha.

Cuadro 11. Análisis ANVA, para las variables de respuesta de introducción de morfotipos de arracacha en medios de cultivo, evaluadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía

VARIABLES DE RESPUESTA	PP			AE		DC		NBE		NH		MH	
	GL	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM	Prob > F	CM	Prob > F
FV													
Medio Cultivo	1	14260.42	0.001**	11.35	0.001**	3.267	0.001**	70.417	0.001**	2.400	0.002**	1.998	0.001**
Morfotipo	1	31.25	0.902ns	2.81	0.001**	0.180	0.001**	2.817	0.010**	0.867	0.029**	1.094	0.001**
Medio Cultivo* Morfotipo	2	197.92	0.523**	0.29	0.050**	0.250	0.001**	4.317	0.001**	0.200	0.424**	0.058	0.498**
Error	54	52.08		0.05		0.008		0.561		0.230		0.182	
Total	59												
			CV: 10.13		CV: 9.97		CV: 10.24		CV: 13.66		CV: 18.93		CV: 13.14

CV = coeficiente de variación; ** = altamente significativo; * = significativo; ns = no significativo

5.2.2 Porcentaje de prendimiento (PP)

El análisis ANVA para la variable porcentaje de prendimiento (Cuadro 11), éste reporto un coeficiente de variación de 10,13 % que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a 1% de probabilidad, para el factor A (medio de cultivo) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), pero no se encontraron efectos significativos para el factor B (morfotipos de arracacha).

Esta diferencia podría atribuirse al manejo que se realizó previo a la siembra en campo y a los cuidados que se tuvo durante la recolección del material, su empaclado y su traslado, que disminuye la contaminación, estimula su desarrollo y acelera el desarrollo celular, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Por su parte Villalobos y Pérez (1991), argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una “programación” influenciada por las condiciones de cultivo *in vitro* conjuntamente con la ganancia de peso. Bravo (1997), consideró que el método de desinfección da resultados eficientes cuando son aplicados en forma correcta previo a la recolección y transporte.

El investigador Okabe (1997), indica que el material vegetal proveniente del campo debe desinfectarse antes de introducirlo a condiciones asépticas. Por esta razón se recomienda introducir el material al invernadero y tratarlo en un período prudente con fungicidas para bajar la incidencia de patógenos endógenos.

El éxito de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos se elabora un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimiento nutricional de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos nutrientes, azúcar y hormonas como el agente gelatinizador (Szabados *et al.*, s.f.).

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 12. Comparación de promedios variable porcentaje de prendimiento, para Medio de Cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de Cultivo
A	79.90	MCA
B	61.99	MCB

Los resultados presentados en el cuadro 12, mediante prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que ambos tratamientos con respecto al medio de cultivo si existe diferencias, teniendo para el medio MCA 79.90 porcentaje de prendimiento y para el medio MCB 61.99 porcentaje de prendimiento

Esta diferencia podría atribuirse a las diferentes concentraciones de nutrientes que tienen los medios de cultivo con los que trabajamos, el medio MCA contiene mayores niveles de nitrógeno que el MCB, cuando un medio tiene alto nivel de nitrógeno generalmente favorece a la oxidación y posteriormente a la necrosis lo cual causa problemas al explante pero los resultados contrarían eso demostrando que es mejor el MCA.

De acuerdo a Margara (1988) citado por Olivera (s.f) menciona que esto podría deberse a que los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos lo cual coincide con nuestros resultado.

En cuanto al medio de cultivo su composición es un factor importante y determinante en el crecimiento, en la investigación se trabajó con dos medios uno concentraciones de sales como el MS a comparación del G5. Al respecto Uribe *et al.* (2008), indica que se conoce que en algunos casos la disminución de la concentración de los medios de cultivo favorece el desarrollo y vigor de los explantes.

En la figura 12 se observa que el M1 presenta un comportamiento diferente en ambos medio de cultivo obteniendo un mayor porcentaje de prendimiento en el medio MCA y el menor porcentaje de prendimiento en el medio MCB.

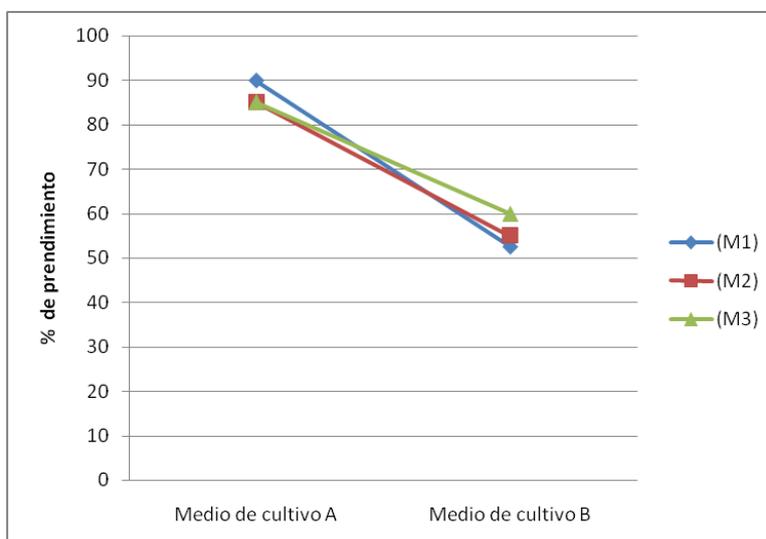


Figura 12. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para porcentaje de prendimiento.

5.2.3 Altura de explante (AE)

El análisis ANVA (Cuadro 11), reportó un coeficiente de variación de 9.97 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para el Factor A (medio de cultivo), Factor B (morfotipos de arracacha) y para la interacción A*B (medio de cultivo* morfotipos de arracacha).

Esta diferencia podría atribuirse a las diferentes concentraciones de sales inorgánicas que contienen los medios, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo de la vitro planta al cambiar el tamaño de la planta; también se cambió el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 13. Comparación de promedios variable altura de explante (cm), para medio de cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de Cultivo
A	2.33	MCA
B	1.65	MCB

En el Cuadro 13, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que existen diferencias en los medio de cultivo, en el medio MCA presenta una mayor longitud de explante con 2.33 cm demostrando un mayor crecimiento, el medio MCB presenta explantes con una longitud 1.65 cm.

De acuerdo a los resultados obtenidos el medio MS permite una mayor longitud de explante esto se debe a que los explantes tuvieron una mejor reacción al medio de cultivo lo que lo que permitió que estas se desarrollen con mayor facilidad, esto podría deberse a que los medios de cultivo tienen diferentes niveles de nutrientes. Según Litz, (s.f.) el medio de cultivo, generalmete usado es el desarrollado por Murashige y Skoog (1962), la concentración alta de sales de este medio parece ser muy beneficiosa para el crecimiento de las vitroplantas.

Investigaciones como de Pérez *et al.* (2010), con medios de cultivo indican que el efecto del medio de cultivo, proporcionando el medio de cultivo MS existe mayor crecimiento, esta respuesta puede estar relacionada con la mayor concentración de sales inorgánicas en comparación con el medio B5 donde la fuente de nitrógeno está en bajas concentraciones o diferentes presentaciones.

La deficiencia del nitrógeno conduce a un desarrollo lento de la planta, afectando la elongación de los tejidos y la producción de órganos (Aular y Rojas, 1994). Resultados similares fueron señalados por Vélchez *et al.* (2007) y Arumon y Roychowdhury (2008) quienes lograron mayor número y longitud de brotes utilizando el medio de cultivo MS.

Cuadro 14. Comparación de promedios variable altura de planta (cm), para morfotipo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Morfotipo
A	2.23	M3
A	2.23	M2
B	1.85	M1

Los resultados presentado en el Cuadro 14, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$, representan los promedios en longitud se puede observar que morfotipo raíz amarillo intenso y raíz blanco presentan la mayor longitud con promedio de 2.33 cm de altura y un segundo grupo morfotipo raíz amarillo claro con un comportamiento diferente que representa una altura promedio de 1.85 cm.

El morfotipo de raíz amarillo claro presento un promedio de elongación de 2.33 cm pero estas presentaron un leve necrosamiento del explante en el medio de cultivo. Esto nos indica que la longitud del brote está relacionada con los porcentajes de contaminación y necrosamiento que son causados por la oxidación del explante hacia el medio de cultivo que influye la longitud a desarrollarse.

Sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan. Así mismo las arracachas de raíz amarillo intenso y raíz blanca son morfotipos que presentan una gran capacidad de elongación en ambientes naturales o en la agricultura convencional (Placencio, 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos las vitroplantas obtenidas del morfotipo raíz amarillo y raíz blanco presentaron mayor elongación y no se observó necrosamiento del explante.

En quela Figura 13, se observa que el M3 presenta un comportamiento diferente en ambos medios de cultivo teniendo una mayor longitud de vitroplanta y un comportamiento similar entre los M2 y M1 en el medio de cultivo.

Con respecto al medio las vitroplantas presentaron una mayor longitud en el medio de cultivo A y en el medio cultivo B una longitud menor.

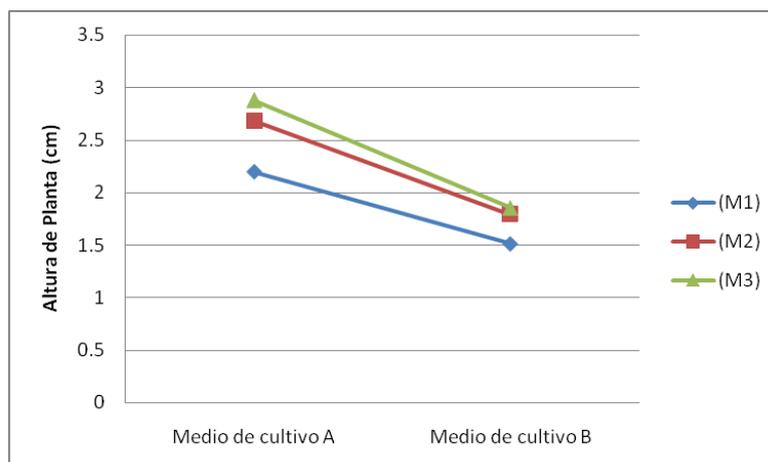


Figura 13. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para altura de explante.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observan que las diferencias encontradas en los promedios de longitud de explante de los diferentes morfotipos son debidas a sus características genéticas y la influencia de los nutrientes presentes en el medio. Y que existió una mejor respuesta al medio MCA respecto al MCB.

5.2.4 Diámetro de Corona (DC)

El análisis ANVA (Cuadro 11), reportó un coeficiente de variación de 10.24 % lo que muestra un manejo homogéneo de todas las unidades experimentales, así mismo nos muestra que existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para el Factor A (medio de cultivo), Factor B (morfotipos de arracacha) y para la interacción A*B (medio de cultivo* morfotipos de arracacha).

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 15. Comparación de promedios variable diámetro de corona (cm),
Para medio de cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de Cultivo
A	1.01	MCA
B	0.69	MCB

En el Cuadro 15, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se observa que existen diferencias en los medio de cultivo, en el medio MCA presenta una mayor diámetro de corona con 1.01 cm demostrando un mayor crecimiento, el medio MCB presenta explantes con diámetro de corona con 0.69 cm.

Cuadro 16. Comparación de promedios variable diámetro de corona (cm), para
Morfotipo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Morfotipo
A	0.95	M1
B	0.84	M2
B	0.82	M3

Los resultados presentado en el Cuadro 16, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, representan los promedios de diámetro se puede observar que el M1 presentan el mayor diámetro con un promedio de 0.95 cm y un segundo grupo con un comportamiento similar entre el M2 y M3 que presentan un diámetro promedio de 0.84 a 0.82 cm.

El desarrollo del tallo está en función al estado intrínseco de la planta por lo tanto el grosor o diámetro del tallo en este caso pseudo tallo (la corona) son características unidas las condiciones donde se desarrollan y sobre todo al morfotipo. La diferencia de los resultados entre morfotipos está relacionada con la capacidad de regeneración del explante para la formación de nuevas células, que viene determinado por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma Pierik (1990).

Así mismo las arracachas de raíz morfotipo raíz blanca y raíz amarillo claro son morfotipos que presentan una gran capacidad de producción de hijuelos y raíces en ambientes naturales o en la agricultura convencional (Placencio, 2012)

En quela Figura 14, se observa que el M1 presenta un comportamiento diferente en ambos medios de cultivo teniendo mayor diámetro de corona en las vitroplántulas y un comportamiento igual tiene M2 y M3 en el medio de cultivo. Con respecto al diámetro de corona los morfotipos presentaron un mayor diámetro, en el medio de cultivo MCA y en el medio MCB un menor diámetro.

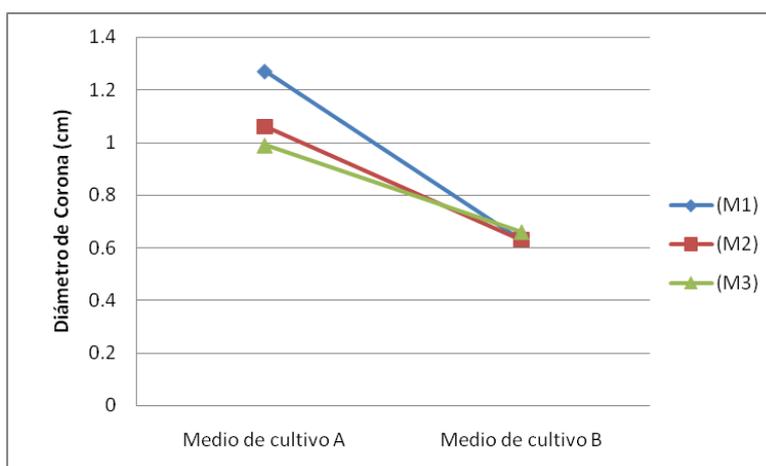


Figura 14. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para diámetro de corona

5.2.5 Número de brotes por explante (NBE)

El ANVA cuyos resultados se muestran en el Cuadro 11, reportó un coeficiente de variación de 13.66 % lo que muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para el Factor A (medio de cultivo), Factor B (morfotipos de arracacha) y para la interacción A*B (medio de cultivo* morfotipos de arracacha).

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de nutrientes que afectan e inciden en la formación de brotes, sumado a esto el manejo que se realizó previo a la siembra y durante la toma de muestras, sin olvidar que el tipo de corte empleado durante la toma de muestra, los cuidados que se tuvo durante el proceso de siembra; lo cual estimula su desarrollo y acelera el desarrollo celular, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas.

Esta respuesta puede estar relacionada con la disminución de sales minerales o la variación en la composición del medio de cultivo B5 en comparación con el medio MS, especialmente en la ausencia de NH_4NO_3 , KH_2PO_4 . Sin embargo, las fuentes de nitrato, ión amonio y fosfato en el medio B5 son proporcionadas por otros compuestos como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KNO_3 (Pérez *et al.*, 2010).

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 17. Comparación de promedios variable Numero de Brotes, para Medio de Cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de cultivo
A	5.40	MCA
B	4.40	MCB

Los resultados presentado en el Cuadro 17, mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$ se observan que en ambos tratamientos con respecto al medio de cultivo existen diferencias significativas teniendo para el medio MCA 5.40 brotes por explante y para el medio MCB 4.40 brotes por explante, esto indica que existe diferencias en la proliferación de brotes en los medios empleados.

En el Cuadro 17, se observa que la aplicación de ambos medios tiene diferencias significativas en los índices de introducción en los morfotipos estudiados y esto se debe a que los medios presentan diferentes niveles de nutrientes.

Según Perez *et al.* (2010), la respuesta producida con el medio de cultivo B5 para el menor número de brotes pudiera ser consecuencia de la menor concentración de nitrato y distinta fuente en el medio de cultivo. Cabe destacar que el nitrato representa una de las formas más asimilables de nitrógeno por parte de la planta, que promueve la formación de nuevos brotes.

Para el trabajo de investigación se utilizó dos medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) y Gamborg *et al.* (1968), adicionando sacarosa, reguladores de crecimiento (ANA, BAP y GA3) y gelificante agar, para todas las morfotipos. Merino (1997) indica que el éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también el empleo de tejidos viables y la calidad de reactivos, usando las sustancias químicas necesarias y combinaciones apropiadas nutrientes.

Cuadro 18. Comparación de promedios variable días Numero de brote, para morfotipo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Morfotipo
A	5.70	M2
A	5.70	M1
B	5.05	M3

Los resultados presentado en el Cuadro 18, de la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, representan los promedios de brotes de los tres morfotipos en la cual se aprecia la formación de dos grupos de las cuales los M2 y M1 tuvieron un mayor promedio en la formación de brotes con 5.70, el segundo grupo conformado por el morfotipo raíz amarillo intenso presenta un promedio de 5.05 brotes por explante.

Esta diferencia podría atribuirse a que las diferentes concentraciones de nutrientes especialmente macronutrientes que afectan e inciden en la formación de brotes, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo del brote al cambiar el tamaño de la planta también se cambio el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas y su respuesta a las condiciones del medio en el que se desarrollan.

El morfotipo raíz blanca y raíz amarillo claro tienen una gran capacidad de producción de brotes tanto *in vivo* como *in vitro* y estos se desarrollan mejor en el medio MS.

La diferencia de los resultados entre morfotipos está relacionada con la capacidad de regeneración del explante para la formación de brotes, que viene determinado por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma Pierik (1990). Así mismo las arracachas de raíz morfotipo raíz blanca y raíz amarillo claro son morfotipos que presentan una gran capacidad de producción de hijuelos en ambientes naturales o en la agricultura convencional (Placencio, 2012).

Como se observa en la Figura 15, el morfotipo M3 y M2 mostraron mayor número de brotes en el medio de Cultivo A con 7.10 brotes por explante en comparación de medio de cultivo B en el cual se registró 4.40 brotes por explante. Y podemos apreciar que el M1 se comportó de manera similar en ambos medios con un promedio de 5.07 brotes por explante.

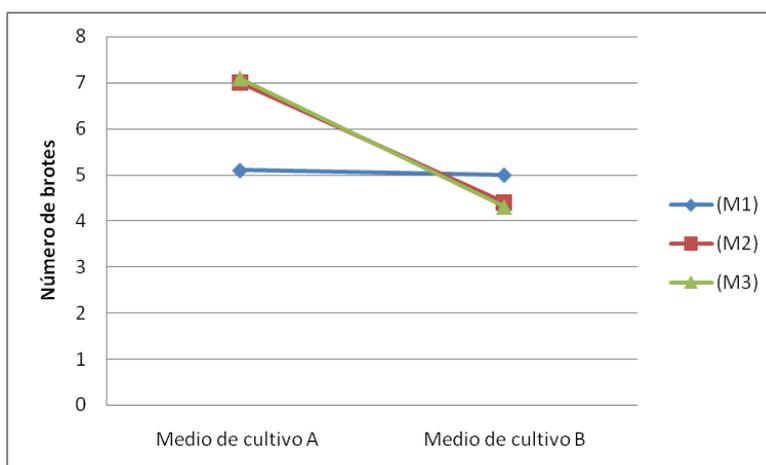


Figura 15. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para número de brotes

5.2.6 Número de hojas (NH)

El ANVA cuyos resultados se muestran en el Cuadro 11, donde reporta un coeficiente de variación de 18.99 % muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para el Factor A (medio de cultivo), Factor B (morfotipos de arracacha) y para la interacción A*B (medio de cultivo* morfotipos de arracacha).

Esta diferencia podría atribuirse a las diferentes concentraciones de sales inorgánicas de los medios aplicados que afectan e inciden en la formación de

hojas, sumado a esto el manejo que se realizó durante el desarrollo de la vitroplanta, al cambiar el tamaño de la planta también se cambio el tamaño del contenedor para facilitar el desarrollo, sin olvidar el comportamiento propio de la especie, determinada por sus características genéticas.

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 19. Comparación de promedios variable Numero de Hojas, para Medio de cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de Cultivo
A	2.73	MCA
B	2.33	MCB

Los resultados presentado en el Cuadro 19, mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, indica que existe diferencias en la formación de hojas en medio MCA y MCB, teniendo la mayor formación de hojas en el medio MCA con 2.73 hojas por explante y en el medio MC B de 2.33 hojas por explante como promedio.

El medio MS presento una mayor emisión de hojas, en cambio en el medio MC B no se observa un número significativo de hojas por esto podría deberse a los niveles de nitrógeno en los medios, el MCA presenta mayores niveles de nitratos con respecto al MCB.

Perez *et al.* (2010), señala que cabe destacar que el nitrato representa una de las formas más asimilables de nitrógeno por parte de la planta, que promueve la formación de nuevas hojas, Barwale *et al.* (1986) señalan que las deficiencias de nitrógeno originan un número bajo de brotes por explante, con tallos finos y cortos con hojas pequeñas.

Cadavid (2000), el nitrógeno tiene efectos más rápidos en la planta; favorece el crecimiento vegetativo, imparte el color verde a las hojas y regula el uso del

fosforo y potasio. La deficiencia de nitrógeno provoca crecimiento reducido, desarrollo radicular restringido y causas amarillentas de las hojas como síntoma de deficiencia.

Cuadro 20. Comparación de promedios variable Numero de Hojas, para Morfotipo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Morfotipo
A	2.70	M1
A	2.60	M2
B	2.60	M2
B	2.30	M3

Los resultados presentado en el Cuadro 20, mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, de acuerdo a los resultados obtenidos se observa que el morfotipo M1 presenta el mayor promedio con respecto a la formación de hojas con 2.70 hojas por explante y tenemos un similar comportamiento para morfotipo M2 con 2.60 hojas por explante y M3 intenso con 2.30 hojas por explante como promedio.

El morfotipo raíz blanca y raíz amarillo claro tienen una gran capacidad de producción de hojas en condiciones *in vitro* y el morfotipo raíz amarillo intenso tuvo el menor número de hojas.

La diferencia de los resultados entre morfotipos está relacionada con la capacidad de regeneración del explante para la formación de hojas, que viene determinado por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma Pierik (1990).

Pero podemos señalar las arracachas de raíz morfotipo raíz blanca y raíz amarillo claro son morfotipos que presentan una menor capacidad de producción de hijuelos en ambientes naturales o en la agricultura convencional, al contrario el morfotipo de raíz amarillo intenso obtiene mayor formación de hojas en esas condiciones (Placencio, 2012).

En la figura 16, se observa que el morfotipo M1 presenta casi un comportamiento similar en ambos medios de cultivo teniendo un mayor número de hojas y un comportamiento parecido tienen el (M2) y (M3) los cuales tienen un mayor número de hojas en el medio MCA y menor en el MCB.

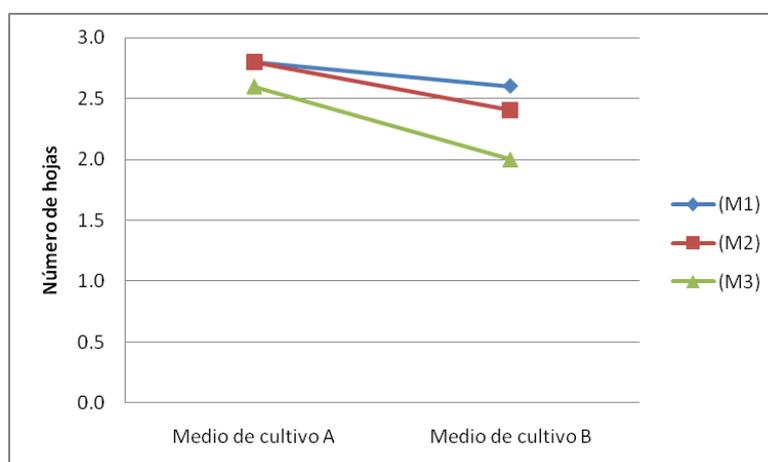


Figura 16 . Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para número de hojas

El desarrollo de las hojas están en función al estado intrínseco de la planta por lo tanto el número, longitud y ancho de las hojas, son características unidas las condiciones donde se desarrollan y sobre todo a la variedad, también se cuenta la variación de dichas características en la introducción, en una primera y segundo ciclo de multiplicación (Lassoudiere,1987).

En condiciones *in vitro* respecto al número de hojas, el morfotipo (M1) se comporta mejor obteniendo un número superior y el morfotipo (M3) logra el menor número de hojas, los dos se comportan al inverso que en condiciones normales.

5.2.7 Materia húmeda (MH)

El ANVA materia húmeda cuyos resultados se muestran en el Cuadro 11, donde reporta un coeficiente de variación de 13,14 % muestra un manejo homogéneo de las unidades experimentales, así mismo existen diferencias altamente significativas a un 1% de probabilidad, para el Factor A (medio de cultivo), Factor B (morfotipos de arracacha) y para la interacción A*B (medio de cultivo* morfotipos de arracacha).

Se requiere de tecnología para la óptima regeneración de brotes y regeneración de vitroplantas de calidad, características determinadas por el genotipo y afectadas por el ambiente (Enriquez *et al.*, 1998).

En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación de medias para el factor A (medio de cultivo), factor B (morfotipos de arracacha) y la interacción A*B (medio de cultivo*morfotipos de arracacha), cuyos resultados se muestran en los siguientes cuadros y figura.

Cuadro 21. Comparación de promedios variable Materia Húmeda (gr), para Medio de Cultivo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Medio de Cultivo
A	3.33	MCA
B	3.06	MCB

Los resultados presentados en el Cuadro 21, mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, indica que existe diferencias en la formación materia húmeda en medio MCA y MCB teniendo la mayor formación materia húmeda en el medio MCA con 3.33 gr por explante y en el medio MCB de 3.06 gr de materia húmeda por explante como promedio.

Los resultados obtenidos para materia húmeda se atribuirían a que el medio MCA tiene alto contenido de nitrógeno respecto al MCB. Otros trabajos que evaluaron medios de cultivo encontraron respuestas similares a la investigación, Cárdenas (1995), indica que el medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) promovió mayor peso fresco comparado con el medio de Gamborg, Miller y Ojima (1968).

Mientras que Fuentes-Carvajal *et al.* (2006) estudiaron la deficiencia N, P y K en el cultivo hidropónico de zábila, evidenciándose ciertas limitaciones en el desarrollo vegetativo de las plantas, especialmente en las dimensiones foliares, longitud radical, biomasa.

Cuadro 22. Comparación de promedios variable Materia Húmeda (gr), para Morfotipo, según la prueba de Duncan al 5%

Duncan	Media	Morfotipo
A	3.40	Raíz Amarillo Intenso
B	3.35	Raíz Blanco
B	2.97	Raíz Amarillo Claro

Los resultados presentados en el Cuadro 22, mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, representan los promedios de materia húmeda de los tres morfotipos, en la cual se aprecia la formación de dos grupos de los cuales el morfotipo raíz amarillo intenso tuvo un mayor promedio en la formación de materia húmeda o fresca con 3.40 gr el segundo conformado por morfotipo raíz blanco y raíz amarillo claro presentan promedios que varían de 3.35 gr y 2.97 g.

Por su parte Villalobos y Thorpe (1991) argumentan que la diferenciación *de novo* está ligada a la proliferación celular y la organización de las nuevas células sigue una “programación” influenciada por las condiciones de cultivo *in vitro* conjuntamente con la ganancia de peso.

Rauber y Grunewaldt (1988), quienes mencionan que la habilidad para regeneración de brote está controlada fuertemente por el genotipo.

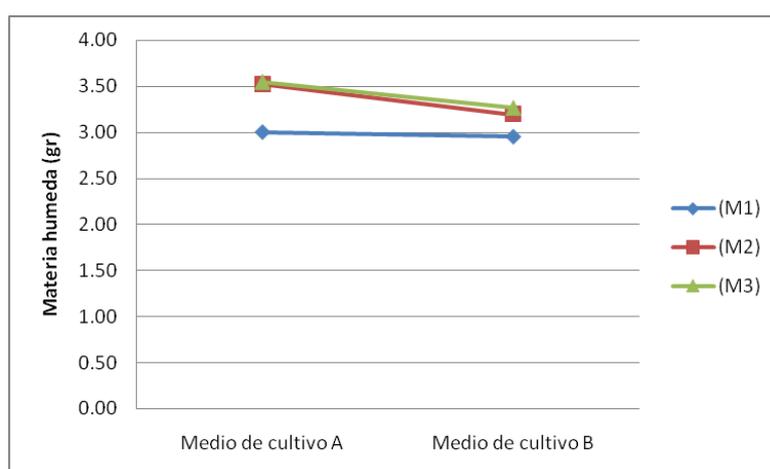


Figura 17. Interacción medio de cultivo por morfotipos de arracacha para materia húmeda

En la figura 17, se observa que el comportamiento de los morfotipos se dividen en dos grupos, el primero conformado por (M2) y (M3) con un mayor peso de materia húmeda o fresca en el medio de cultivo MCA que en el medio de cultivo MCB y un segundo el (M1) que forma peso de materia húmeda o fresca similar en ambos medios.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sánchez y Cuevas (2001), quienes lograron obtener los mejores resultados de sobrevivencia de 80% de explantes de pimentero, libres de oxidación, con la adición de polivinil pirrolidona PVP (0,5 y 1,0 g/l) en presencia de luz.

De acuerdo con Davies y Creasy, citados por George y Sherington (2000), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja. Por último, no es frecuente observar oxidación de tejidos de otros cultivo y son pocos los cultivares que presentan ennegrecimiento (Villalobos y Pérez, 1991).

VI. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

Después de discutir los resultados obtenidos y de acuerdo a los objetivos propuestos se llegó a las siguientes conclusiones:

Etapa de desinfección

La utilización de hipoclorito de sodio en las concentraciones de 1, 1, 2 y 2 % v/v y los tiempos de inmersión de 15, 20, 15 y 20 minutos, correspondiente a los tratamientos A8, A7, A6 y A5 son ineficaces para la eliminación de agentes patógenos en la introducción de explantes de arracacha, resultando ser los tratamientos con más altos porcentajes de contaminación con 65, 55, 47.5 y 32.5%.

Los tratamientos desinfectantes A1 (4 % de NaClO durante 15 min), A2 (4 % de NaClO durante 10 min) y A3 (3 % de NaClO durante 15 min) resultaron ser efectivos para la obtención de explantes asépticos, pero la concentración y el tiempo de inmersión resultaron posteriormente ser muy perjudiciales causando necrosis en los explantes de 87.5, 70 y 60%.

Una desinfección efectiva previno la contaminación de los ápices vegetativos provenientes de los hijuelos de arracacha, el cual se logró sumergiendo los explantes en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% durante 10 min perteneciente al tratamiento desinfectante A4, este tratamiento mostró ser óptimo para la desinfección inicial de ápices vegetativos de *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft debido a que a través de este procedimiento los explantes fueron menos afectados (menor incidencia de necrosis y rápida regeneración del explante).

Todos los tratamientos desinfectantes presentaron en diferentes niveles de oxidación, pero sobresalieron los tratamientos A1, A2 y A3 con porcentajes de 60, 50 y 40%, que posteriormente causaron necrosis a los explantes, los tratamientos A4, A5, A6, A7 y A8 tuvieron una oxidación del 25%. Para reducir la oxidación se utilizó ácido cítrico.

Etapa de introducción *in vitro*

Los porcentajes de contaminación en esta etapa de introducción *in vitro* 13.42% en comparación con la experimentada inicialmente que fue de un promedio del 30.06%.

De acuerdo a las respuestas obtenidas se observó que en el medio de cultivo (A y B) si existen diferencias altamente significativas en las variables de respuesta estudiadas (porcentaje de prendimiento, altura de planta, diámetro de corona, número de brotes por explante, número de hojas y materia húmeda). Pero resaltando que en el medio A se observó un mayor desarrollo.

El medio adecuado para altura de explante es igual para cada uno de los morfotipos, para el M3, M2 y M1 el mejor medio es el MCA logrando promedios de 2.88, 2.68 y 2.2 cm respectivamente, en el medio MCB observándose menor desarrollo con 1.85, 1.71 y 1.51cm. Para número de hojas existió una mejor respuesta de los morfotipos M1, M2 y M3 al MCA con 2.8, 2.8 y 2.6 hojas y en el MCB se observó 2.6, 2.4 y 2.0 hojas por explante.

Se determinó el comportamiento *in vitro* de los tres morfotipos de *Arracacia xanthorrhiza* Bacroft. en los dos medios de cultivo (MCA y MCB), las cuales obedecen características fenotípicas y genotípicas de cada morfotipo.

Se estableció que el medio adecuado para la introducción de las morfotipos de arracacha es el MCA logrando alcanzar la formación promedio de 5.4 brotes por explante en comparación del medio MCB con 4.4 brotes. Los morfotipos M1 y M2 tuvieron una formación de 7.10 y 7.00 en el MCA, en el MCB se observa 4.40 y 4.30 y el M3 se presentó un comportamiento casi similar en ambos medios.

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten inferir que las concentraciones de nutrientes del medio de cultivo y el manejo realizado al explante durante la fase de introducción influyen en la capacidad regenerativa del tejido para obtener un mayor número de brotes; lo que garantizaría un aumento de la productividad y eficiencia para la fase de multiplicación para la propagación *in vitro* de arracacha.

6.2 Recomendaciones

Realizar estudios de aplicación de antioxidantes y concentraciones para la reducir la oxidación en el proceso de desinfección para el establecimiento *in vitro* de arracacha.

Se recomienda continuar con el proceso de aclimatación para conocer los problemas existentes antes de la salida a campo de las *vitroplantas* obtenidos en el presente trabajo.

Finalmente, se recomienda proseguir estudios para establecer medios de hormonas (sintéticas y naturales), y concentraciones para la siguiente fase de cultivo para multiplicación *in vitro*.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ABDELNOUR, A y ESCALANTE, J. 1999. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Editorial del CATIE. 38 p.

ÁLVAREZ, V.H. 2001. Manejo y conservación in-situ de mauk'a (*Mirabilis expanda*, R. y P.) Standy, Yacon (*Smallanthus sonchifolius*, H. Robinson) y Racacha (*Arracacia xanthorrhiza*, Bancroft) en la Comunidad de Chullina, Provincia bautista Saavedra del departamento de La Paz. Tesis (Ing Agr). Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia pp 73-143.

AMAYA, J. E. y JULCA, J. L. 2006. "Arracacha" *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Biodiversidad y Conservación de los Recursos Filogenéticos Medio Ambiente. s/ed. Trujillo, Perú. 15 p.

AMIN, W. y JAUWAL, F. 2003. Culture. Techniques for Micropropagation and Breeding. Macmillan Publishing. USA. pp. 82-123.

AÑEZ, B.; ESPINOZA W y VASQUEZ W. 2002. Producción de apio andino en respuesta al suministro de fertilizantes. Universidad los andes, instituto de investigaciones agropecuarias (I.I.A.P.), Mérida – Venezuela pp 40 – 42. (En línea) consultado 16 de junio. 2010. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve>.

ARIAS, O. (1993). Comercial Micropropagation of Banana. Biotechnology applications for banana and plaitain improvement. INIBAP. Montpellier, Francia. pp. 139-142.

ARUMON, M. y ROYCHOWDHURY, B. 2008. The *in vitro* propagation of *Aloe vera* sp. TIG Research Journal 1(2): pp 116-118

AULAR, J. y ROJAS, E. 1994. Influencia del nitrógeno sobre el crecimiento y producción de parchita *Passiflora edulis* Sims. F. Flavicarpa Degener. Agronomía Tropical. 44(1): pp 121-134.

BARBA, A.; LUNA, B.; ROMERO, J. 2001. Micropropagación de Plantas. Ed. Trillas. Distrito Federal, México. pp 7-8

BARWALE, U.; KERNS, H. y M. WIDHOLM. 1986. Plant regeneration from callus culture of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta. 167: pp 473-481

BLAS, R. 1996. Determinación del número de cromosomas de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Tesis Ing. Agr., Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru .

BLAS, R. 2005. Diversity of Arracacia species in Peru. Ph. D. thesis. Genbloux Agricultural University, Belgium, 154 p.

BLAS, R.; **JULCA** A. y **BAUDOIN** J.P. 2006. Inducción floral de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). IDESIA Vol. 24. Chile. pp. 31-36

BORGES, R.; **URIZAR**, M., **FLORES** R. y **RODRÍGUEZ** E. 2005. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder).

BRAVO, F. 1997. Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* para los explantes nodales de caoba (*Swietenia macrophylla* King.). Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.

BURO, R. 2001. Validación del protocolo de micropropagación de musáceas en cinco líneas comerciales pertenecientes al clon Williams. Instituto tecnológico de costa rica. Escuela de biología. Departamento de ingeniería en biotecnología. Cartago, Costa Rica. (En línea) Consultado 25 de may. 2010. Disponible en: <http://bibliodigital.itcr.ac.cr:8080/dspace/bitstream/2238/209/1/FINAL2.pdf>

BUSTAMANTE, P. G.; **CASALI**, V.W.W.; **SILVA**, E.A.M. da; **CEMON**, P.R. s.f. biología floral da Imandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) In: Relatorio de Pesquisa: Projeto Olericultura 87/92. Belo Horizonte_MG:EPAMIC, pp.215-217.

CACERES, E. 1993. Cultivos Andinos. Oruro, Bolivia: FM. pp 10-25

CADAVID, L.F. 2000. La fertilización de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en la región de Montano y pescador, Cauca. Suelos Ecuatoriales. 81 p.

CARDENAS, K. X. 2008. Efecto de la harina de corona de racacha en la dieta en cerdos de engorde de la raza mejorada Camborroug en la comunidad de Loma Liquinas-Cochabamba. Tesis (Ing Agr). Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia pp 11-71

CÁRDENAS, M. L. 1995. Cultivo *in vitro* de brotes de "ajo" *Allium sativum* L. de tres variedades obtenidas en Marín, N. L. México. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas Nuevo León, México. 42 p.

CASTILLO, G. 2004. Desarrollo de Métodos Cromatográficos para la Determinación de Giberelinas y Auxinas para el estudio de su Biosíntesis. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad de la Habana

CONDE, E. 2002. Determinacion de una Técnica alternativa para la multiplicación *in vitro* de *Citrus Reshini* Hort. Ex Tanaka. Tesis de Lic. En Biología. Universidad Mayor de San Andres. La Paz, Bolivia. 71p.

DARIAS, R. 1993. Recopilación de temas sobre Técnicas de Cultivos de Tejidos y Células Vegetales. Oruro, Bolivia y Universidad Cienfuegos de Matanzas. s/ed. p169

ENRÍQUEZ, J. R.; **CARRILLO**, G. y **VELÁZQUEZ**, J. 1998. Producción de vitroplántulas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y determinación de la producción de fruto. Montocillo, México. Consultado 25 de mar. 2013. Disponible en:

FUENTES-CARVAJAL, A., **VÉLIZ**, J. y **IMERY**, J. 2006. Efecto de la deficiencia de micronutrientes en el desarrollo vegetativo de *Aloe vera*. INTERCIENCIA. 31(2): pp 116-122.

GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture, Part 2 In practice Segunda Ed. Exegetics Ltd. Edintong, England 632 p

GEORGE, H. y **SHERRINGTON**, B. 2000. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Ixon, R. (Ed). Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press, Oxford, USA. pp. 79-105

GÓMEZ, E. 2002. Fundamentos físico químicos relacionados con el cultivo de tejidos *in vitro*. 21p

GÓMEZ, R. 1999. Aplicaciones de la Biotecnología en la Mejora Genética de plantas y la producción de semillas. Modulo 1. Cultivo *in vitro*. Ed. rev. Santa Clara, Cuba. pp. 32-47

HARTMANN, H. y **KESTER**, D. 1995. Propagación de plantas, principios y prácticas. Mexico, CECOSA. pp 649 - 608 p.

HERMANN, M. 1997. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). In: Andean roots and tubers: Ahipa, Arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Hermann, M. and J. Heller (eds). 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp. 75- 172.

HERMANN, M. s.f. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Centro Internacional de la Papa (CIP). La Molina. Lima, Perú. (En línea) Consultado 25 de may. 2010. Disponible en: http://www.cipotato.org/artc/artc_hermann/Arracacha.pdf

HODGE, W.H. 1954. The edible Arracacha – a Little known root of the Andes. Economic Botany 8: pp 195- 221. Consultado 30 de may. 2012. Disponible en: http://www.redbio.org/rdominicana/redbio2004/Memoria_REDBIO_2004/Talleres-PDF/t18-03.pdf

HURTADO, D. y MERINO, M. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales. Primera Edición. Ed. Trillas. Distrito Federal, México 225p

JIMÉNEZ, E. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ed. rev. Santa Clara, Cuba. pp. 13-24

JIMÉNEZ, E. 1999. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Módulo 4. Propagación masiva de plantas *in vitro*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. 82 p.

JIMÉNEZ, F.S. 2005. Características nutricionales de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. Lima, Perú. (En línea) Consultado 20 de may. 2012. Disponible en:
<http://www.faviolajimenez.com/wp-content/uploads/2012/05/arracacha.pdf>

KNUDSEN, S. 1999. Flower induction in the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). A description and evaluation of the morphological changes following dehydratation. Tesis M. Sc. en Botánica, The Royal Veterinary and Agricultural University Copenhagen, Denmark. 71 p.

LEÓN, J. 1964. Plantas Alimenticias Andinas. Instituto Interamericano de Ciencias agrícolas zona Andina. Lima, Peru. pp 24

LITZ R. E. y JARRET R. L. s.f. Regeneración de Plantas en el cultivo de tejidos: embriogenesis somática y organogenesis. Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural sciences , University of Florida, E.U. (En línea) Consultado 23 de feb. 2013. Disponible en:
<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r67417.PDF>

LÓPEZ, P. 1990. Medios de cultivo: Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Estudio de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)(Rosell y Villalobos) Roma, Italia pp 15-16

MABBERLEY, D.M. 1993. The plant book: A portable dictionary of higher plants utilizing Cronquist's, an integrated system of classification of flowering plants. Cambridge University Press. Cambridge, NY, USA

MADEIRA, N.R.; TEIXEIRA, J.B.; ARIMURA, C.T. y JUNQUEIRA, C.S. 2005. Influência da concentração de BAP e AG3 no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, Brasil. v.23, n.4, p.982-985. (En línea) Consultado 25 de may. 2010. Disponible en:
<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n4/a24v23n4.pdf>

MORÁN, M y CAHO, M (2000). MICROPROPAGACION. Cultivo de Células tejidos y órganos vegetales. Departamento de biotecnología Salamanca, Chile. (En línea) Consultado 20 de may. 2012. Disponible en: http://www.ficologia.cl/cultivo_ahnfeltia.pdf

MUJICA, A.; JACOBSEN, S-E, JUAN, I. y ROCA, W. (2002). Potencialidades de los cultivos andinos, sub utilizados por la biotecnología. Puno, Perú. (En línea) Consultado 25 de may. 2010. Disponible en: <http://www.care.org.pe/pdfs/cinfo/revista/agricultura10.pdf>

MURILLO, R. 2002. Curso de Biotecnología Vegetal. Micropropagación *in vitro*. IBTEN (Instituto Bolivia de Ciencia Tecnología Nuclear). La Paz, Bolivia. Pp 1-12

OKABE, K. 1997. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales (volumen 2) Informe final. ICTA (Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícola). Voluntarios Japoneses en Cooperación Técnica con el Extranjero (JOCV). Bárcena, Guatemala. p. 90.

OLMOS, S. y ERNESTINA. 1998. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 45p.

PÉREZ, J.; ALBANY, N.; VILCHEZ, J.; LEON DE SIERRALTA, S. y MOLINA, M. 2010. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Aloe barbadensis* Mill. Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Departamento de Química PAISSS. Rev. Fac. Agron. pp 447-459

PERLA, H. 2007. Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in vitro*. Tesis (Msc). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 18 p.

PIERIK, R. 1990. Cultivo *in vitro* de Plantas Superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 327p

POCASANGRE, L. 1994. Manual sobre micropropagación de banano y plátano. FIA. La Lima, Honduras pp. 15-43.

POSPISILOVA et al. 1999. Temporal requirements for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. Developmental Biology 112:494.

QUEZADA, J. 1999. Evaluación del Potencial de dos Ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) en el Proceso de Microbulbificación *in vitro*. Tesis (Ing Agr). Escuela Militar de Ingeniería. La Paz, Bolivia. pp 112p

- QUEZADA**, J. A.; **ASCARRUNZ**, M.E. y **SILVA**, M.A. (2000). Evaluación de la Respuesta de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) a la variación de medios y reguladores de crecimiento, en el proceso de microbulbificación *in vitro*. BIOFARBO. La Paz, Bolivia. Vol. VIII. (En línea) Consultado 25 de mar. 2013. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20000814.pdf>
- RAMÍREZ**, N. (1989). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. pp 31-39
- RAUBER**, M. y **GRUNWALDT**, J. 1988. *In vitro* regeneration in *Allium* spp. Plant. Cell. Rep. 7(6): pp 426-429.
- REA**, J, (1995). Manejo y Conservación Comunitaria de Recursos Genéticos Agrícolas en Bolivia. (En línea) Consultado 20 de may. 2010. Disponible en:http://www.grain.org/biodiversidad_files/comp2p21.pdf
- REY**, H. Y.; **MROGINSKI**, L. A. y **SCOCCHI**, A. M. 1995. Embriogénesis somática en especies cítricas por cultivo de núcelas. Argentina. pp. 54-64.
- ROBLES**, A. Y **HASHIMOTO**, J. 2006. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Biodiversidad y conservación de los recursos filogenéticos. Trujillo, Perú. (En línea) consultado 10 agosto. 2009. Disponible en <http://www.regionlalibertad.gob.pe>
- ROCA**, W y **MROGINSKI** L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Publicación CIAT Cali Colombia.
- ROJAS**, F. 2006. Catálogo de plantas. Fac. de Agronomía UMSA. La Paz - Bolivia 78p.
- ROMERO**, P. (2009) Diseños Factoriales. Departamento de Probabilidad y Estadística. Distrito Federal, México. Consultado 19 nov. 2009. Disponible en: <http://www.dpye.iimas.unam.mx/patricia/disenos/notas/factoriales.pdf>
- ROSEL**, C.; **VILLALOBOS**, A. (1990) Fundamentos Teórico-Práctico del Cultivo de tejidos Vegetales. Roma, Italia: s/ed. pp12.
- SANCHES**, G. y **CUEVAS**, D. 2001. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. 45 p.
- SANCHÉZ**, C. 2004. Control de la Oxidación y la Contaminación en el Cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). República Dominicana. pp 14-15.
- SEELVE** *et al.* 2003. Aplicaciones del Cultivo de Tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT. México. 51: 43-59.

SEGRETÍN, M. E. s.f. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Argentina. Consultado 25 de may. 2010. Disponible en: <http://www.argenbio.org/ad/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>

SEMINARIO, J. 2004. Raíces Andinas: Contribuciones al Conocimiento y a la capacitación. Serie Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Universidad de Cajamarca, Centro internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú, 376 p

SZABADOS, L.; **NÚÑEZ**, V.M.; **TELLO**, L. M.; **MAFLA**, G.; **ROA**, J. y **ROCA**, W. s.f. Agentes gelatizadores en el cultivo de Tejidos. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Consultado 25 de mar. 2013. Disponible en: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r66213.PDF>

TAPIA, M. E. 1997. Cultivos subexplotados y su aporte a la alimentación. Oficina Regional de la FAO. Santiago, Chile. pp.104-107.

URIBE, M., **DELAVEAU**, C., **GARCÉS**, M. y **ESCOBAR**, R. 2008. “Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales”. 58-64.

VEGA, C.; **BERMENJO**, J.C.; **VILLEGAS**, G.; **QUESADA**, J.; **AGUILAR**, M. y **CONDE**, E. 2007. Propagación masiva de *Polylepis tomentella* Weddell ssp. *nana* mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

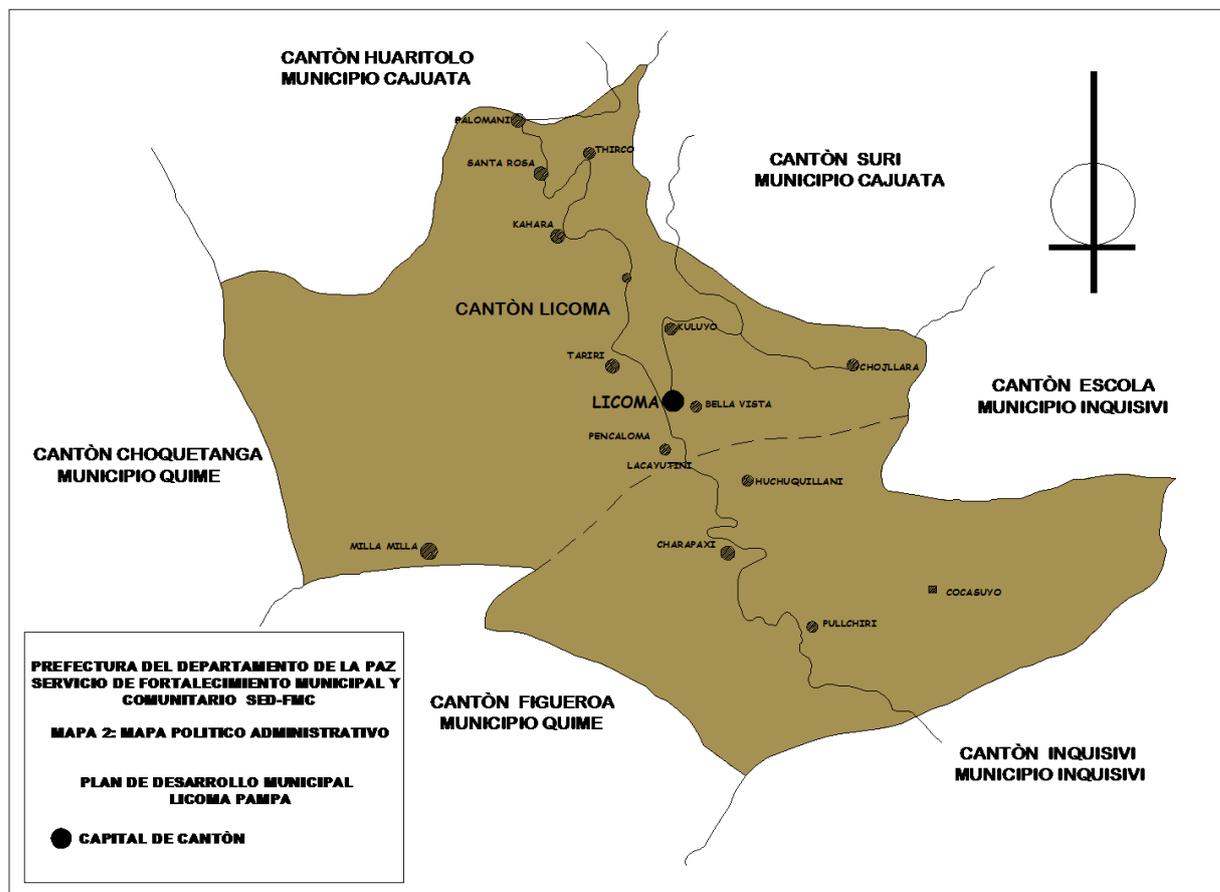
VILCHEZ, J., O. **FERRER** y N. **ALBANY**. 2007. Multiplicación *in vitro* de zábila en sistema de inmersión temporal. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 24 Supl. 1: pp 78-82.

VILLALOBOS, A. y **PÉREZ**, J. 1991. Presentación de resultados experimentales de arándano, Jornada de divulgación 20 de febrero de 1991, Paysandú Uruguay

VILORIA, T. 2003. Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) (Fase II). CONCYT. Informe Final Proyecto 30-00. 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación del lugar de recolección del material vegetal Toriri, Inquisivi



Anexo 2. Fotografías de Hojas e Hijuelos o brotes de los tres morfotipos en estudio



(Morfotipo 1) Amarillo claro



(Morfotipo 2) Blanco



(Morfotipo 3) Amarillo intenso

Anexo 3. Plantas madres cosechadas de arracacha



M1



M2



M3

Anexo 4. Equipos



Autoclave



Destiladora



Microondas



Agitador magnetico



PHmetro



Balanza

Anexo 5. Fotos del estudio



A. selección del material vegetal



B. El proceso de preparación del medio de cultivo



C. Vaso con medio de cultivo más reguladores de crecimiento.



D. proceso de esterilización



E. Proceso de desinfección del material vegetal



F. proceso de siembra de meristemos de arracacha



G. el material en la cámara de desarrollo fase inicial del estudio



H. El desarrollo de los explantes

Anexo 6. Solución Stock de Murashige y Skoog (1962)

Cuadro: Composición del Medio Basal Murashige y Skoog (1962)

Sol.	NOMBRE	FORMULA QUIMICA	PESO (g)	PESO (mg)
A	Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	16.5	16500
	Nitrato de Potasio	KNO_3	19	19000
	Cloruro de calcio di hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4.4	4400
	Fosfato monobásico de potasio	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1.7	1700
	Ácido Bóri Co	$\text{H}_2 \text{BO}_3$	0.062	62
	Sulfato d Magnesio tetra hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2 \text{O}$	0.223	223
	Sulfato de Zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	0.086	86
	Yoduro de potasio	KI	0.83	830
	Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25	250
	Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025	25
	Cloruro de cobaltoso hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025	25
B	Sulfato de Magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	3.7	3700
C	Etilen diamin tetra acetato di sódico	Na ₂ EDTA	0.3725	372.5
	Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	0.2785	278.5
D	Myoinositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1	1000
E	Tiamina - HCl		0.01	10
	Glicina		0.05	50
	Ácido nicotínico		0.0125	12.5
	Piridoxina - HCl		0.0125	12.5

PROCEDIMIENTO.

Al preparar soluciones stock se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las sales deben disolverse por separado.
- No se deben mezclar sulfatos con fosfatos para evitar que se precipiten.
- Las soluciones stock deben ser guardados en frascos color ámbar puesto que se llegan a precipitar con la luz directa.
- La solución stock de vitaminas debe ser guardada en congelación, las otras soluciones se deben guardar en refrigeración a 4 °C.
- La preparación de soluciones requiere agua destilada, bidestilada y desionizada.

f) Las soluciones Stock deben ser chequeadas periódicamente para ver si están contaminadas por bacterias (la apariencia de solución es lechosa) y hongos (presencia de micelios).

g) Las auxinas que están en forma ácida deben disolverse en KOH o NaOH (1N). Se utiliza aproximadamente 0.3-1.2 ml de HCl y de KOH por cada 10 mg de regulador de crecimiento para disolverlos.

Preparación de las soluciones Stock.
Solución Stock de Murashige y Skoog (1962).

Esta primera solución concentrada, es la combinación de diferentes sales preparadas en cinco partes, las cuales son: Solución A, B, C, D y E, cuya composición para la preparación es la siguiente:

A) SOLUCIÓN “A”X 10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

NOMBRE	FORMULA QUÍMICA	PESO (g)	PESO (mg)
Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	16.5	16500
Nitrato de Potasio	KNO_3	19	19000
Cloruro de calcio di hidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4.4	4400
Fosfato monobásico de potasio	$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1.7	1700
Ácido Bórico	$\text{H}_2 \text{BO}_3$	0.062	62
Sulfato d Manganoso tetra hidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2 \text{O}$	0.223***	223
Sulfato de Zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2 \text{O}$	0.086	86

*** Si el sulfato es $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2 \text{O}$ (Monohidratado), pesar 0.151 g

Todas estas sales pesar en forma individual y disolver en 20 – 50 ml de agua destilada y verterlos en una probeta de 1000 ml de capacidad que tenga 250 ml de agua destilada desionizada en agitación.

En forma individual, disolver cada uno de las siguientes sales en 100 ml de agua destilada.

NOMBRE	FORMULA QUIMICA	PESO (g)	PESO (mg)
Yoduro de potasio	KI	0.83	830
Molibdato de sodio dihitratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25	250
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025	25
Cloruro de cobaltoso hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.025	25

De estas presoluciones pipetear a la solución stock en agitación:

- 8,2 ml de KI
- 2,5 ml de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,25 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- 0,25 ml de $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

La solución stock enrasar a un litro en un probeta de 1000 ml.

B) SOLUCIÓN “B” X 10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Pesar 3.7 de Sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y disolver en 500 ml de agua destilada.

C) SOLUCIÓN “C” X 10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

NOMBRE	FORMULA QUIMICA	PESO (g)	PESO (mg)
Etilen diamin tetra acetato di sódico	Na_2EDTA	0.3725	372.5
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2785	278.5

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

D) SOLUCIÓN “D” X 10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Disolver en 500 ml de agua destilada 1 g de Myo-inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

E) SOLUCIÓN “E” X 10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

VITAMINAS	PESO (g)	PESO (mg)
Tiamina - HCl	0.01	10
Glicina	0.05	50
Ácido nicotínico	0.0125	12.5
Piridoxina - HCl	0.0125	12.5

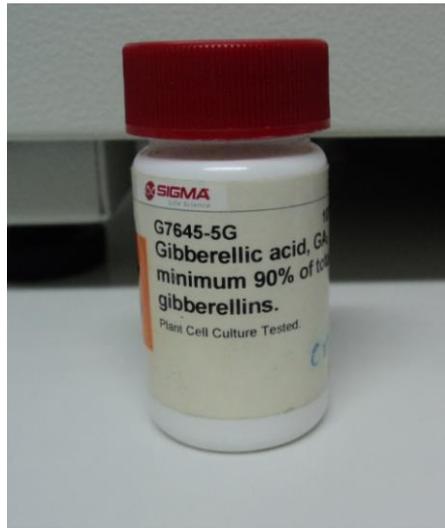
Disolver cada vitamina y completar hasta 250 ml con agua destilada.

Anexo 7. Solución Stock de Gamborg *et al.* (1968).

Componentes	Concentración (mg/L)	
	Medio de cultivo	Solucion Madre
Macronutrientes		10X
KNO ₃	2500	25000
MgSO ₄	122.1	1221
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	130.5	1305
CaCl ₂ *2H ₂ O	113.2	1132
(NH ₄) ₂ *SO ₄	134	1340
Micronutrientes		10X
MnSO ₄ *H ₂ O	10	100
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2	20
H ₃ BO ₃	3	30
KI	0.75	7.5
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.025	0.25
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.025	0.25
Na ₂ Mo ₄ *H ₂ O	0.25	2.5
Solucion de hierro		
FeSO ₄ *7H ₂ O	27.8	278
Na ₂ EDTA	37.3	373
Vitaminas		10X
Tiamina-HCl	10	100
Ac. nicotínico	1	10
Piridoxina-HCl	1	10

Fuente: George, 1996

Anexo 8. Reguladores de Crecimiento usados en la introducción



Anexo 9. Descripción de los hongos detectados e identificados durante el cultivo *in vitro* de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft).

Hongo	Descripción del hongo
<i>Aspergillus</i> sp.	Conidioforos erectos, simples, terminando en un ensanchamiento, globoso o clavado, presentando fialides en el ápice o en toda la superficie; conidios (fialoesporas) unicelulares, globosa, a menudo de variados colores en masa, en cadenas secas basipetalas.
<i>Cladosporium</i> sp.	Conidioforos largos, oscuros, erectos, ramificados en el ápice, simples o agrupados; conidios (blastoporas) oscuras, de 1-2 células, variables en forma y tamaño, ovoides a cilíndricas e irregulares, algunas típicamente en forma de limón.
<i>Curvularia</i> sp.	Conidioforos marrones, simples, con esporas apicales o en nuevos puntos de crecimiento simpodiales; conidios (poroesporas) oscuras, células terminales claras, de 3-5 células, mas o menos fusiformes, típicamente curvadas, con una de las células centrales más alargada.
<i>Fusarium</i> sp.	Micelio extensivo y algodonoso en medios de cultivo, a menudo con una coloración rosada, púrpura o amarilla, en el medio o en el micelio; conidioforos variables, simples y suaves, o rígidos, cortos, ramificados irregularmente o presentando un conjunto de fialides simples o agrupados en un esporodoquio; conidios (fialoesporas) hialinos, variables, principalmente de dos tipos, a menudo formadas en pequeñas cabezuelas húmedas. Macroconidios con varias células ligeramente curvadas o dobladas en los extremos, típicamente en forma de canoa; microconidios unicelulares ovoides u oblongos, individuales o en cadenas; algunos conidios intermedios, de 2-3 células, oblongos o ligeramente curvados.
<i>Alternaria</i> sp.	Conidioforos oscuros, generalmente simples, cortos o elongados, típicamente con conidios (poroesporas) oscuras, típicamente con septos longitudinales o transversales; de forma variada, obclavados a elípticos, u ovoides, frecuentemente formados acropetalmente en cadenas largas; en algunas instancias formados individualmente y presentando un apéndice apical simple o ramificado.