

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



TESIS DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA FASE DE
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PAPA (*Solanum tuberosum* sp.) DE LA
VARIEDAD HUAYCHA PACEÑA**

Presentado por:

JEANET MARIELA GALLO FRANCO

La Paz - Bolivia

2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE PAPA (*Solanum tuberosum* sp.) DE LA VARIEDAD HUAYCHA PACEÑA

TESIS DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO

JEANET MARIELA GALLO FRANCO

Asesor (es):

Ing. Rafael Adolfo Murillo García

Tribunal Examinador

Ing. René Calatayud Valdez

Ing. M.Sc. Carlos López Blanco

Ph.D. Alberto Figueroa Soliz

Aprobada:

Presidente Tribunal Examinador:

LA PAZ - BOLIVIA

2019

DEDICATORIA:

A Dios sobre todas las cosas, que nos de valor, sabiduría y guiarme para seguir adelante.

Con mucho cariño a mi padre Felipe Marcos Gallo, a mi madre Martha Franco Marzo, por su inmenso apoyo, cariño y sacrificio al ser un modelo de vida, que contribuyeron incondicionalmente a mi formación como persona y como profesional, a mis hermanas y hermanos por su amor, comprensión y constante apoyo moral, durante estos años.

También dedicar el presente trabajo a mi pareja Reynaldo, a mi hijo, porque son mi fuerza para seguir adelante y a mis amigos de la Facultad de Agronomía por su constante motivación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir y hacer posible este momento y cumplir con una de mis metas de ser profesional.

A mis padres Felipe Gallo y Martha Franco por su apoyo constante durante mi formación académica, muchas gracias.

A mis herman@s, Rosmery, Erika, Jhessica, Edgar, Alex y Noel Gallo Franco por los ánimos de motivación a seguir adelante.

A la U.M.S.A. Facultad de AGRONOMÍA, a sus autoridades y docentes por su amistad y enseñanza en bien de mi formación académica universitaria.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía UMSA, por el apoyo y recursos en la realización del trabajo de investigación.

Al Proyecto “Obtención de semilla pre básica de variedades nativas de papa (Huaycha e Imilla negra) a través de técnicas de cultivo *in vitro* para mejorar la seguridad y soberanía alimentaria”.

Al Ing. Rafael Adolfo Murillo García, mi asesor y Coordinador del Proyecto, gracias por su valiosa colaboración, orientación, apoyo, experiencia, entusiasmo, para la ejecución de la investigación quien de manera interesada me transmitió sus conocimientos y me brindo su amistad.

A mis revisores Ing. René Calatayud Valdez, Ing. M.Sc. Carlos López Blanco y Ph.D. Alberto Figueroa Soliz, siendo con orgullo tenerlos como revisores por sus correcciones acertadas y sus tiempos brindados.

Al Ing. Fidel Cortez por su orientación y su experiencia profesional, hicieron efectiva en la culminación del trabajo en estudio.

A la Ing. Marizol Nina Gutiérrez por las palabras de motivación y apoyo.

Al Ing. Roger Huayhua, por su apoyo y colaboración en la interpretación de los datos evaluados en la investigación y correcciones realizadas.

Al Ing. Juan José Vicente, por el apoyo, comprensión y tiempo brindado en la interpretación de los datos y corrección de los gráficos.

A las personas, docentes, compañeros y amigos de carrera Ruth, Jeannet, Reynaldo, Mariana y Betty que me apoyaron a lo largo de mi formación donde compartimos gratos momentos.

Mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos	3
1.1.3. Hipótesis planteadas.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos generales de la papa	4
2.1.1. Origen de la papa.....	4
2.1.2. Importancia y características del cultivo de la papa.....	4
2.1.3. Distribución geográfica de la papa en el mundo	5
2.1.4. Clasificación taxonómica y Morfología.....	6
2.1.4.1. Tipo de planta,.....	6
2.1.4.2. Tallo	6
2.1.4.3. El fruto.....	6
2.1.4.4. Semilla	7
2.1.4.5. Raíz.....	7
2.1.4.6. La flor	7
2.1.5. Descripción de la Variedad Huaycha.....	8
2.1.5.1. Características Agronómicas	8
2.1.5.2. Características Morfológicas	8
2.1.5.3. Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos.....	8
2.2. Aspectos generales sobre Biotecnología Vegetal	8

2.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> o cultivo de tejidos.....	9
2.2.1.1. Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	10
2.2.1.2. Desventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	10
2.2.1.3. Asepsia.....	11
2.2.2. Cultivo de callos.....	11
2.2.3. Cultivo de ápices y meristemos.....	12
2.2.4. Cultivo de órganos.....	12
2.2.5. Medio de Cultivo.....	13
2.2.6. Composición de medio de cultivo.....	14
2.2.6.1. Sales inorgánicas o minerales.....	14
2.2.6.1.1. Macronutrientes.....	14
2.2.6.1.2. Micronutrientes.....	16
2.2.6.2. Compuestos orgánicos.....	17
2.2.6.2.1. Carbohidratos o fuentes de energía.....	17
2.2.6.2.2. Sustancias hormonales o reguladores de crecimiento.....	18
2.2.6.2.2.1. Auxina.....	19
2.2.6.2.2.2. Citoquininas.....	22
2.2.6.2.2.3. Ácido giberélico.....	23
2.2.6.2.3. Vitaminas.....	24
2.2.6.2.4. Aminoácidos y amidas.....	25
2.2.6.2.5. Materiales inertes de soporte.....	26
2.2.7. Micropropagación de plantas.....	27
2.2.7.1. Ventajas de la micropropagación.....	28
2.2.7.2. Factores limitantes de la micropropagación.....	29
2.2.8. Fases de la micropropagación.....	29
2.2.8.1. Fase 0. Selección de materiales vegetales.....	30
2.2.8.2. Fase I. Establecimiento.....	30
2.2.8.3. Fase II. Multiplicación.....	31
2.2.8.4. Fase III. Enraizamiento y elongación.....	31
2.2.8.5. Fase IV. Aclimatación.....	32
2.2.9. Problemas frecuentes en propagación <i>in vitro</i>	32
3. LOCALIZACIÓN.....	34
3.1. Ubicación geográfica.....	34

4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1. Material experimental.....	35
4.1.1. Material vegetal.....	35
4.1.2. Equipos y materiales de laboratorio	35
4.1.3. Reactivos químicos	35
4.1.4. Materiales de gabinete	36
4.2. Método.....	36
4.2.1. Reconocimiento del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.....	36
4.2.1.1. Área sucia	36
4.2.1.2. Área limpia	37
4.2.2. Obtención de material vegetal.....	37
4.2.3. Procedimiento experimental	38
4.2.4. Etapa 0. Tratamiento del material vegetal	38
4.2.5. Etapa I. Establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i>	38
4.2.5.1. Preparación del medio de cultivo.....	38
4.2.5.2. Desinfección y establecimiento.....	39
4.2.6. Etapa II. Micropropagación de vitroplantas.....	39
4.2.6.1. Preparación del medio de cultivo.....	40
4.2.6.2. Siembra de vitroplantas	41
4.3. Análisis estadístico.....	42
4.3.1. Diseño experimental.....	42
4.3.2. Modelo lineal aditivo.....	42
4.4. Distribución de los tratamientos	42
4.4.1. Combinación factorial.....	43
4.5. Croquis experimental	44
4.6. Variables de respuesta	45
4.6.1. Variables de análisis	45
4.6.2. Variables agronómicas.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
5.1. Análisis	46
5.2. Variables agronómicas.....	49

5.2.1. Altura de planta	49
5.2.1.1. Análisis de varianza en altura de vitroplanta.....	49
5.2.1.2 Efecto de la auxina AIB, respecto al factor corte en altura de planta	50
.....	50
5.2.1.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en altura de planta .	52
5.2.1.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en altura de vitroplanta	54
5.2.2. Número de hojas.....	56
5.2.2.1. Análisis de varianza para número de hojas por vitroplanta.	56
5.2.2.2. Efecto de la auxina AIB, respecto al factor corte en número de hojas por planta	57
.....	57
5.2.2.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en número de hojas por vitroplanta.	58
5.2.2.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en número de hojas	59
.....	59
5.2.3. Número de raíces.....	61
5.2.3.1. Análisis de varianza del número de raíces por planta.....	61
5.2.3.2. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor Corte en número de raíces por planta	62
.....	62
5.2.3.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en número de raíces por vitroplanta.	63
5.2.3.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en número de raíces	65
.....	65
6. CONCLUSIONES.....	68
7. RECOMENDACIONES.....	70
8. BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la papa.....	6
Cuadro 2. Factores y niveles de estudio.	43
Cuadro 3. Combinación de los factores de estudio	43
Cuadro 4. Porcentaje de supervivencia del Factor A: tipo de corte.	46
Cuadro 5. Porcentaje de supervivencia del Factor B: Concentraciones de (AIB).	46
Cuadro 6. Porcentaje de contaminación del Factor A: tipo de corte	47
Cuadro 7. Porcentaje de contaminación del Factor B: Concentraciones de (AIB).	47
Cuadro 8. Porcentaje de oxidación del Factor A: tipo de corte	48
Cuadro 9. Porcentaje de oxidación del Factor B: Concentraciones de (AIB).	48
Cuadro 10. Análisis de varianza para altura de vitroplanta.....	49
Cuadro 11. Interacción corte*concentración en relación altura de planta	54
Cuadro 12. Interacción concentración* corte en relación altura de planta	54
Cuadro 13. Análisis de varianza para el número de hojas.....	56
Cuadro 14. Interacción corte*concentración en número de hojas.....	59
Cuadro 15. Interacción concentración* corte en número de hojas.....	59
Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de raíces.....	61
Cuadro 17. Interacción corte*concentración número de raíces	65
Cuadro 18. Interacción concentración*corte número de raíces	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica.....	34
Figura 2. Distribución de las unidades experimentales.....	44
Figura 3. Prueba de promedios Duncan para altura de vitroplanta por el tipo de corte.....	50
Figura 4. Prueba de promedios Duncan para altura de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB	52
Figura 5. Variación de altura de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB	55
Figura 6. Prueba de promedios Duncan para el número de hojas por vitroplanta por el tipo de corte	57
Figura 7. Prueba de promedios Duncan para el número de hojas de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB	58
Figura 8. Variación en número de hojas de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB	60
Figura 9. Prueba de promedios Duncan para el número de raíces por vitroplanta en el tipo de corte	62
Figura 10. Prueba de promedios Duncan para el número de raíces de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB	63
Figura 11. Variación de raíces de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB	66

RESUMEN

La papa es un tubérculo muy importante por ser uno de los cuatro alimentos básicos de la humanidad, es susceptible a hongos e insectos cuando es cultivada bajo condiciones climáticas no adecuadas. La biotecnología es una nueva alternativa que está relacionada con el crecimiento de la población mundial, la pobreza, el desempleo creciente, la asistencia médica y los cambios climáticos globales que limitan las cosechas.

La biotecnología vegetal es una herramienta que nos ayuda a obtener mayor rendimiento del cultivo de papa. A través de técnicas de cultivo *in vitro* o cultivos de tejidos vegetales, que puede garantizar seguridad y soberanía alimentaria.

El objetivo de la Tesis fue optimizar los medios de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* sp.) de la variedad huaycha pacaña, Se evaluó las siguientes variables:

- De análisis: Porcentaje de supervivencia, de contaminación y oxidación.
- Agronómicas: Altura de la planta, número de hojas y de raíces.

Para la fase de multiplicación, se evaluaron los tipos de cortes (apical y medio), previamente establecidos de tamaño uniforme procesados de la fase de establecimiento, que se cultivaron durante 30 días en un medio de cultivo (MS, 1962) y 30 % (p/v) de sacarosa con un pH 5,7 y diferentes concentraciones de Ácido Indol Butírico de (0, 2, 4 y 6 mg/L. AIB), se evaluaron durante cuatro semanas; contaminación en la fase de multiplicación, se observó que el corte apical mostro una respuesta óptima para esta fase y un número elevado de supervivencia. Se estableció que la concentración adecuada para los cortes es 2 mg/L de AIB.

Palabras claves: cultivo *in vitro*, regulador de crecimiento, auxina, medio de cultivo, cultivo de tejidos vegetales y optimización.

SUMMARY

The potato is a very important tuber because it is one of the four basic foods of humanity, it is susceptible to fungi and insects when it is cultivated under unsuitable climatic conditions. Biotechnology is a new alternative that is related to world population growth, poverty, rising unemployment, medical assistance and global climate changes that limit crops.

Plant biotechnology is a tool that helps us obtain greater yield from potato cultivation. Through in vitro culture techniques or plant tissue cultures, which can guarantee food safety and sovereignty.

The objective of the Thesis was to optimize the culture media in the phase of in vitro multiplication of potato (*Solanum tuberosum* sp.) Of the variety huaycha paceña, The following variables were evaluated:

- Analysis: Survival percentage, pollution and oxidation.
- Agronomic: Plant height, number of leaves and roots.

For the multiplication phase, the previously established types of cuts (apical and medium) of uniform size processed from the establishment phase, which were grown for 30 days in a culture medium (MS, 1962) and 30% (p / v) sucrose with a pH 5.7 and different concentrations of Butyric Indole Acid (0, 2, 4 and 6 mg / L. AIB), were evaluated for four weeks; contamination in the multiplication phase, it was observed that the apical section showed an optimal response for this phase and a high survival number. It was established that the appropriate concentration for the cuts is 2 mg / L of AIB.

Keywords: in vitro culture, growth regulator, auxin, culture medium, plant tissue culture and optimization.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la papa es uno de los cuatro alimentos básicos de la humanidad, junto al trigo, arroz y maíz. En muchos países, la población depende de la papa y otros tubérculos, para su alimentación. Por ser una planta andina, la papa se torna mucho más susceptible a hongos e insectos cuando es cultivada bajo otras condiciones climáticas. Por ello, el agricultor debe comprar papa semilla, y cultivarla en ambientes donde no se desarrollen los insectos (escarabajo) y hongos (mildiu) que más le afectan.

La biotecnología está ofreciendo muchos beneficios para la agricultura, medicina, medio ambiente e industria. Esta nueva alternativa está relacionada con el crecimiento de la población mundial, la pobreza, el desempleo creciente, la asistencia médica y los cambios climáticos globales que limitan las cosechas.

La demografía en los últimos años aumento y la escasez de alimentos es cada vez más notorio.

La biotecnología vegetal es una herramienta que nos ayuda a obtener mayor rendimiento del cultivo de papa. A través de técnicas de cultivo *in vitro*, que puede garantizar seguridad y soberanía alimentaria.

Los resultados alcanzados en el desarrollo de las investigaciones biotecnológicas han demostrado que estas nuevas herramientas ofrecen oportunidades para elevar la producción agrícola y mejorar el nivel de vida del agricultor, obteniendo plantas garantizadas con alta calidad genética y especialmente libre de patógenos contaminantes (Espinoza, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales es una importante técnica relativamente nueva. Pero no es ampliamente usada debido a su poca difusión e inversión que debe realizarse. Esta técnica debe tener mayor investigación e integrar progresivamente el trabajo del agricultor (Rodríguez, 2012).

El cultivo *in vitro* de la papa permite la multiplicación rápida de plantas sanas y la producción de tubérculos libres de virus.

Durante los últimos 40 años, la población mundial casi se ha duplicado mientras que la cantidad de terreno disponible para la agricultura ha aumentado solamente 10 por ciento. Aun así seguimos viviendo en un mundo de relativa abundancia. De hecho, la producción mundial de alimentos por persona ha aumentado un 25 por ciento (Thieman & Palladino., 2010).

La técnica de cultivos *in vitro* es la vía para la obtención de semilla pre básica de papa con una potencialidad y aprovechamiento en la producción y consumo. Las semillas pre básicas de papa requieren una evaluación por su calidad de uso.

Al presente trabajo, se dispone de material como: material vegetal, de laboratorio, de vidrio, reactivos químicos, que tiene como propósito optimizar los medios de cultivos durante la fase de multiplicación *in vitro* de la variedad huaycha paceña, con la aplicación de un regulador de crecimiento Auxina (AIB), en dos diferentes explantes, apical y medio.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

- Optimizar los medios de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* sp.) de la variedad huaycha paceña.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del regulador de crecimiento Acido Indol Butírico (AIB) durante la fase de multiplicación.

- Evaluar los efectos de concentraciones de auxina (AIB), en la fase multiplicación de vitroplantas de papa.

- Determinar la mejor concentración del regulador de crecimiento Auxina (AIB).

1.1.3. Hipótesis planteadas

- **Ho:** El efecto del regulador de crecimiento (AIB) durante la fase de multiplicación son iguales.

- **Ho:** El efecto de tres concentraciones de auxina (AIB) son similares.

- **Ho:** La mejor concentración del regulador de crecimiento de la auxina AIB son los mismos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos generales de la papa

2.1.1. Origen de la papa

El cultivo de la papa se inicia en los Andes, en el área del Lago Titicaca cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia. Una vez domesticada, el cultivo de la papa se extendió por toda la región andina, y al momento de la conquista española principios del siglo XVI, se cultivaban cientos de variedades en las regiones altas de lo actual son Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador y Perú (Horton & Breth, 1992).

El origen de la patata se sitúa exactamente en una región que en la actualidad se ubica en los Andes del sur del Perú y el extremo noroeste de Bolivia y su primer cultivo se sitúa entre los años 8000 y 5000 a.C. (López, 2017).

2.1.2. Importancia y características del cultivo de la papa

Indica que la papa llega a ser importante por las siguientes razones:

- Es una de las fuentes más nutritivas de alimentación vegetal para el consumo humano en el ámbito mundial.
- Es componente principal en la dieta de la población por sus cualidades nutritivas y por sus múltiples formas de consumo y de combinación culinaria con otros alimentos.
- Puede ser procesado en forma de chuño, tunta, moraya, productos que se obtiene por congelación, descongelación, lavado y deshidrataciones sucesivas, los que se pueden conservar por mucho tiempo (Mamani, 2009).

Las papas son buena fuente de micro nutrientes, también contiene antioxidantes alimenticios que pueden contribuir a prevenir enfermedades. En Bolivia, la papa es

importante por varias razones: a) por su diversidad genética; b) por su importancia como alimento; c) por su papel cultural; y d) por su papel en la generación de ingresos (Panadés, 2008).

La región de los Andes es la cuna de la papa y se caracteriza por la presencia de una gran variedad de papas. En Bolivia se ha identificado unas 725 variedades. En todo el área Andina se ha identificado unos 3000 cultivares con características propias (IBTA/PROINPA, 2007).

2.1.3. Distribución geográfica de la papa en el mundo

La papa (*Solanum tuberosum* L.), era conocida en America hace 10,500 años. Su domesticación surgió en fecha posterior en los altiplanos de Bolivia y Chile, junto al Lago Titicaca por los Colla (Aymara); así mismo la domesticación los araucanos (Vivian en el Sur del Rio Bio Bio, Chile). En Perú, luego de cultivarla aprecio la primera agroindustria americana: la elaboración de papa seca o chuño para conservar el tubérculo. La papa, entonces, es originaria del Altiplano de América del Sur, donde se consume desde hace más de 8000 años. Guatemala, es considerada como un centro de origen secundario (Ochoa, 2014).

El *Solanum tuberosum* sp. Indígena tiene la más amplia distribución geográfica que cualquier otra especie de papa cultivada, se cultiva entre los 2500 a 4000 m.s.n.m. de la región andina de Sudamérica, desde las serranías del noroeste de Argentina, Punas y Pre punas de Bolivia, centro y sur del Perú, Jalcas del norte del Perú y los Paramos del Ecuador, Colombia y Venezuela. Su cultivo comercial se extiende también hacia las regiones de las costas central y sur del Perú a pocos metros del nivel del mar. El cultivo de esta especie, principalmente es en el Perú y Bolivia, se encuentran frecuentemente mezclado con otras especies nativas cultivadas.

La distribución de las diferentes especies es muy amplia en los andes y en general en el mundo entero. Actualmente se contabiliza que es un cultivo de importancia económica y

social en por lo menos en 120 países. Abarca no solamente casi todas las latitudes y continentes, sino igualmente un rango de altura que va desde el nivel del mar hasta los 4300 msnm (Quispe, 2016).

2.1.4. Clasificación taxonómica y Morfología

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la papa

Orden	Solanales
-Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum Tuberosum</i> sp.

Fuente. Huasco (2000).

2.1.4.1. Tipo de planta,

Es herbácea anual. Sus raíces son muy ramificadas, finas y largas, dependiendo su desarrollo de que el suelo este o no mullido (Jiménez, 2005).

2.1.4.2. Tallo

Asimismo cita el autor que el tallo grueso, fuerte, anguloso, con una altura que varía entre 0,5 y 1 m. Se origina en las yemas del tubérculo. Las hojas son imparipinnadas, que es cuando hay hojas simples y compuestas en el mismo tallo. Consta de nueve o más folíolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción.

2.1.4.3. El fruto

A su vez cita el autor que es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar.

2.1.4.4. Semilla

Asimismo cita el autor que la papa puede multiplicarse por semillas y por esquejes, en la práctica, la multiplicación es siempre vegetativa, haciéndose por medio de los tubérculos que producen brotes en las yemas u ojos.

La germinación de la papa, su crecimiento y la producción de tubérculos depende de sustancias químicas elaboradas por la papa, que actúan en dosis muy débiles, Se les conoce con el nombre de “sustancias de tuberización”.

2.1.4.5. Raíz

A su vez cita el autor que las plantas provenientes de semilla sexual, la raíz principal es filiforme o sea en forma de pelos, a partir de la cual aparecen ramificaciones laterales que forman un sistema fibroso.

La raíz formada a partir de semilla tubérculo es fibrosa, no existe una raíz principal y ósea muchas raíces adventicias. Su mayor crecimiento lo desarrolla en los primeros 0.20 m de profundidad, extendiéndose lateralmente de 0.30 hasta 0.60 m.

Las raíces laterales fibrosas pueden llegar hasta 1.20 m. De profundidad, en suelos francos y profundos.

2.1.4.6. La flor

Posee 5 estambres de color amarillo, anaranjado y un solo pistilo. La inflorescencia de la papa es una cima terminal que puede ser simple o compuesta. El color de las flores es variable: rosado, blanco, morado (varios tonos) o mezcla de dos colores. No todas las variedades provenientes de papa tubérculo y de semilla sexual florecen y forman bayas, en las variedades provenientes de semilla sexual, la floración se retarda unas dos semanas más (Jiménez, 2005).

2.1.5. Descripción de la Variedad Huaycha

2.1.5.1. Características Agronómicas

Especie *Solanum tuberosum* sp. Semi erecto ciclo vegetativo tardío 150 a 180 días. Altura de crecimiento entre 2500 a 3800 msnm de los departamentos de Cochabamba, La Paz, Potosí, Oruro y Chuquisaca.

2.1.5.2. Características Morfológicas

El color de flor es lila con rojo morado, la forma del tubérculo redondo con ojos profundos, color de la piel es rojo con áreas de color amarillo alrededor de los ojos, color de la pulpa crema.

2.1.5.3. Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos

El cultivo de papa es susceptible al nematodo rosario (*Nacobbus aberrans*), así también tiene ligera tolerancia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (PROINPA, 1994).

2.2. Aspectos generales sobre Biotecnología Vegetal

La Biotecnología, es el área de las ciencias biológicas y la tecnología que utiliza organismos vivos o algunas de sus partes constituyentes para el incremento de la producción de alimentos y otros productos que beneficien al hombre (IBTEN, 1994).

La “biotecnología es la aplicación de organismos vivientes para el desarrollo de nuevos productos” y la Biotecnología de Plantas o vegetal es la adición de rasgos selectos a plantas, para el desarrollo de nuevas variedades (Montes, 1995).

La biotecnología vegetal considerada como el área de la ciencia y la tecnología que utiliza organismos vivos o algunas partes constituyentes para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaria o industrial (Espinosa, 2013).

2.2.1. Cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos

Las biotecnologías, utilizan bacterias, hongos, células animales y vegetales de cultivo “*in vitro*” o “*in vivo*”, cuyo metabolismo está orientado a la producción de sustancias específicas (IBTEN, 1994).

El cultivo *in vitro* es considerado sinónimo de “Cultivo de tejidos” siendo una herramienta de la biotecnología que permite el uso de un conjunto de técnicas que establecen el cultivo en condiciones asépticas, usando como material de partida, órganos, tejidos, células, etc. Empleando medios nutritivos artificiales (Espinosa, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta para la investigación, multiplicación y mejoramiento de las plantas, en relación con otras áreas como la fisiología, bioquímica, morfogénesis, anatomía y otras así como contribuciones prácticas en la multiplicación y mejoramiento de plantas (Murillo, 2014).

El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa idéntica a la original. Esto permite obtener numerosos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos mediante el empleo de reguladores de crecimiento, como auxina, cito quinina, giberelinas y poliaminas, los cuales originan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés en el área de la biotecnología vegetal (Perea & Tirado, 2011).

2.2.1.1. Ventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales

- a) Es el único método conocido actualmente para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material enfermo.
- b) Propagación clonal masiva de plantas libres de enfermedades en corto tiempo.
- c) Mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades por ser una técnica que requiere de mucha aséptica.
- d) Evita la erosión genética.
- e) Reduce costos de labores agronómicas en el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasmas en el campo (Perea & Tirado, 2011).

2.2.1.2. Desventajas del Cultivo de Tejidos Vegetales

- a) Requiere de personal especializado: biólogos, fisiólogos, Fito mejoradores, bioquímicos, etc.
- b) Requiere infraestructura y equipamiento especiales.
- c) La adquisición de productos químicos es costoso y difícil, especialmente en países en vías de desarrollo con pocos recursos económicos.
- d) Difícil instalar laboratorios in vitro donde no exista servicio eléctrico o que presenten interrupciones periódicos que pueden perjudicar el crecimiento de los cultivos.
- e) La escasa literatura relacionada al cultivo in vitro en nuestro medio.

2.2.1.3. Asepsia

Es la aplicación de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación. En el laboratorio de cultivo de tejidos la asepsia es uno de los requerimientos más importantes. Una buena asepsia conlleva al éxito del crecimiento de las plántulas junto con el buen uso de los medios (Rodríguez, 2012).

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 (Poma, 2014).

2.2.2. Cultivo de callos

Los callos son conjuntos de células sin diferenciación, los cuales son utilizados en los procesos *in vitro* para innumerables objetivos, como la transformación genética, el cultivo de células en suspensión y embriogénesis somática. Los callos pueden originarse a partir de cualquier segmento de la planta con un balance hormonal de auxina/citoquinina moderado (Perea & Tirado, 2011).

Un callo es un conjunto de células indiferenciadas, amorfa conocida como una masa viva que presenta un crecimiento continuo y acelerado. Son generalmente heterogéneos en su composición celular, es decir que en un mismo callo pueden encontrarse varios tipos de células, como células meristemáticas (Espinoza, 2013).

2.2.3. Cultivo de ápices y meristemas

Los meristemas son grupos de células en estado juvenil con capacidad para dividirse constantemente, los cuales son utilizados esencialmente para la producción de plantas libres de patógenos. La carencia de vías de conducción de virus y viroides en estos tejidos permite lograr la sanidad de las plántulas.

La técnica del cultivo de meristemas consiste en la disección e incubación del meristemo apical de una planta en condiciones de asepsia. Se considera meristemo en sentido estricto al domo meristemático del ápice o bien el domo meristemática con uno o dos primordios foliares (Perea & Tirado, 2011).

La técnica del cultivo de meristemo es empleada para la obtención de plantas libres de patógenos, microorganismos como virus, bacterias, micro plasmas y otros en los tejidos de la planta infectada (Espinoza, 2013).

Esta técnica consiste en aislar el meristema y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa (Aguirre & Morante, 2018).

2.2.4. Cultivo de órganos

Este método fue uno de los primeros en poner en práctica, consiste en emplear ex plantas provenientes de raíces, tallos, hojas, embriones, anteras, meristemas y otros. Entre todos los mencionados el cultivo de anteras, de embriones y de meristemas son muy importantes porque tiene una utilización frecuente en la propagación y mejoramiento genético (Espinoza, 2013).

Cuando un órgano es cultivado en medios de cultivo o también sintéticos, el crecimiento y desarrollo es de manera semejante al que tenía en la planta madre o cambiar totalmente, por ejemplo un embrión aislado de una semilla e inoculado en medio sintético puede crecer y desarrollarse, hasta formar una planta completa; sin embargo dependiendo de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo se puede favorecer el desarrollo solo de los primordios foliares o radicales del embrión, existiendo un desarrollo desproporcionando de una de las dos partes, es posible también que los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo puede inducir la formación de callos, meristemáticas, ápices y yemas (Espinoza, 2013).

2.2.5. Medio de Cultivo

Se da el nombre de medio de cultivo al sustrato artificial de composición compleja, utilizando para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

El medio de cultivo permite que dé forma artificial y bajo condiciones estériles pueda vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen (Espinoza, 2013).

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento. Ocasionalmente con otras sustancias y gelificando generalmente con agar. También se pueden encontrar variantes de acuerdo a la etapa de propagación, específicamente para la multiplicación (Caillante, 2017).

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el desarrollo del cultivo *in vitro* y en su mayoría están conformados por una serie de componentes generales y específicos, cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

El medio (Murashige & Skoog, 1962), es considerado como el medio basal más utilizado en la generación de plantas puesto que es apto para el desarrollo de varias especies, sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6. Composición de medio de cultivo

Los medios de cultivo están conformados por: sustancias minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Estos medios pueden ser líquidos o tener un soporte sólido (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.1. Sales inorgánicas o minerales

Los nutrientes orgánicos utilizados en el medio de cultivo *in vitro* son los mismos requeridos normalmente por las plantas, unos son requeridos en mayores concentraciones conocidos como macronutrientes y el otro grupo son los micronutrientes aquellos requeridos en concentraciones bajas (Espinoza, 2013).

Para un rápido y vigoroso crecimiento, las plantas necesitan tomar del medio de cultivo cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos llamados macronutrientes y cantidades pequeñas o trazas de otros llamados micronutrientes (Murillo, 2014).

2.2.6.1.1. Macronutrientes

Dentro los macronutrientes más importantes se encuentran el carbono, hidrógeno y oxígeno pero existe otro grupo de elementos como el: N, P, K, Ca, Mg y S que son considerados macronutrientes por las cantidades grandes que requieren las vitroplantas para un óptimo desarrollo.

- El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones de amonio o la combinación de ambos iones.
- El sulfato de magnesio satisface tanto el requerimiento de magnesio como de azufre.
- El fósforo puede adicionarse en cualquier de las formas de NaH_2PO_2 o KH_2PO_4 .
- El potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de KCl , KNO_3 o KH_2PO_4 .
- El calcio se adiciona como $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o la forma anhidra de cualquier sal.
- El sodio no es requerido por plantas superiores, sin embargo puede ser un elemento esencial para cultivo de halófitas.

El cloro está presente en forma KCl o CaCl_2 (Espinoza, 2013).

Los macronutrientes son indispensables para el crecimiento de la planta y están constituidos por seis principales elementos: N, P, Ca, K, Mg, y S; también es considerado dentro de este grupo iones de Cl. Los micronutrientes generalmente se usan como sales de Na, I, Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, y Co. Se ha llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias muestras salinas (Murillo, 2014).

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas.

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). La concentración óptima de

cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.1.2. Micronutrientes

Los nutrientes requeridos en concentrados más bajas (μM) son conocidos como micronutrientes donde están incluidos Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son esenciales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos

- El hierro es requerido para la formación de precursores de la clorofila.

- El magnesio es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético.

- El cobre y el zinc se requieren para la oxidación e hidroxidación de compuestos fenólicos.

- El molibdeno y el hierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa.

- El cobalto es el metal componente de la vitamina B₁₂.

- El boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular uracilo (Espinoza, 2013).

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen cobalto (Co), Yodo (I) y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento. (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2. Compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos se clasifican en cuatro grupos importantes: Carbohidratos o fuentes de energía, Sustancias hormonales, Vitaminas, Aminoácidos amidas (Espinoza, 2013).

Podemos clasificarlos en tres grupos: Fuentes de carbono, hormonas, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos (Murillo, 2014).

2.2.6.2.1. Carbohidratos o fuentes de energía

El compuesto más usado como fuente de energía es la sacarosa considerado esencial en los medios de cultivo, se puede usar también otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, lactosa, maltosa, galactosa, sorbitol y el azúcar común, es recomendable usarla morena porque mientras menos procesada sea el carbohidrato menos contaminación existe en los medios de cultivo (Espinoza, 2013).

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4 por ciento. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa, 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 (Murillo, 2014).

Los tejidos *in vitro* son organismos heterótrofos y por esta razón es indispensable añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, como fuente de energía y regulador osmótico.

La sacarosa es la fuente de energía más utilizada en cultivo *in vitro*, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, lográndose a obtener óptimos resultados (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2.2. Sustancias hormonales o reguladores de crecimiento

Se conocen también como hormonas vegetales, son sustancias sintetizadas en determinado lugar de la planta y se desplazan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento y desarrollo y metabolismo del vegetal. El término “regulador de crecimiento” es más general y abarca las sustancias de origen natural y las sintetizadas en laboratorio, que determinan respuestas en las plantas.

Dependiendo del objetivo de las investigaciones, de la especie en estudio y del tipo de explante seleccionado, se utilizan los siguientes reguladores de crecimiento, adicionando a los diferentes medios de cultivo en concentraciones muy bajas (Perea & Tirado, 2011).

Las auxinas y las citoquininas son las dos fitohormonas que tiene esencial importancia en el cultivo de tejidos y células de plantas, sin embargo son considerados también reguladores de crecimiento las giberelinas y el ácido abscísico (Espinoza, 2013).

Se utilizan propiamente cuatro grupos de reguladores de crecimiento; Auxina, citocininas, giberelinas y ácido abscísico. En algunos casos se utiliza el etileno (Murillo, 2014).

Se entiende por regulador de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2.2.1. Auxina

Las auxinas son las hormonas que activan y dirigen la nueva división celular y el movimiento de los alimentos de la planta.

Tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos; estimulan el alargamiento y división celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias; también promueven el enraizamiento. Las auxinas que más se usan en cultivo de tejidos son: ANA, AIA y 2-4-D (Rodríguez, 2012).

Las auxinas ayudan a la elongación de las células, entre ellas tenemos a la auxina natural AIA (Ácido Indolacético) y las auxinas artificiales ANA (Ácido naftalenacético), IBA (Ácido indolbutírico), PCPA (Ácido p-clorofenoxiacético), 2,4-D (diclorofenoxiacético) siendo esta la más potente y mundialmente usado en los medios de cultivo para células y tejidos con finalidad de obtener callos por que ocasiona un crecimiento desorganizado en las células y el más débil es el AIA por que fácilmente es inactivado por la luz a, los tejidos con alta actividad y es considerado un compuesto termolábil porque reacciona con temperaturas altas.

Las auxinas también son requeridas para el crecimiento de los nuevos brotes, como los ápices vegetativos constituyen zonas activas de biosíntesis de estas. Las yemas y meristemas de tamaño menores a 0.4mm no producen o retienen suficientes auxinas endógenas, lo que hace necesario la aplicación de auxina exógena a los medios de cultivo (Espinoza, 2013).

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.

La concentración de las auxinas utilizadas varía desde 0,1-10 mg/L, siendo el rango más empleado el comprendido entre 0,25-3 mg/L. la actividad auxinica en células cultivadas se considera de la siguiente manera: 2,4-D>ANA>AIB>AIA (Murillo, 2014).

Son las primeras hormonas que se describieron. Su estructura es derivada del fenol o el indol y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos.

No se sabe el modo de acción pero está relacionado directamente con su estructura, ya que si se modifica pierde su función. Las auxinas pueden ser naturales o sintéticas.

Efectos:

- a) Crecimiento: estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.
- b) Tropismos: responsables del fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces.
- c) Dominancia apical: la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- d) Abscisión de órganos (hojas, flores y frutos): posee un control genético y las auxinas retrasan la caída, aunque el etileno la induce.
- e) Rizogénesis: estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal, las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/L (Aguirre *et al.*, 2018).

a) AIB (Ácido indol butírico)

El AIB es la auxina más utilizada para este efecto por su estabilidad y poca movilidad; la otra utilizada ha sido el Ácido Naftalenacético, aunque es más móvil y por tanto menos consistente.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal. Esencialmente provocan la elongación de las células, se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y se desplazan desde allí hacia otras zonas de la planta, principalmente hacia la base, estableciéndose así un gradiente de concentración. Este movimiento se realiza a través del parénquima que rodea a los haces vasculares.

La síntesis de auxinas se ha identificado en diversos organismos como plantas superiores, hongos, bacterias y algas y casi siempre están relacionadas con etapas de intenso crecimiento.

La presencia e importancia de las hormonas vegetales se estableció por los estudios de las auxinas; sobre ellas hay una amplia y profunda información científica (mucho más de lo que hay de otras hormonas), lo que ha permitido conocer con más precisión cómo funcionan las hormonas en las plantas. Junto con las giberelinas y las citoquininas, las auxinas regulan múltiples procesos fisiológicos en las plantas, aunque no son únicos compuestos con esa capacidad (Ochoa, 2014).

Es un compuesto natural, sólido cristalino en condiciones estándar de presión y temperatura (25 °C y 1 atm), de color blanco amarillo claro, de fórmula molecular $C_{12}H_{13}NO_2$. Considerado regulador del crecimiento vegetal de la familia de las auxinas y forma parte de muchos productos comerciales utilizados para facilitar el enraizamiento de estacas de especies hortícolas y frutales.

- **Preparación y conservación:** Dado que el ácido indol butírico no es soluble en agua, se disuelve típicamente en etanol 75% (o más puro) para su uso en el enraizamiento de las plantas. El ácido indol butírico también está disponible como sal, en cuyo caso es soluble en agua. La solución deberá conservarse en un lugar frío (se recomienda almacenarse a menos de 0 °C) y oscuro para obtener mejores resultados. El producto en estado sólido debe conservarse a temperaturas de entre 0 y 5 °C (Hernández, 2015).

2.2.6.2.2.2. Citoquininas

Tienen efecto en la citoquinesis (división celular), retarda la senescencia, rompe la dominancia apical estimulando el desarrollo de tallos laterales y en el movimiento de nutrientes. Cuando la proporción citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece el enraizamiento. Las citoquininas disponibles son la Kinetina, BAP y 2ip (Rodríguez, 2012).

Son aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citoquinesis.

Casi todas las citoquininas son sintéticas y derivadas de la adenina dentro de este grupo se encuentran la Kinetina (6-furfuril amino-purina), BAP (6 benzil aminopurina), 2 ip (6 dimetil alil purina) y la zeatina (6-(hidroxi. 3 metil, 2 bunetil) adenina, esta última es considerada citoquinina natural porque es extraída del endospermo del maíz (Espinoza, 2013).

En la planta, las raíces son el principal centro para la biosíntesis y son traslocadas hacia los brotes y hojas (movimiento acropétalo o ascendente). Son muy importantes porque pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis. Son derivados de la adenina y dentro de este grupo están: BAP, 2ip, Kinetina, Zeatina (Murillo, 2014).

Las posibles respuestas al tratamiento con citocininas son: División celular, inducción a la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces (Murillo, 2014).

Son un grupo más reducido de hormonas que pueden su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de la adenina.

Efectos:

- a) Crecimiento: en conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben.
- b) Dominancia lateral: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).
- c) Diferenciación y morfogénesis: provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- d) Senescencia: son anti-senescentes (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2.2.3. Ácido giberélico

AG3, aunque no tiene un uso tan amplio pero si es esencial en el cultivo de meristemas en algunas especies de plantas como la micropropagación con medios líquidos de vitroplantas de papa, banano, piña y totora (Espinoza, 2013).

Asimismo cita el autor que este compuesto es recomendado para la regeneración de las plantas. Su principal acción del Ácido Giberélico es ayudar a la elongación de las vitroplantas y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

A su vez citado por el autor, que en el cultivo de la papa el ácido giberélico es usado para romper la dormancia, esto se aplica a los tubérculos en condiciones controladas y la dosis empleada varía de 100 a 200 ppm. Son hormonas que proceden de una estructura química, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. (Murillo, 2014).

Asimismo cita el autor que en la planta son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelinas. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El Ácido Giberélico), es el más frecuente empleado en el cultivo *in vitro*. Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar como las de estas, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa.

Efectos:

a) Estimulan el crecimiento de los tallos (elongación) e hipocotilos. Tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción estimulan la floración, sobre todo en aquellas plantas con floración del día largo como las coníferas.

b) La germinación es su principal efecto. Casi todas las semillas germinan inducida por GA. Posibilitan la movilización de reservas en las semillas. Sustituyen requisitos ambientales (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2.3. Vitaminas

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas más usadas son: la vitamina B1, es la vitamina más usada por ser esencial en los medios de cultivo para la micropropagación de plantas, se añade como Tiamina HCl en cantidades que varían de 0,1 a 30 mg/L (Espinoza, 2013).

Son esenciales para ciertas funciones catalíticas en el metabolismo celular mejorando el crecimiento celular y son requeridas en pequeñas cantidades (Murillo, 2014).

Las vitaminas son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas a medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los

tejidos, y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis (Aguirre *et al.*, 2018).

Asimismo cita el autor, para Murashige las vitaminas esenciales para el crecimiento de células en plantas superiores son:

- a) **Tiamina** es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo *in vitro* para un buen crecimiento del cultivo.
- b) - **Myo-inositol** estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagación. La concentración más utilizada es de 100 mg/L.

A su vez cita el autor que otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento *in vitro* y estas son: piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato de calcio (B5), riboflavina, prolina y glicina.

2.2.6.2.4. Aminoácidos y amidas

Los aminoácidos y amidas son empleados en los medios de cultivo como fuentes de nitrógeno orgánico, pero muchas veces no es necesario porque el medio de cultivo contiene otros elementos de Nitrógeno, resulta beneficiosa su inclusión para favorecer el desarrollo de las vitroplantas (Espinoza, 2013).

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa "*in vitro*". Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible establecer una regla general (Aguirre *et al.*, 2018).

2.2.6.2.5. Materiales inertes de soporte

El empleo de compuestos gelificantes es importante para brindar a la planta un soporte; en estos casos se utiliza una serie de compuestos, los más conocidos son: agar-agar, el phytigel y gelrite (Perea & Tirado, 2011).

Agar: El agar es el agente solidificante más popular y esta usualmente presente a una concentración de 0.6-1.0 % (w/v). En el Programa de Papa-Una se utiliza el Phitigel en una cantidad de 3 g/L de medio de cultivo (Rodríguez, 2012).

Asimismo cita el autor que el material de soporte es conocido también como material inerte del medio de cultivo o estado físico del medio.

A su vez cita el autor, desde hace mucho tiempos atrás, los medios de cultivo han sido gelificados con agar, un compuesto extraído de algas marinas del genero *Gelidium*. El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte al explante.

Sin embargo fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento, la concentración de dichas sustancias está determinada generalmente por la calidad del agar, este añadido al medio en concentraciones de 6 a 9 g/L para medios sólido y 2 a 4 g/L para medios semisólidos (Espinoza, 2013).

El agar es el material de soporte más ampliamente utilizado, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inculo, se derrite al calentarlo y se enfría a temperatura ambiente. Fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento (Murillo, 2014).

2.2.7. Micropropagación de plantas

La micropropagación consiste en la extracción de porciones de tejidos capaces de regenerar una planta al ser colocada en un medio de cultivo; esto determina la multiplicación clonal, lo que es muy útil en la conservación de germoplasma manteniendo la estabilidad morfológica en las plantas obtenidas (Rodríguez, 2011).

La propagación vegetativa *in vitro*, también denominada micropropagación, es la aplicación más concreta del cultivo de tejidos, la de mayor impacto y el más ampliamente utilizado en todos los laboratorios de biotecnologías vegetal. Consiste en reproducir plantas conformes a la planta madre por las estimulaciones de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie o por la inducción de un nueva organogénesis de brotes y raíces (Espinoza, 2013).

Asimismo cita el autor, que la micropropagación aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente, o en aquellas especies que tienen un bajo porcentaje de reproducción, también es usado ampliamente en programas de mejoramiento genético.

A su vez cita el autor, que la micropropagación es un procedimiento basado en el concepto de la totipotencialidad, que consiste en reproducir plantas idénticas a la planta madre por medio de la estimulación de las capacidades naturales de dicha especie. Esto significa multiplicación asexual *in vitro*.

Se entiende por micropropagación a cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica (Murillo, 2014).

2.2.7.1. Ventajas de la micropropagación

Menciona las siguientes ventajas que presenta la micropropagación *in vitro* (Murillo, 2014).

a) Mayor rapidez en la introducción de productos

La micropropagación puede introducir un producto en el mercado más rápidamente que los métodos convencionales: selección individual de plantas elites, altos coeficientes de propagación, uniformidad en las plantas producidas, elevadas producciones en espacios reducidos.

b) Mayor calidad del producto

El valor del producto se incrementa como consecuencia de: plantas libres de enfermedades, mejoramiento del fenotipo de las plantas.

C) Mayor facilidad en la comercialización

La comercialización de plantas micro propagadas se facilita debido a: flexibilidad en la forma del producto, facilidades en la transportación y embarque, producción durante todo el año.

2.2.7.2. Factores limitantes de la micropropagación

a) Costo de producción relativamente alto

La micropropagación aún requiere de un alto componente de mano de obra altamente calificada. Por tanto los costos en muchas especies son más altos que los de métodos convencionales como la producción de esquejes y la propagación por semillas. La mano de obra puede representar hasta un 70 por ciento del costo final, la producción en países con mano de obra más barata es solo una solución temporal, se necesitan métodos con costos reducidos.

b) Aparición de plantas fuera de tipo

Aun cuando la micropropagación es una tecnología de clonación, pueden ocurrir mutaciones durante las distintas etapas del proceso, aunque la variabilidad es siempre un riesgo en este método.

c) No es aplicable a todos los cultivos

No todos los cultivos pueden ser comercialmente propagados por micropropagación a los niveles actuales de esta tecnología. Aunque existen muchos reportes científicos en un variado número de especies, estos aún no están listos para su aplicación a escala comercial y en otros cultivos ningún sistema de regeneración ha sido desarrollado hasta el momento, lo cual limita la aplicación de esta tecnología.

2.2.8. Fases de la micropropagación

Para tener buenos resultados en el proceso de la micropropagación depende del control de un gran número de variables, no solamente de la composición medio de cultivo como normalmente se cree sino también del material vegetal, de manipuleo desde el aislamiento del explante inicial hasta el trasplante de la planta (Espinoza, 2013).

Según la experiencia en la propagación comercial pueden identificarse cinco etapas bien definidas con sus objetivos específicos (Murillo, 2014).

El objetivo de la micropropagación es obtener un gran número de plantas idénticas a la planta madre. Esto se logra por fracción de un tejido u órgano extraído de la planta en un periodo de tiempo corto (Villanueva, 2015).

2.2.8.1. Fase 0. Selección de materiales vegetales

Esta fase es de suma importancia para garantizar el éxito del proceso de micropropagación, en esta etapa se selecciona el material vegetal que se utiliza como material de partida o fuente de explante. Debe provenir de plantas sanas y vigorosas, escogiendo aquellas plantas que se destaquen en la población a fin de garantizar la propagación de un material con la mayor calidad desde el punto de vista genético y sanitario (Espinoza, 2013).

Inicialmente esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban convenientemente en la Fase I. (Murillo, 2014).

A su vez cita el autor, que en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

2.2.8.2. Fase I. Establecimiento

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se requiere multiplicar, el establecimiento incluye la desinfección y siembra del explante en condiciones asépticas en medios de cultivo, esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación visibles y suficientemente adaptadas a las condiciones *in*

vitro de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de Fito reguladores en la fase siguiente (Espinoza, 2013).

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axenico y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación (Murillo, 2014).

2.2.8.3. Fase II. Multiplicación

Llamada también fase de propagación y como el nombre lo indica el objetivo de esta fase es la producción masiva de propágulos a partir de los explantes establecidos, en un medio de cultivo adecuado para este fin, el medio debe estar enriquecido por una citocinina y la más usada es el BAP (Benzil aminopurina) (Espinoza, 2013).

Como su nombre indica, el objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos a partir de brotes establecidos. Para esto se induce la proliferación de brotes los cuales son separados en condiciones estériles y cultivadas nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseadas (Murillo, 2014).

2.2.8.4. Fase III. Enraizamiento y elongación

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radicular que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a condiciones *in vitro*, existe la posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos en condiciones de laboratorio, sumergiendo los brotes antes de trasplantar en una solución enraizadora (Espinoza, 2013).

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radicular que les permite ser trasplantadas a un sustrato en condiciones de vivero o invernadero (Murillo, 2014).

2.2.8.5. Fase IV. Aclimatación

En esta fase se trabaja la adaptación a las condiciones ambientales de las vitroplantas, las plantas enraizadas *in vitro* están listas para ser transferidas a un recipiente con un sustrato, donde permanecería durante cierto tiempo hasta alcanzar un tamaño que le permita ser plantada en el campo (Espinoza, 2013).

Los objetivos primarios de la fase de aclimatación son: lograr la supervivencia de las plantas al momento del trasplante y el crecimiento de las mismas hasta alcanzar un desarrollo que le permita ser trasplantadas a campo abierto. Durante esta etapa se produce un retorno gradual de las plantas a su características morfológicas normales, después de las etapas *in vitro*. La eficiencia en la aclimatación es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la eficiencia total del proceso y la calidad final de las plantas (Murillo, 2014).

2.2.9. Problemas frecuentes en propagación *in vitro*

Los problemas más frecuentes en propagación *in vitro* podrían resumirse en: contaminación, oxidación y vitrificación de los tejidos (Poma, 2014).

- a) 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.

- b) 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.

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.

- c) 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.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material experimental

4.1.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado, fueron tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* sp), variedad Huaycha, de gran aceptación en mercados regionales.

4.1.2. Equipos y materiales de laboratorio

a) Equipos de laboratorio: Autoclave tipo vertical, (vapor bajo presión), balanzas (analítica y precisión), cámara de flujo laminar de aire, cámara de crecimiento, horno microondas, pH-metro, agitador magnético, refrigerador, termómetros de máximas y mínimas, destilador de agua.

b) Materiales de vidrio: Pipetas graduadas (5 y 10 ml), probetas (250 ml), vasitos de vidrio cocteleras (40 x 80 mm), cajas petrí, vaso de precipitación (500 ml), varilla de vidrio.

c) Instrumental de disección e implementos de laboratorio: Hojas de bisturí (N° 11), mangos para bisturí (N° 4), pinzas largas y pinzas cortas, tijeras, mechero de alcohol, bandeja de metal, papel aluminio, papel secante, parafilm.

d) Indumentaria y materiales de asepsia: Guardapolvos, barbijos, gorro, detergente, jabón desinfectante antibacterial o sanitizador de mano, algodón, guantes de látex desechables.

4.1.3. Reactivos químicos

a) Medios de cultivo: Sales minerales y vitaminas del medio basal MS Murashige y Skoog, 1962 (Anexo 1).

b) Reguladores de crecimiento: Acido Indol Butírico (AIB).

c) Reactivos: Hidróxido de sodio (NaOH al 1N), ácido clorhídrico (HCl al 1N), agua destilada, alcohol etílico al 70% y 96% (v/v), hipoclorito de sodio (NaClO) 3% (v/v), agar 0,40% (p/v), sacarosa 3% (p/v).

4.1.4. Materiales de gabinete

Computadora, Impresora, calculadora, cámara fotográfica, planillas, marcador indeleble, etiquetas, regla, programa INFostat y SAS.

4.2. Método

4.2.1. Reconocimiento del Laboratorio de Biotecnología Vegetal

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía UMSA, para el cultivo de tejidos se encuentra organizada de forma básica, que comprende dos grandes áreas y dentro de ellas áreas específicas:

4.2.1.1. Área sucia

En esta parte del laboratorio se realiza operaciones de lavado de cristalería, preparación de medios de cultivo y la esterilización del material a utilizar.

a) Área de lavado: Esta área es amplia con numerosos grifos de agua y lavaderos para facilitar la operación de lavado y sus respectivos enjuagues, el último enjuague es con agua destilada, provista de mesones, bañadores de plástico y destilador de agua.

Destinado a la limpieza de instrumental, frascos, recipientes, material vegetal.

b) Área de preparación de medio de cultivo y esterilización: Establecida para preparar medios de cultivo, que serán utilizados en las diferentes fases del proceso de

cultivo *in vitro* de tejidos. Las operaciones que se realiza en esta área de trabajo son el pesaje de los diferentes reactivos, la dilución de los diferentes componentes del medio de cultivo y la distribución de los medios de cultivo en frascos de cultivo.

En esta área de trabajo se encuentran varios equipos de trabajo como: balanza analítica y de precisión, pH metro, agitador magnético, el autoclave vertical (para esterilizar los materiales de vidrio, de plástico y los medios de cultivo), refrigeradores, dispensadores, microondas y estantes para materiales de cristal.

4.2.1.2. Área limpia

En esta área se realizan todas las manipulaciones de los explantes y el crecimiento de los cultivos *in vitro*, deben poseer una extrema limpieza para evitar la entrada de polvo que es el principal portador de agentes contaminantes.

a) Área de micropropagación: Destinada para trabajos de, micropropagación y transferencia de explantes a condiciones *in vitro*; provista de una cámara de flujo laminar, incubadora y la secadora de materiales, cuenta con altos niveles de asepsia.

b) Área de crecimiento: Los cultivos *in vitro*, se lleva a una sala que provee condiciones ambientales controladas, mínimamente requeridas, llegando a tener una temperatura promedio 28 °C y humedad relativa 60%.

El fotoperiodo del área de crecimiento fue de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, para la etapa de introducción y multiplicación, controlado por un temporizador programable.

4.2.2. Obtención de material vegetal

Para la obtención de meristemos de la variedad Huaycha, se realizó la selección de tubérculos obtenidos en campo que no presentaron ningún síntoma de enfermedad. Se almacenaron en una incubadora por el tiempo de un mes, sin exposición a la luz; con el

propósito de poder desarrollar brotes. Se estableció al cultivo aséptico en frascos obteniéndose 60 vitroplantas de la variedad Huaycha con una altura promedio de 6.5 y 7.5 cm. En la preparación del medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962), no se adicióno ninguna hormona, lista para la multiplicación de vitroplantas de los meristemas y en los sub cultivos de los explantes.

4.2.3. Procedimiento experimental

Se efectuaron ensayos preliminares, piloto, la investigación se dividió en etapas para su análisis, de la siguiente manera:

4.2.4. Etapa 0. Tratamiento del material vegetal

La priorización de tubérculos madre de la variedad Huaycha, se basó en la selección, evaluando las condiciones físicas y estado de sanidad óptima (síntoma de contaminación fúngica, bacteriana), presencia de rugosidades, daños físicos y otros aspectos no deseables que influya en la obtención de brotes de buena calidad.

El material vegetal (tubérculos madre) seleccionado, se lavó con agua corriente y una pisco de detergente en polvo, para eliminar restos de sustratos y materia orgánica respectivamente.

4.2.5. Etapa I. Establecimiento del material vegetal a condiciones *in vitro*

4.2.5.1. Preparación del medio de cultivo

El medio base MS, es ampliamente utilizado en los laboratorios de producción de plántulas de papa; las concentraciones de sales y vitaminas que contiene son las adecuadas para su normal crecimiento de las plántulas en condiciones *in vitro*. Centro Internacional de la papa Centro Internacional de la Papa (CIP, 1998).

De acuerdo al requerimiento del medio de cultivo para la investigación, se formuló soluciones stock y se pipeteo el medio basal MS (1962), se adicionó reguladores de crecimiento.

4.2.5.2. Desinfección y establecimiento

Bajo condiciones asépticas, se procedió a diseccionar los brotes desarrollados por los tubérculos, de una longitud aproximada de 20 mm, los explantes fueron sometidos a desinfección externa mediante inmersión en solución de etanol al 70%/10seg. y en una solución de hipoclorito de sodio al 3%/10min. Para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes, que poseen efectos oxidativos en los explantes, efectuando tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril (ADE) y cada enjuague tomo el tiempo de 5 min.

Los brotes diseccionados fueron transferidos a las cajas petri, donde se realizaron cortes con bisturí y pinzas flameadas, para obtener explantes de longitudes entre 5 a 10 mm, descartando los extremos basales debido a que estos presentaron necrosis en los tejidos, por los agentes desinfectantes; finalmente los explantes fueron cultivados a razón de cinco explantes por unidad de vaso, en posición vertical en sentido al desarrollo del brote, quedando el ápice encima del medio de cultivo.

Cada explante fue sembrado en un vaso preparado con 15 ml de medio básico MS (fuente de carbono + nutrientes minerales + vitaminas), luego, con los respectivos registros de la variedad y fecha de la actividad, transfiriéndolos a sala de crecimiento o incubación que cuenta con ambientes controlados (temperatura, humedad relativa, fotoperiodo).

4.2.6. Etapa II. Micropropagación de vitroplantas

Una vez que los explantes expresaron su totipotencia alcanzado una altura de 8 a 10 mm, se procedió a seleccionar el mejor material vegetal, descartando plántulas que presenten algún tipo de contaminación y con un escaso desarrollo longitudinal.

Se extranjeraron las plántulas de los vasos, colocándose en cajas petrí, donde se aislaron segmentos uninodales provistos de yema más una hoja, tomando en cuenta las partes apicales y medios de la plántula, con el fin de evaluar el desarrollo de las vitroplantas.

Las vitroplantas fueron micropropagadas a razón de un segmento uninodal por vaso, que contenía 15 ml de medio basal MS y distintas concentraciones (0, 2, 4 y 6 mg/L) de AIB; finalmente fueron sellados con parafilm, en posición vertical y en sentido del desarrollo de la vitroplantas, quedando el meristemo y la hoja por encima del medio basal.

4.2.6.1. Preparación del medio de cultivo

Para preparar 1600 ml (400 ml/tratamiento) de medio, se procedió de la siguiente manera:

- Se disolvió y mezcló el medio basal Murashige y Skoog (1962), en un vaso de precipitado previamente lavado y enjuagado con agua estéril (ADE).
- Posteriormente se agregó sacarosa (azúcar comercial) en cantidades, según requerimiento 3% (p/v)/L y myoinositol 100 mg/L.
- Se añadió el regulador de crecimiento Ácido Indol Butírico (AIB) en sus diferentes concentraciones (0, 2, 4 y 6 mg/l) según los requerimientos.
- Se enrazó el volumen a 400 ml/tratamiento, con (ADE).
- El pH de los medios se ajustó de 5,5 a 5,7 (utilizando hidróxido de sodio NaOH, y el ácido clorhídrico 1N), para elevar y bajar el PH respectivamente.
- Se añadió 1g/L de gelzan como agente gelificante, obteniéndose un medio en estado semisólido y transparente.

- Se disolvió el agente gelificante en el horno microondas, mediante la agitación del vaso, obteniendo una solución homogénea, evitando su hervor.
- Se distribuyó 15 ml del medio de inducción *in vitro*, por cada vaso de vidrio, previamente lavado y esterilizado, procediéndose con su sellado en papel aluminio y parafilm.
- Se procedió con la (autoclave) a una temperatura de 121 °C y 15 libras de presión, durante 10 min.

4.2.6.2. Siembra de vitroplantas

- Se procedió a seccionar segmentos uninodales de las vitroplantas (apical y medio) propagadas en la fase de micropropagación, seleccionando las mejores vitroplantas. Se introdujo un segmento nodal por vaso de vidrio, preparado.
- Una vez realizada la siembra de explantes en vasos con medios de cultivo, estos se sellaron con parafilm; previo flameo, con el respectivo etiquetado, transfiriéndolos a sala de crecimiento a incubación, bajo condiciones controladas temperatura 27 °C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad (fotoperiodo largo), donde manifestó su desarrollo favorable.

4.3. Análisis estadístico

4.3.1. Diseño experimental

Para la evaluación de este trabajo de investigación se empleó el Diseño experimental de Completamente al Azar con arreglo bi factorial; donde el Factor A corresponde al tipo de corte (apical y medio) y el Factor B corresponde a las diferentes concentraciones (0, 2, 4 y 6 mg/L) de ácido Indol butírico (AIB).

El modelo lineal para un diseño en completamente al azar bifactorial viene dado por la siguiente ecuación (Ochoa, 2007).

4.3.2. Modelo lineal aditivo.

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

Donde:

Y_{ijk} = Observación cualquiera

μ = Media general

α_i = Efecto i-ésimo nivel del factor tipo de explante.

β_j = Efecto de j-ésimo nivel del factor concentración de AIB

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel del factor tipo de explante con el j-ésimo nivel del factor concentración de AIB.

ϵ_{ijk} = Error experimental.

4.4. Distribución de los tratamientos

El diseño bajo el cual se estableció el trabajo de investigación fue el diseño completamente al azar con un arreglo bi factorial (2*4). Esto conformo 8 tratamientos con 12 repeticiones cada uno, todos los tratamientos fueron distribuidos aleatoriamente.

a) Factor A: tipo de corte

b) Factor B: Diferentes concentración

Cuadro 2. Factores y niveles de estudio.

Factor A (Tipo de corte)	Factor B (Concentración de AIB)
Niveles: A ₁ = Apical A ₂ = Medio	Niveles: B ₀ = 0 mg/L B ₁ = 2 mg/L B ₂ = 4 mg/L B ₃ = 6mg/L

4.4.1. Combinación factorial

Cuadro 3. Combinación de los factores de estudio

Tratamientos	Combinación de los niveles	Descripción de los tratamientos
T ₁	A ₁ b ₀	Explante apical x 0 mg/L AIB
T ₂	A ₁ b ₁	Explante apical x 2 mg/ L AIB
T ₃	A ₁ b ₂	Explante apical x 4 mg/ L AIB
T ₄	A ₁ b ₃	Explante apical x 6 mg/ L AIB
T ₅	A ₂ b ₀	Explante medio x 0 mg/ L AIB
T ₆	A ₂ b ₁	Explante medio x 2 mg/ L AIB
T ₇	A ₂ b ₂	Explante medio x 4 mg/ L AIB
T ₈	A ₂ b ₃	Explante medio x 6 mg/ L AIB

4.5. Croquis experimental

La figura 2 presenta el croquis experimental y la distribución de las unidades de estudio.

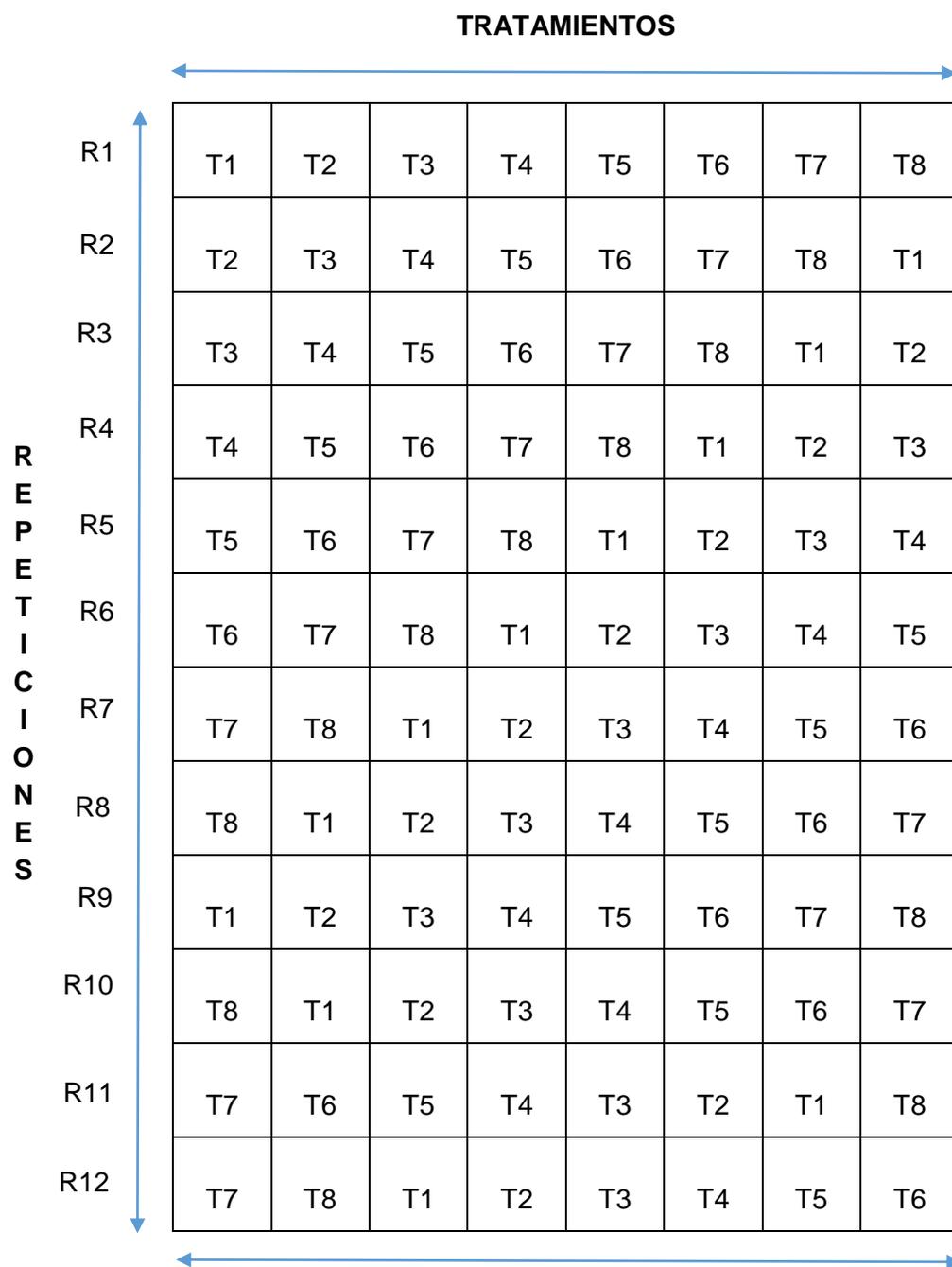


Figura 2. Distribución de las unidades experimentales

4.6. Variables de respuesta

4.6.1. Variables de análisis

Los resultados obtenidos se evaluaron cada tres días, durante un mes, en función a las siguientes variables de respuestas.

a) Porcentaje de supervivencia: Se realizó el porcentaje de explantes que lograron expresar su totipotencia favorablemente (los que sobrevivieron), en relación al número de plántulas desarrolladas entre el número de vitroplantas totales por cien.

b) Porcentaje de contaminación: Expresa el número de vitroplantas contaminadas en porcentajes, el fenómeno se da por presencia de bacterias, hongos o algún agente contaminante externo, la relación define número de vitroplantas contaminadas entre número de vitroplantas totales por cien.

c) Porcentaje de oxidación: Se evaluó el número de vitroplantas que presentaron cambio de color (café o marrón) en el medio de cultivo y el corte (apical o medio); parámetro evaluado por cuantificación y observación directa.

4.6.2. Variables agronómicas

a) Altura de vitroplantas: Se midió el desarrollo longitudinal alcanzado en centímetros (cm), datos tomados desde inicio del vástago hasta el ápice, la evaluación se realizó, cada tres días después de la siembra durante cuatro semanas.

b) Número de hojas: Se evaluó contando el número de hojas, por conteo directo de cada vitroplanta.

c) Número de raíces: Se evaluó contando el número de raíces por conteo directo de cada vitroplanta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados sobre optimizar los medios de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* sp.) de la variedad huaycha paceña, se obtuvieron los siguientes resultados.

5.1. Análisis

a) Porcentaje de supervivencia (%S): Se contó el número total de vitroplantas que se desarrollaron, (observando su crecimiento), en la etapa de multiplicación.

$$\%S = \frac{\text{Plantas muertas}}{\text{Nro. total de plantas}} * 100\%$$

Cuadro 4. Porcentaje de supervivencia del Factor A: tipo de corte.

Factor A Tipo de corte	Vitroplantas muertas	Vitroplantas vivas	Total	Vitroplantas muertas (%)
Apical	2	46	48	4,16
Medio	3	45	48	6,25
Total	5	91	96	10,41

En el cuadro 4, se observa el porcentaje de supervivencia que es de 89.59 %, donde un 10,41 % de vitroplantas muertas, en el factor A con el tipo de corte (apical y medio), de un total de 96 vitroplantas en estudio.

Cuadro 5. Porcentaje de supervivencia del Factor B: Concentraciones de (AIB).

Factor B Concentraciones de AIB	Vitroplantas muertas	Vitroplantas vivas	Total	Porcentaje de sobrevivencia (%)
AIB 0	1	23	24	4,16
AIB 2	2	22	24	8,33
AIB 4	3	21	24	12,5
AIB 6	0	24	24	0
Total	6	90	96	24,99

En el cuadro 5, se observa el porcentaje de supervivencia que es de 75,01 %, donde el 24,99 % hay de vitroplantas muertas, en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 96 vitroplantas en estudio.

b) Porcentaje de contaminación: Se identificó el número total de vitroplantas contaminadas (presencia de hongos, bacterias o agentes contaminantes externos) este valor se expresó en porcentaje.

$$\%C = \frac{\text{Plantas contaminadas}}{\text{Nro. total de plantas}} * 100\%$$

Cuadro 6. Porcentaje de contaminación del Factor A: tipo de corte

Factor A Tipo de corte	Vitroplantas sin contaminación	Vitroplantas contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
Apical	46	2	48	4,1
Medio	45	3	48	6,25
Total	91	5	96	10,3

En el cuadro 6, se observa el porcentaje de vitroplantas no contaminadas, es de 89,7 %, donde el 10,3 % de vitroplantas son contaminadas, en el factor A con el tipo de corte (apical y medio), de un total de 96 vitroplantas en estudio.

Cuadro 7. Porcentaje de contaminación del Factor B: Concentraciones de (AIB).

Factor B Concentraciones de AIB	Vitroplantas sin contaminación	Vitroplantas contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
AIB 0	22	2	24	8,33
AIB 2	21	2	24	8,33
AIB 4	22	1	24	4,16
AIB 6	21	3	24	12,5
Total	86	10	96	33,32

En el cuadro 7, se observa el porcentaje de contaminación que es de 66,68 %, donde el 33,32 % hay de vitroplantas contaminadas, en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 96 vitroplantas en estudio.

c) Porcentaje de oxidación: La determinación de la variable de respuesta porcentaje de oxidación (%0), fue medida por observación directa de los vasos, se cuantifico el número de explantes y medios de cultivo que presentan características de tonalidad marrón y café, el cambio de color indica la presencia de oxidación, puede apreciarse tanto en el explante como en el medio de cultivo.

Cuadro 8. Porcentaje de oxidación del Factor A: tipo de corte

Factor A Tipo de corte	Vitroplantas sin oxidación	Vitroplantas con oxidación	Total	Porcentaje de oxidación (%)
Apical	48	0	48	0
Medio	48	0	48	0
Total	96	0	96	0

En el cuadro 8, se observa el porcentaje de vitroplantas oxidadas, que es de 0 %, donde el 100 % de vitroplantas no presenta oxidación, en el factor A con el tipo de corte (apical y medio), de un total de 96 vitroplantas en estudio.

Cuadro 9. Porcentaje de oxidación del Factor B: Concentraciones de (AIB).

Factor B Concentraciones de AIB	Vitroplantas sin contaminación	Vitroplantas contaminadas	Total	Porcentaje de Oxidación (%)
AIB 0	24	0	24	0
AIB 2	24	0	24	0
AIB 4	24	0	24	0
AIB 6	24	0	24	0
Total	96	0	96	0

En el cuadro 9, se observó el porcentaje de oxidación es 0 %, donde el 100 % de las vitroplantas no se oxidaron, en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 96

vitroplantas en estudio, lo cual indica que si el medio de cultivo presenta auxina (AIB), no influyo en la oxidación.

5.2. Variables agronómicas

5.2.1. Altura de planta

5.2.1.1. Análisis de varianza en altura de vitroplanta

El análisis de varianza realizado para la altura de vitroplanta (cuadro 10), muestra que existe diferencia en el factor de concentración, lo que demuestra que este factor tiene influencia significativa en el promedio de altura.

Por tanto, se observa que existe diferencia altamente significativa en los factores, en el corte, lo que nos da a entender que es bueno realizar el corte (apical y medio), ya que de todas maneras habrá diferencias en altura.

Con respecto a la interacción del corte por concentración, al ser significativo, indica que ambos factores actúan de forma dependiente, en relación a esta variable, se realiza el efecto simple.

Cuadro 10. Análisis de varianza para altura de vitroplanta.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Factor	0,16	7	0,02	9.98	<0,0001 **
Corte	0,08	1	0,08	34,51	<0,0001 **
Concentración	0,06	3	0,02	8,34	0,0001 *
Corte*Concentración	0,02	3	0,01	3,45	0,02 *
Error	0,2	88	2,30E-03		
Total	0,36	95			

CV = 4,13 % ; ** = Altamente significativo; * = Significativo al 5 %

El coeficiente de variación es de 4,13 %, este resultado indica que los datos manejados en el diseño experimental para la altura de vitroplanta son confiables, debido que representa el grado de dispersión de las observaciones en términos porcentuales.

Al respecto Ochoa (2007), indica que el coeficiente de variación en experimentos frente a la aplicación de un determinado tratamiento, mayor al 35% es elevado y los datos pueden no ser confiables, bajo esta observación se puede afirmar que los datos de la investigación para esta variable son confiables.

5.2.1.2 Efecto de la auxina AIB, respecto al factor corte en altura de planta

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias significativas para el factor corte entre la hormona (AIB), respecto a la altura de vitroplanta, para comprobar la diferencia se realizó la prueba Duncan.

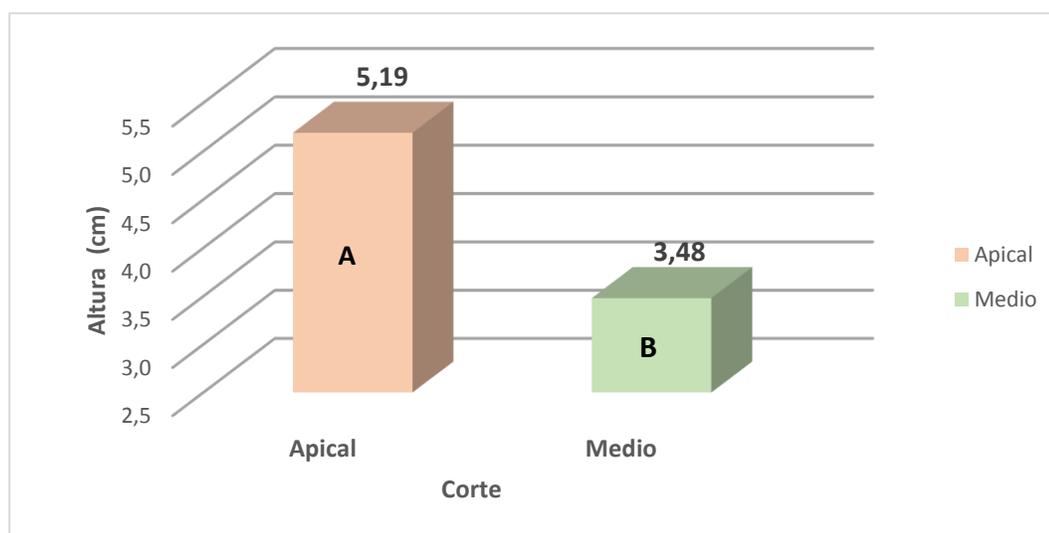


Figura 3. Prueba de promedios Duncan para altura de vitroplanta por el tipo de corte

En la figura 3, se afirma que a un nivel de significancia 5%, establece que el corte apical, obtuvo un promedio de 5,19 cm de altura de vitroplanta, así mismo el corte medio presenta un promedio general en altura de 3,48 cm, determinando que si existe diferencias significativas entre ambos cortes.

Debido a que en el corte apical existe mayor división celular donde las células son más activas y se regeneran fácilmente. Mientras que en el corte medio, la división celular es lenta, porque existe herida en el nudo y tarda en regenerarse.

Para (Moya, 2001); citado por (Villanuevas, 2015). Se utilizaron explantes apicales y axilares con resultados para la producción de plantas libres de virus. Sin embargo es aconsejable el uso de yemas terminales ya que tienen un mayor crecimiento potencial que las yemas laterales. Por lo que se puede afirmar que la multiplicación de explantes apicales es propicia por la eliminación de virus.

Es recomendable realizar cortes longitudinales con el propósito de romper la dominancia Apical de los brotes y estimular la formación de brotación axilar múltiple. Se ha señalado que el uso de ápices vegetativos es el más recomendable para la propagación masiva de plantas y se han reportado diferentes metodologías para el establecimiento aséptico de material juvenil como adulto (Quispe, D., 2010).

5.2.1.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en altura de planta

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias significativas para el factor concentración, entre la hormona (AIB), respecto a la altura, para comprobar la diferencia se realizó la prueba Duncan.

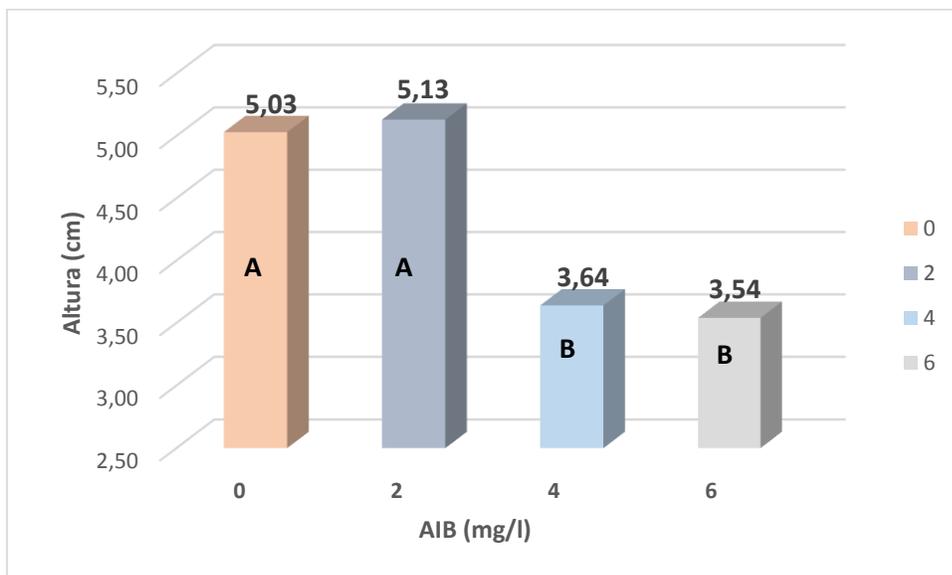


Figura 4. Prueba de promedios Duncan para altura de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB

Por efecto se estima que los niveles de concentración de AIB (Figura 4), establece diferencias significativas, determinando cuatro estratificaciones de altura; el medio de cultivo formulado sin regulador de crecimiento AIB (0 mg/L), presento un promedio en altura de 5,03 cm; seguido por la concentración de AIB (2 mg/L) con 5,13 cm; el tercer nivel de concentración de AIB (4 mg/L), que presento 3,64 cm de altura y finalmente la concentración de AIB (6 mg/L), obtuvo una expansión longitudinal de 3,54 cm, considerada la altura más baja.

Se obtiene un buen desarrollo longitudinal en explantes de la variedad Huaycha, en un medio basal sin regulador de crecimiento AIB (0mg/L), se observó que la aplicación de AIB en sus concentraciones 4 a 6 mg/L, limita el desarrollo longitudinal, debido a que

promueve formaciones callos en la parte basal de las vitroplantas, además que inhibe la formación de raíces. El medio de cultivo formulado con regulador de crecimiento AIB en nivel de concentración (2 mg/L), favorece el desarrollo de la vitroplanta, además se observa desarrollo radicular óptimo.

Posiblemente las diferencias en las concentraciones y reguladores utilizados pudieran depender del material del explante empleado, pues las respuestas organogénicas dependen del regulador, de la concentración empleada y del tipo de explante seleccionado (Quispe, D., 2010).

Estas fitohormonas tienen influencias sobre la formación de embrioneides, impidiendo que se conviertan en embriones, la concentración de auxinas utilizadas para los distintos medios de cultivo varía desde 0,1 – 10 mg/L siendo el rango más empleado 0,25 hasta 3 mg/L (Espinosa, 2013).

Según García *et al*, 2012. Se adiciono al medio de cultivo AIB en tres concentraciones (10, 15 y 20 mg/l), alcanzaron una altura de 5 a 6 cm, después de los treinta días en el cultivo de bambusa.

Debido que la variable de respuesta tuvo diferencias significativas en las interacciones entre factores, se realizó una prueba de efectos simples para determinar el comportamiento de esta interacción.

5.2.1.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en altura de vitroplanta

En el cuadro 11, de análisis de interacción corte por concentración, con respecto a la altura de planta, se pueden apreciar diferencias altamente significativas (<0,0001), en respuesta de los cortes (apical y medio) y las concentraciones 4 y 6 mg/L y efectos no significativos para las concentraciones 0 y 2 mg/L.

Cuadro 11. Interacción corte*concentración en relación altura de planta

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Corte (0 mg/l)	0.005257	1	0.005257	2.32	0.1315 NS
Corte (2 mg/l)	0.003747	1	0.003747	1	0.2020 NS
Corte (4 mg/l)	0.060109	1	0.060109	65	<0,0001 **
Corte (6 mg/l)	0.032617	1	0.032617	26.50	<0,0003 **

En el cuadro 12, de análisis de interacción concentración por corte, con respecto a la altura de vitroplanta, se pueden apreciar diferencias altamente significativas, en respuesta de las concentraciones (corte medio) y efecto no significativo para las concentraciones (corte apical).

Cuadro 12. Interacción concentración* corte en relación altura de planta

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Concentración (Apical)	0.006090	3	0.002030	0.90	0.4471 NS
Concentración (Medio)	0.074118	3	0.024706	10.89	<0,0001 **

Como se observa en la Figura 5, en los cortes apicales tiene mayores alturas en: la concentración de AIB (2 mg/L) alcanzó una altura de 5,61 cm, AIB (0 mg/L), tiene una altura de 5,40 cm, mientras que AIB (4 mg/L), tiene una altura de 5,14 cm y la concentración AIB (6 mg/L), alcanzo una altura menor de 4,60 cm.

En los cortes medios se observa menores alturas: la concentración AIB (2 mg/L), alcanzó una altura de 4,66 cm, AIB (0 mg/L), tiene una altura de 4,64 cm, mientras que AIB (6 mg/L), tiene una altura de 2,47 cm, AIB (4mg/L), alcanzo una altura menor de 2,14 cm.

En la figura 5, muestra que para los cortes apicales y medios, la altura de planta es mayor en menor concentración de la auxina AIB y a altas concentraciones de la auxina la altura es menor, durante la fase de multiplicación.

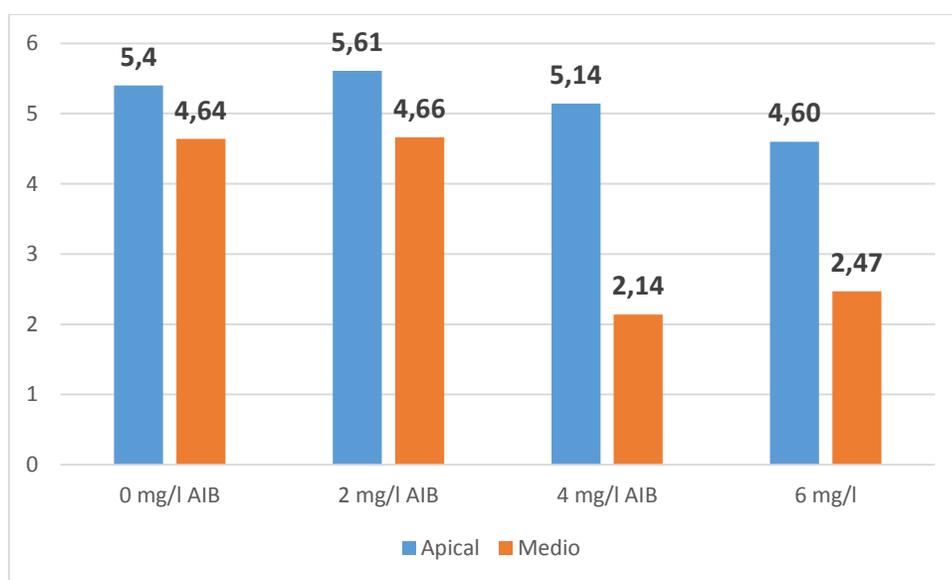


Figura 5. Variación de altura de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB

El medio de cultivo del corte apical y medio a una concentración de AIB (0 mg/L), fueron los únicos que contenía la solución del medio (MS) importante para el desarrollo de las plántulas *in vitro*, así lo afirma (Aliaga, 2008), quién indica que en la composición de los medios de cultivo tiene un efecto significativo para el desarrollo en altura de las plántulas durante los primeros 15 días.

5.2.2. Número de hojas

5.2.2.1. Análisis de varianza para número de hojas por vitroplanta.

El análisis de varianza realizado para número de hojas (cuadro 13), muestra que no existe diferencia en el factor de concentración, lo que demuestra que este factor tiene influencia no significativa en el promedio número de hojas de vitroplanta. Por otro lado, se observa que existe diferencia altamente significativa en los factores, en el corte, lo que nos da a entender que es bueno realizar el corte (apical y medio), ya que de todas maneras habrá diferencias en número de hojas.

Respecto a la interacción del corte por concentraciones, al ser significativa, indica que ambos factores actúan de forma dependiente, en relación a esta variable, se realiza el efecto simple.

Cuadro 13. Análisis de varianza para el número de hojas

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Factor	0,47	7	0,07	11,75	<0,0001 **
Corte	0,41	1	0,41	71,61	<0,0001 **
Concentración	0,02	3	0,01	1,38	0,2549 NS
Corte*Concentración	0,04	3	0,01	2,18	0,0962 *
Error	0,51	88	0,01		
Total	0,98	95			

CV = 6,27 % ; ** = Altamente significativo; * = Significativo al 5 %

El coeficiente de variación es de 6,27 %, este resultado indica que los datos manejados en el diseño experimental para el número de hojas de vitroplanta son confiables, debido que representa el grado de dispersión de las observaciones en términos porcentuales.

Al respecto Ochoa (2007), indica que el coeficiente de variación en experimentos frente a la aplicación de un determinado tratamiento, mayor al 35% es elevado y los datos pueden no ser confiables, bajo esta observación se puede afirmar que los datos de la investigación para esta variable son confiables.

5.2.2.2. Efecto de la auxina AIB, respecto al factor corte en número de hojas por planta

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias altamente significativas para el factor corte entre la hormona (AIB), respecto al número de hojas de vitroplanta, para comprobar la diferencia se realizó la prueba Duncan.

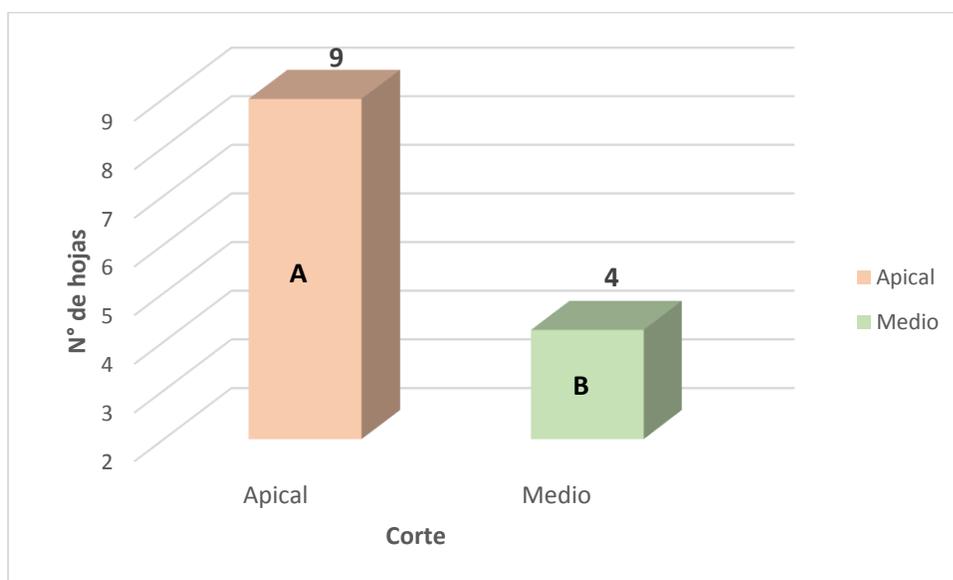


Figura 6. Prueba de promedios Duncan para el número de hojas por vitroplanta por el tipo de corte

En la Figura 6, se afirma que a un nivel de significancia 5%, establece que el corte apical, obtuvo un promedio de 9 en número de hojas por vitroplanta, así mismo el corte medio presenta un promedio general número de hojas 4, determinando que si existe diferencias altamente significativas entre ambos cortes.

5.2.2.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en número de hojas por vitroplanta.

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias no significativas para el factor concentración, entre la hormona (AIB), respecto al número de hojas, para comprobar que no existe diferencias se realizó la prueba Duncan.

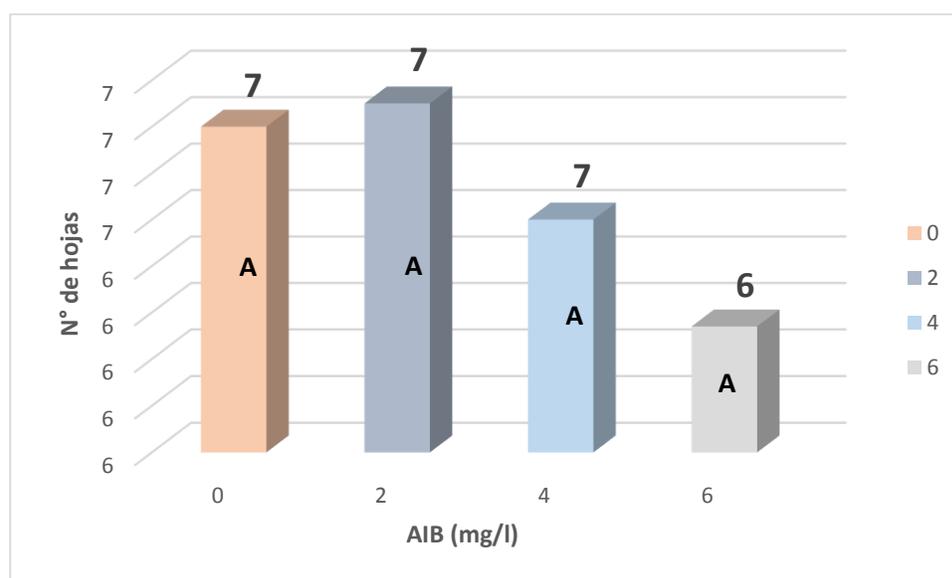


Figura 7. Prueba de promedios Duncan para el número de hojas de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB

Por efecto se estima que los niveles de concentración de AIB (Figura 7), establece diferencias no significativas, determinando cuatro estratificaciones en número de hojas; el medio de cultivo formulado sin regulador de crecimiento 0 mg/L AIB, presento un promedio en número de hojas de 7; seguido por la concentración de 2 mg/L AIB con 7 hojas; el tercer nivel de concentración de 4 mg/L AIB, que presento 7 hojas y finalmente la concentración de 6 mg/L AIB, obtuvo 6 hojas.

Se obtiene un buen desarrollo en hojas, en un medio basal, formulado con regulador de crecimiento AIB a un nivel de concentración 2 mg/L que favorece el desarrollo de la vitroplanta, se observó que la aplicación de AIB en sus concentraciones 4 a 6 mg/L, inhibe

la formación de hojas, a estas concentraciones promueve formaciones callosas, El medio de cultivo formulado sin regulador de crecimiento AIB a un nivel de concentración 0 mg/L, favorece la formación de hojas.

5.2.2.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en número de hojas

En el cuadro 14, de análisis de interacción corte por concentración, con respecto al número de hojas, se pueden apreciar diferencias altamente significativas (<0,0001), en respuesta de los cortes (apical y medio) en las concentraciones 0, 4 y 6 mg/L y efectos no significativos para las concentraciones 0 y 2 mg/L.

Cuadro 14. Interacción corte*concentración en número de hojas

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Corte (0 mg/l)	0.069720	1	0.069720	12.12	0.0008 **
Corte (2 mg/l)	0.036529	1	0.036529	6.35	0.0136 *
Corte (4 mg/l)	0.167152	1	0.167152	29.05	<,0001 **
Corte (6 mg/l)	0.176304	1	0.176304	30.64	<,0003 **

En el cuadro 15, de análisis de interacción concentración por corte, con respecto al número de hojas, se pueden apreciar diferencias significativas, en respuesta de las concentraciones (corte medio) y efectos no significativos para las concentraciones (corte apical).

Cuadro 15. Interacción concentración* corte en número de hojas

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Concentración (Apical)	0.004148	3	0.001383	0.24	0.8680 NS
Concentración (Medio)	0.057241	3	0.019080	3.32	0.0236 *

Como se observa en la Figura 8, en los cortes apicales se observa mayor número de hojas en promedio: en la concentración de AIB (0 mg/L) es 9 hojas, AIB (2 mg/L), tiene 9 hojas, mientras que AIB (4 mg/L), tiene 8 hojas y la concentración AIB (6 mg/L), alcanzo 9 hojas.

En los cortes medios se observa menor número de hojas en promedio: la concentración AIB (0 mg/L), alcanzó un promedio de hojas de 5, AIB (2 mg/L), tiene 5 hojas, mientras que AIB (4 mg/L), tiene 4 hojas y AIB (6mg/L) de 3 hojas.

En la figura 8, muestra que en los cortes apicales, hay mayor número de hojas en concentraciones bajas y altas, mientras que en cortes medio hay menor número de hojas en concentración bajas y concentraciones de la auxina AIB, durante la fase de multiplicación.

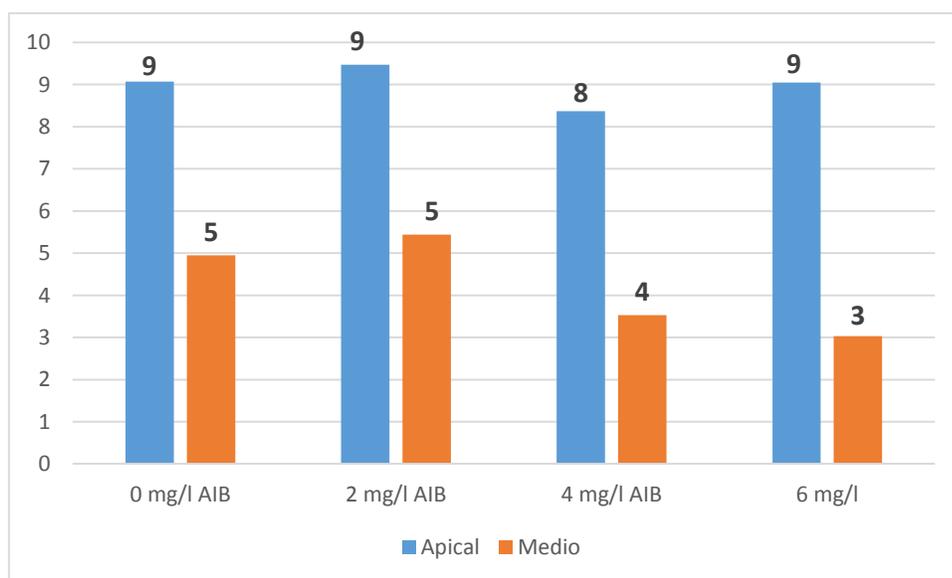


Figura 8. Variación en número de hojas de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB

5.2.3. Número de raíces

5.2.3.1. Análisis de varianza del número de raíces por planta.

El análisis de varianza realizado para el número de raíces (cuadro 16), muestra que existe diferencia en el factor de concentración, lo que demuestra que este factor tiene influencia significativa en el promedio de número de raíces de vitroplanta.

Por otro lado, se observa que existe diferencia altamente significativa en los factores, en el corte, lo que nos da a entender que es bueno realizar el corte (apical y medio), ya que de todas maneras habrá diferencias en número de raíces.

Respecto a la interacción del corte por concentraciones, al ser significativo, indica que ambos factores actúan de forma dependiente, en relación a esta variable, se realiza el efecto simple.

Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de raíces

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Factor	0,69	7	0,10	14,10	<0,0001**
Corte	0,16	1	0,16	23,33	<0,0001**
Concentración	0,48	3	0,16	23,06	0,0254*
Corte*Concentración	0,04	3	0,01	2,07	0,0109*
Error	0,61	88	0,01		
Total	1,30	95			

CV = 7,09 % ; ** = Altamente significativo; *NS= No significativo

El coeficiente de variación es de 7,09 %, este resultado indica que los datos manejados en el diseño experimental para el número de raíces de vitroplanta son confiables, debido que representa el grado de dispersión de las observaciones en términos porcentuales.

Al respecto Ochoa (2007), indica que el coeficiente de variación en experimentos frente a la aplicación de un determinado tratamiento, mayor al 35% es elevado y los datos pueden no ser confiables, bajo esta observación se puede afirmar que los datos de la investigación para esta variable son confiables.

5.2.3.2. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor Corte en número de raíces por planta

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias significativas para el factor corte entre la hormona (AIB), respecto al número de raíces de vitroplanta, para comprobar la diferencia se realizó la prueba Duncan.

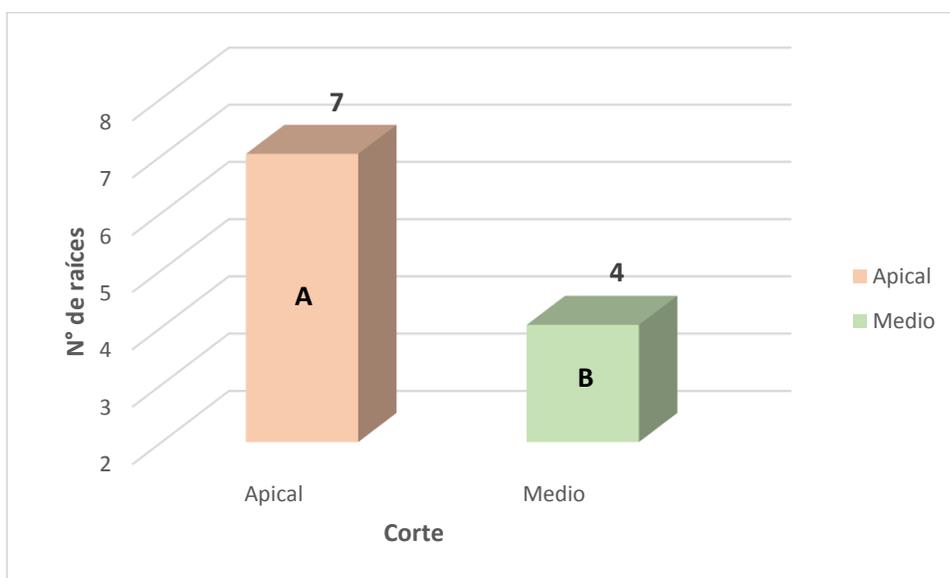


Figura 9. Prueba de promedios Duncan para el número de raíces por vitroplanta en el tipo de corte

En la figura 9, se afirma que a un nivel de significancia 5%, establece que el corte apical, obtuvo un promedio de 7 raíces por vitroplanta, así mismo el corte medio presenta un promedio general de número de raíces 4, determinando que si existe diferencias altamente significativas entre ambos cortes.

En investigaciones realizadas para la inducción de raíces de brotes de papaya *in vitro*, han sido utilizadas las auxinas AIB (ácido indolbutírico) y ANA (ácido naftalenacético), se ha demostrado que en términos de porcentaje y número de raíces el AIB ha sido superior a las demás auxinas (Drew, 1992).

5.2.3.3. Efecto de la auxina AIB, respecto al Factor concentración en número de raíces por vitroplanta.

A una probabilidad (5%) se observaron diferencias significativas para el factor concentración, entre la hormona (AIB), respecto al número de raíces, para comprobar la diferencia se realizó la prueba Duncan.

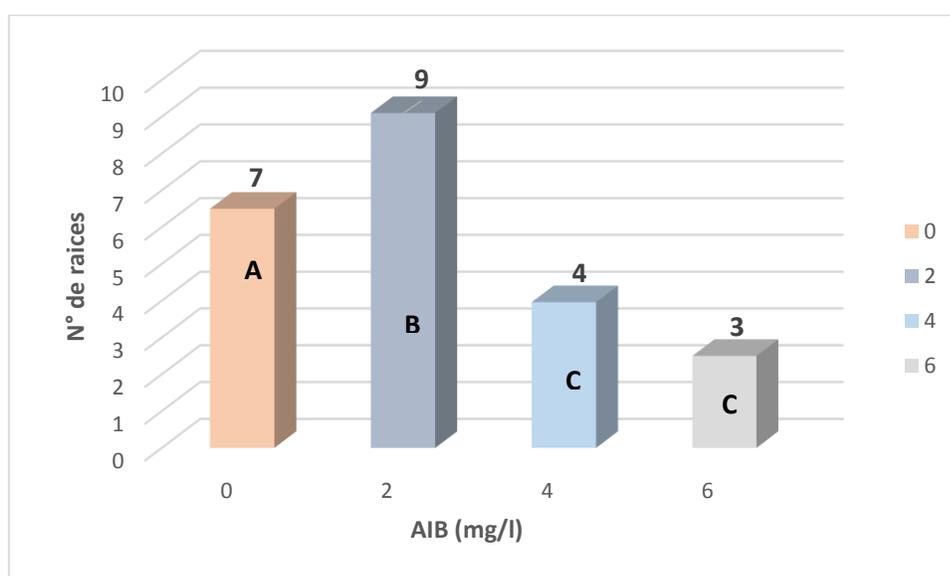


Figura 10. Prueba de promedios Duncan para el número de raíces de vitroplanta por efecto de niveles de concentraciones de AIB

Por efecto se estima que los niveles de concentración de AIB (Figura 10), establece diferencias significativas, determinando cuatro estratificaciones en número de raíces; el medio de cultivo formulado sin regulador de crecimiento 0 mg/L AIB, presento un promedio en número de raíces de 7; seguido por la concentración de 2 mg/L AIB con 9 raíces; el tercer nivel de concentración de 4 mg/L AIB, que presento 4 raíces y finalmente la concentración de 6 mg/L AIB, obtuvo 3 raíces.

Se obtiene un buen desarrollo de raíces en vitroplantas de la variedad Huaycha, en un medio basal, formulado con regulador de crecimiento AIB en nivel de concentración 2 mg/L, donde se observa un buen desarrollo radicular óptimo, a la vez el medio basal sin regulador de crecimiento AIB a un nivel de concentración 0 mg/L, favorece la formación de raíces y la aplicación de AIB en sus concentraciones 4 a 6 mg/L, limita la formación de raíces, debido a que promueve formaciones callosas en la parte basal (raíces) y área (hojas).

La adición de AIB hasta 1.0 mg/L-1 al medio de cultivo, estimula el crecimiento de los brotes de *Agave* (*A. angustifolia*) y la formación de mayor cantidad de raíces en menos tiempo, en comparación con brotes cultivados en medios sin AIB (Enríquez *et al*, 2005).

El efecto del ácido indolabutírico (AIB) sobre el número de raíces fue directamente proporcional a la concentración del regulador. A 0,5 mg· L-1 de AIB se observó el desarrollo de 21 raíces en promedio por brote, mientras que a 3 mg· L-1 de AIB se desarrollaron 52 raíces promedio por brote, con valores intermedios de 28 y 35 a 1 y 2 mg· L-1, enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus*. (Chamorro *et al*, 2007).

5.2.3.4. Análisis de varianza de efectos simples para la interacción en número de raíces

En el cuadro 17, de análisis de interacción corte por concentración, con respecto al número de raíces, se pueden apreciar diferencias altamente significativas, en respuesta de los cortes (apical y medio) en las concentraciones 0 y 4 mg/L, diferencias significativas en 2 mg/L y efectos no significativo para la concentración 6 mg/L.

Cuadro 17. Interacción corte*concentración número de raíces

F.V.	GL	SC	CM	F	p-valor
Corte (0 mg/l)	1	0.099142	0.099142	14.27	0.0003 **
Corte (2 mg/l)	1	0.018515	0.018515	2.66	0.01062 *
Corte (4 mg/l)	1	0.083328	0.083328	11.99	0.0008 **
Corte (6 mg/l)	1	0.004321	0.004321	0.62	0.4325 NS

En el cuadro 18, de análisis de interacción concentración por corte, con respecto al número de raíces, se pueden apreciar diferencias altamente significativas, en respuesta de las concentraciones de los cortes (apical y medio).

Cuadro 18. Interacción concentración*corte número de raíces

F.V.	GL	SC	CM	F	p-valor
Concentración (Apical)	3	0.346702	0.115567	16.63	<,0001 **
Concentración (Medio)	3	0.177144	0.059048	8.50	<,0001 **

Como se observa en la Figura 11, en los cortes apicales se observa mayor número de raíces en promedio: en la concentración de AIB (2 mg/L) es 12 raíces, AIB (0 mg/L), tiene 8 raíces, mientras que AIB (4 mg/L), tiene 6 raíces y la concentración AIB (6 mg/L), alcanzo 3 raíces.

En los cortes medios se observa menor número de raíces en promedio: la concentración AIB (0 mg/L), alcanzó un promedio de raíces de 6, AIB (2 mg/L), tiene 6 raíces, mientras que AIB (4 mg/L), tiene 2 raíces y AIB (6mg/L) de 2 raíces.

En la figura 11, muestra que en los cortes apicales, hay mayor número de raíces en concentraciones bajas y en concentraciones altas hay menor número de raíces, mientras que en cortes medios hay menor número de raíz en concentración bajas y altas concentraciones de la auxina AIB, durante la fase de multiplicación, la adición de AIB en el medio de cultivo redujo el tiempo de enraizado.

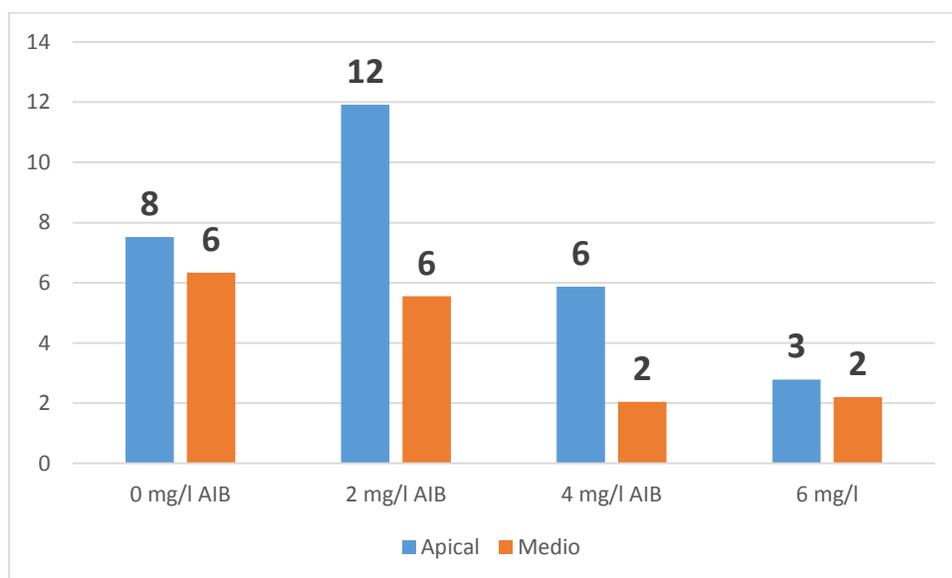


Figura 11. Variación de raíces de vitroplanta por interacción entre tipo de corte y niveles de concentraciones de AIB

Indica, La aplicación de AIB influyó, en el porcentaje de microtallos con mayor número promedio de raíces (5,1) y longitud de éstas (12,7 mm).

La morfología externa de las raíces obtenidas en cada tratamiento indica que el aumento de la concentración de AIB al medio de cultivo disminuyó significativamente la longitud promedio de las raíces. El aumento de la concentración de AIB provocó un incremento en la formación de tejido calogénico y un mayor número de raíces quienes al trabajar con estacas semileñosas de *Nothofagus glauca* y *Eucryphia glutinosa*, respectivamente, obtuvieron mejores resultados con menores concentraciones de AIB.

En este contexto, un sistema radical de calidad, considera el número de raíces por microtallo o brote, longitud de las raíces y ausencia de formación de callo. Por tanto, en este estudio se obtuvo un sistema radical de calidad utilizando bajas concentraciones de AIB, contrario a lo que ocurre, por ejemplo, en *Nothofagus leoni* Espinosa, donde concentraciones más elevadas de AIB inducen un mejor sistema radical (Uribe *et al*, 2012).

6. CONCLUSIONES

Una vez obtenidos los resultados y realizados los análisis estadísticos e interpretaciones; se llegó a las siguientes conclusiones:

- La aplicación del regulador de crecimiento AIB, muestra que las variables de altura de vitroplanta, número de hojas y número de raíces, según resultados obtenidos muestra que el regulador de crecimiento durante la etapa de multiplicación tuvo mayor efecto en las concentraciones con un promedio total de: AIB 0 mg/L, a una altura de 5,03 cm, 7 hojas y 7 raíces; AIB 2 mg/L, a una altura de 5,13 cm, 7 hojas y 9 raíces; AIB 4 mg/L, a una altura de 3,64 cm, 7 hojas y 4 raíces y AIB 6 mg/L, a una altura de 3,54 cm, 6 hojas y 3 raíces,

- En las variables de análisis: Se obtuvieron porcentajes de supervivencia del Factor A tipo de corte de 89,59% y del Factor B concentraciones de (AIB) de 75,01%. Mientras que en el porcentaje de contaminación del Factor A tipo de corte de 10,3% y del Factor B concentraciones de (AIB) de 33,32%. En el porcentaje de oxidación del Factor A tipo y del Factor B, fue de 0%, no hubo presencia de oxidación.

- En cuanto a las concentraciones se obtuvo los efectos de la auxina (AIB), durante la fase de multiplicación:
 - A una concentración de AIB de 0 mg/L. En corte apical se obtuvo la altura de 5,41 cm, 9 hojas y 8 raíces, mientras que en el corte medio tuvo una altura de 4,64 cm, 5 hojas y 6 raíces.
 - A una concentración de AIB de 2 mg/L. En corte apical se obtuvo la altura de 5,61 cm, 9 hojas y 12 raíces, mientras que en el corte medio tuvo una altura de 4,66 cm, 5 hojas y 6 raíces.

- A una concentración de AIB de 4 mg/L. En corte apical se obtuvo la altura de 5,14 cm, 8 hojas y 6 raíces, mientras que en el corte medio tuvo una altura de 2,14 cm, 4 hojas y 2 raíces.
- A una concentración de AIB de 6 mg/L. En corte apical se obtuvo la altura de 4,60 cm, 9 hojas y 3 raíces, mientras que en el corte medio tuvo una altura de 2,47 cm, 3 hojas y 2 raíces.
- Se determinó que la mejor concentración es de 2 mg/L de AIB, ya que se obtuvo los mejores resultados tanto en el corte apical y medio, en las variables agronómicas como: altura de la planta, número de hojas y número de raíces.

7. RECOMENDACIONES

Sobre la base de las conclusiones obtenidas, se recomienda lo siguiente:

- Se recomienda realizar el corte de meristemos menores de 0.5 cm, para obtener plantas sanas (bacterias, virus y otros).
- Se sugiere realizar el medio de cultivo MS y la adición del regulador de crecimiento (auxina AIB) con una concentración de 2 mg/L, en otras variedades de papa, es preferible trabajar en la etapa de multiplicación.
- También se recomienda trabajar con otros tipos de hormona (auxina o citoquinina), en concentraciones adecuadas, porque a altas concentraciones llegan a obtener callos.
- Es preferible trabajar en cortes apicales, donde se observó mayor desarrollo con respecto a la altura de vitroplanta, número de hojas y número de raíces, también se sugiere no trabajar en cortes medios, por que tardan en regenerarse.
- Se recomienda cumplir estrictamente los protocolos de Biotecnología Vegetal, en el procedimiento de introducción y multiplicación de las muestras y tener mucha asepsia durante las 5 etapas de la micropropagación.

8. BIBLIOGRAFIA

AGUIRRE, G. (2018). Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos . Cochabamba-Bolivia: (2da Edición). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales. Cochabamba , Bolivia. 103 p.

ALIAGA, R. (2008). Sustitución de la solución de vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962) por extracto de harina de quinua y cañahua para la multiplicación "*In Vitro*" de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* spp andigenum). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

CAILLANTE, R. (2017). Establecimiento de medios de cultivo y tipo de explante en *in vitro* plantas de papa variedad huaycha (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de producción de semilla. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

CHAMORRO, Albeiro Hernan, & Martinez, Sonia Liceth, & Fernandez, John Cristhian, & Mosquera, Teresa (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Limonium var. Misty blue. *Agronomía Colombiana*, 25 (1), undefined-undefined. [fecha de Consulta 11 de Octubre de 2019]. ISSN: 0120-9965. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1803/180316240006>.

DREW, R. (1992). Improved Techniques for *In Vitro* Propagation and Germplasm Storage of Papaya. *Hort Science* 27(10):1122-1124.

ENRÍQUEZ del Valle, José Raymundo, & Carrillo Castañeda, Guillermo., Rodríguez de la O, José Luis (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28 (2), undefined-undefined. [fecha de Consulta 11 de Octubre de 2019]. ISSN: 0187-7380. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61028212>

ESPINOSA, R. (2013). *Biotecnología Agrícola*. Editorial Universitaria. Oruro – Bolivia.

GARCÍA Ramírez Yudith, Marisol Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez Mederos, Ortelio Hurtado Rivalta (2012). Efecto del AIB y el TDZ en el enraizamiento in vitro de plantas de *Bambusa vulgaris* var *vulgaris* Schrad. ex Wendl.

HERNANDEZ, L. (2015). Eficiencia del tratamiento con ácido indol-3-butírico en el enraizamiento de estacas de berenjena (*Solanum betaceum* Cav.). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Cajamarca. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela Académico Profesional de Agronomía. Cajamarca – Perú.

HORTON D Y BRETH S (1992). *La papa, producción, comercialización y programas*. Copulación de: Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Peru editorial Hemisferio Sur, Montevideo.

HUASCO, V. (2000). Producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*), Variedad Sani imilla Negra por medio de selección positiva, testeo serológico y utilización de brotes de araca, provincia Loayza. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

IBTEN, ESPINOSA, F. (1994). *Introducción a la Biotecnología*. Memorias Biotecnología de Cultivos de Tejidos in vitro. Umsa. Centro de Estudiantes de Agronomía.

IBTA/PROINPA, (1997). *Características de la producción de papa en Cochabamba, Potosí y Chuquisaca*. Convenio IBTA CIP COSUDE. Cochabamba – Bolivia.

IRIARTE V, TERRAZAS F, AGUIRRE G., (1997). Primer Encuentro Taller sobre el Mantenimiento de la Diversidad de Tubérculos Andinos en sus zonas de origen Cochabamba. Memoria.

JIMENEZ, M. (2005). El cultivo de la papa. SAG, (Secretaria de Agricultura y Ganaderia, Honduras).

LOPEZ, B. (2017). Origen e historia de la patata o papa. Disponible: <https://comida.uncomo.com/articulo/origen-e-historia-de-la-patata-o-papa-44052.html>.

LLANCO, M. (2013). Efecto de la concentración de sacarosa y del regulador de crecimiento BAP en la multiplicación y tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*). Tesis de grado para optar el título de licenciado en Ingeniería Agronómica.

MAMANI, M. (2009). Evaluación de la carragerina, en la propagación in vitro de tres especies vegetales de importancia comercial: papa (*Solanum tuberosum*), crisantemo (*Chrysanthemum* sp) y piña (*Ananas comosus*). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

MONTES, S. (1995). El cultivo in vitro de células, tejidos y órganos. Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

MURILLO, R. (2014). Introducción a la Biotecnología Agrícola. La Paz – Bolivia. Facultad de Agronomía.

OCHOA, F. (2014). Efecto de tres dosis de Ácido Indolbutirico (AIB) y tres Concentraciones de sales, sobre el enraizamiento crecimiento y rendimiento del micro-esquejes de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). En condiciones de invernadero. Universidad de San Carlos de Guatemala. Centro Universitario de San Marcos. Carrera de Ingeniero Agrónomo con Orientación en Agricultura Sostenible. San Marcos. 2014.

PANADÉS, E. (2008). Lanzamiento del Año internacional de la Papa en Bolivia. Edit. M. Vargas, R. Villapardo y J. Chavez MDRAYMA (Ministerio de Desarrollo Rural, Agropecuario y Medio Ambiente). La Paz-Bolivia.

PEREA M Y TIRADO A. (2011). Cultivos de tejido vegetales in vitro (manual de prácticas de laboratorio). Editorial Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología, sede de Bogotá.

PROINPA. (1994). Catalogo Boliviano de Cultivares de Papa Nativa. Cochabamba, BO, Programa de Investigación de la papa.

POMA, M. (2014). Efecto 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 licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.(pp 17, 18-19).

QUISPE, D. (2010). Evaluación de dos medios de cultivo y diferentes concentraciones de Benzil Amino Purina (BAP) en la multiplicación *in vitro* de seis accesiones del genero musa (*Musa acuminata* y *Musa balbisiana*). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

QUISPE, D. (2016). Evaluación de dos variedades de papa (*Solanum* ssp.) bajo tres niveles de K20 con la aplicación de ceniza como abono natural en la Comunidad de Finaya. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

RODRIGUEZ, M. (2012). Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Editado por: Universidad Nacional del Altiplano Puno – Perú. Impreso Centro papelerero de norte s.a.

SOLIZ, M. (2004). Utilización de tres diferentes almidones, como agente de soporte, en medios de propagación in Vitro de papas nativas *Solanum tuberosum* súbsp. andigena,

var *Waycha paceña* y *Solanum x juzépczukii*, var *Bola luki*). Tesis de Lic. En Ing. Agro. UMSA, Fac. De Agronomía. La Paz, Bolivia. (pp 2-35).

URIBE, Matilde E, Ulloa, José, Delaveau, Catherine, Sáez, Katia, Muñoz, Fernando, & Cartes, Priscila. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>.

VILLANUEVA, R. (2015). Establecer el número óptimo de subcultivos *in vitro* a partir de meristemas, de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* Ssp. *andigenum*). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección del material vegetal



Recolección de los tubérculos de papa en campo



Desinfección de los brotes de papa y se colocó en cajas petrys

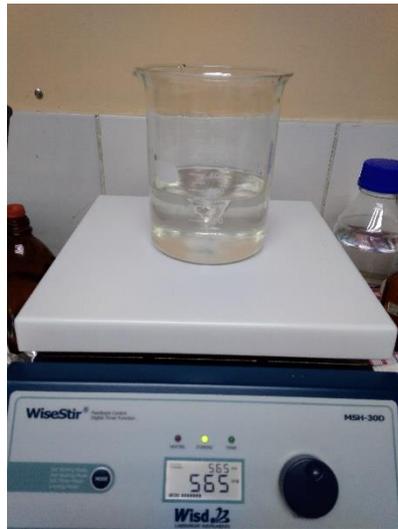


Se llevó a la incubadora para acelerar el brote de los tubérculos



Brotos de papa

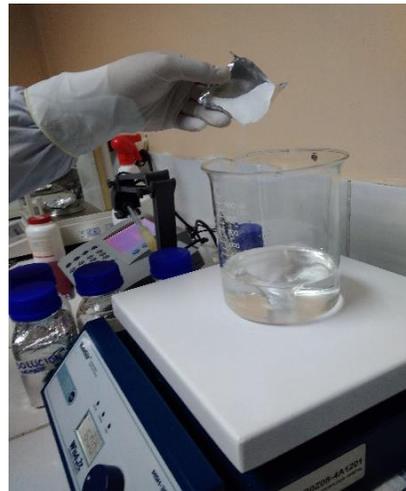
Anexo 2. Preparación de Medios de cultivos para la etapa de introduccion y multiplicación



Agitador magnético y el vaso precipitado Pesamos el myoinositol (mg)



Pesamos la sacarosa (g), el murashige preparado y el gelzan



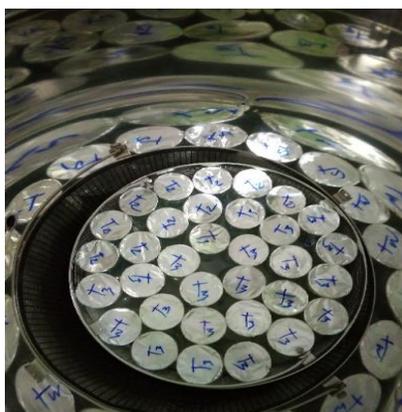
Se pipeteo la auxina AIB y todos lo pesado, para luego aforarlo con ADE



Distribución del medio de cultivo a los vasos, se llevó al microondas



Área de preparación de medios de cultivo



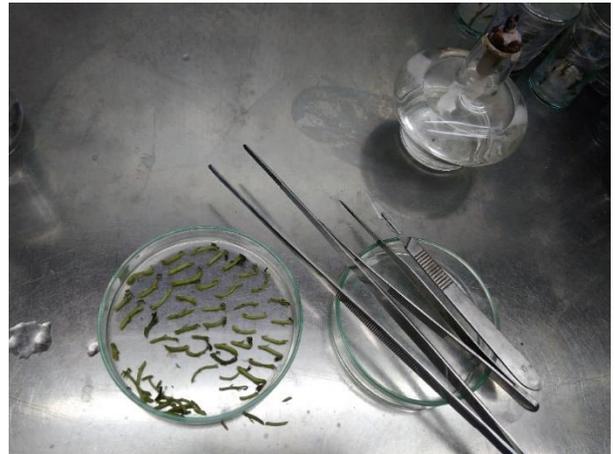
Se realizó el sellado de los vasos y se llevó al autoclave



Esterilización de los medios de cultivo para introducción de brotes de papa con rayos ultravioleta (UV)



Desinfección de los brotes, con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 3%



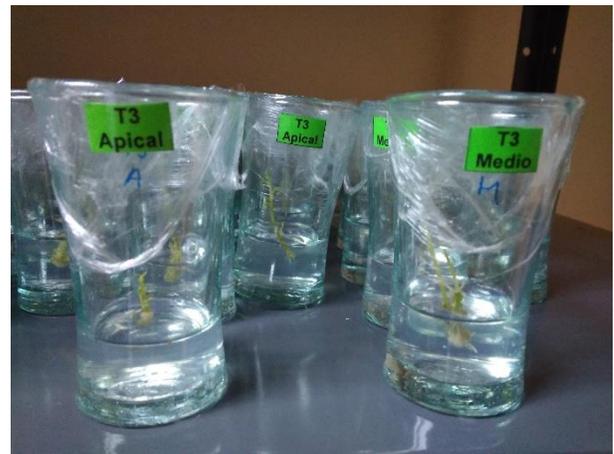
Introducción y multiplicación de brotes de papa (apical y medio) al medio de cultivo



Roturado de las muestras multiplicadas en la sala de crecimiento controlado



Evaluación del crecimiento y desarrollo de las vitroplantas



Registro de las variables de respuestas