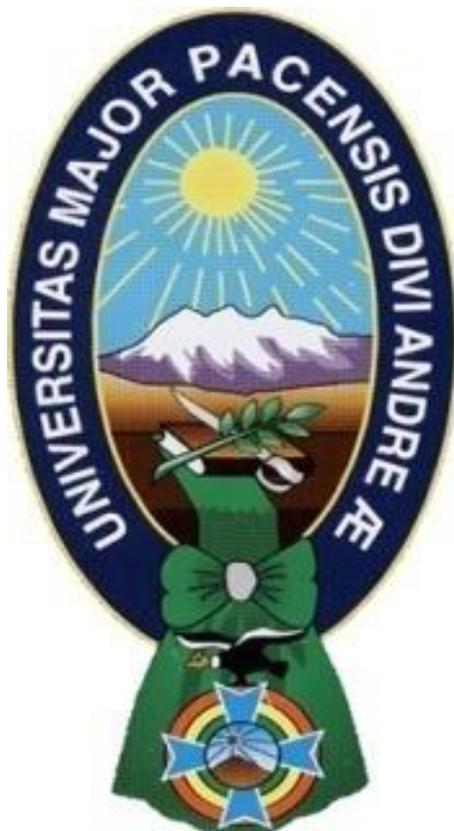


**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**ESTABLECER EL NÚMERO ÓPTIMO DE SUBCULTIVOS *IN VITRO* A
PARTIR DE MERISTEMOS, DE DOS VARIEDADES DE PAPA
(*Solanum tuberosum Ssp. andigenum*)**

Presentado por:

RUBÉN VILLANUEVA ARIAS

**La Paz – Bolivia
2015**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**

**ESTABLECER EL NÚMERO ÓPTIMO DE SUBCULTIVOS *IN VITRO* A PARTIR DE
MERISTEMOS, DE DOS VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum Ssp.*
andigenum)**

Tesis de Grado presentado como requisito
Para optar a Licenciatura en
Ingeniería Agronómica

RUBEN VILLANUEVA ARIAS

Asesores:

Ing. Ph. D. David Cruz Choque

Ing. Rafael Murillo García.....

Tribunal revisor:

Ing. M. Sc. René Calatayud Valdez.....

Ing. M. Sc. Hugo Bosque Sánchez.....

Ing. Ph. D. Yakov Arteaga García.....

Aprobada

Presidente Tribunal Revisor.....

AGRADECIMIENTOS

En especial agradezco al Instituto Benson (Benson Agriculture And Food Institute), por tener la oportunidad de estudiar y trabajar; y poder desarrollarme en la vida profesional y progresar en esta vida. A mi docente de Biotecnología Dr. Félix Marza que me apoyo a realizar mi tesis en la materia de biotecnología. A mis compañeros de la facultad de Agronomía que compartimos momentos de estudio y diversión. Por el apoyo que nos brindamos como compañeros y como amigos de confianza.

DEDICATORIA

A la Lic. Elizabeth García y al Ing. Gustavo Troche que me ayudaron a poder terminar mis estudios y a la culminación de este trabajo de investigación.

Gracias a mi familia y a Carla N. Juanes P. por la paciencia que tuvieron conmigo, por el apoyo moral y ayudándome a seguir adelante con mis estudios.

A mis docentes de la facultad de Agronomía. Al Dr. David Cruz director de Carrera de la Facultad de Agronomía por el trabajo que realiza a favor de la facultad. A mi docente de Biotecnología Ing. Rafael Murillo por el apoyo y los consejos que me brindo para la culminación de mi tesis.

CONTENIDO GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE.....	iii
INDICE DE FOTOGRAFÍAS	vi
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.2 Objetivos Específicos	2
1.1.3 Hipótesis.....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Cultivo de Tejidos.....	5
2.2 Micropropagación.....	8
2.3 Medio de Cultivo para la Multiplicación de Papa <i>in vitro</i>	10
2.4 Factores que Podrían Inducir Variación Somaclonal	14
2.5 Uso Práctico de la Variación Somaclonal	16
2.6 Taxonomía y Morfología	17
2.6.1 Taxonomía	17
2.6.2 Tipo de Planta	17
2.6.3 El fruto	18
2.6.4 Semilla	18
2.6.5 Raíz	18
2.6.6 La Flor	19
2.7 Descripción de las Variedades Estudiadas	19
2.7.1 Descripción de la Variedad Imilla Negra	19
2.7.1.1 Características Agronómicas.....	19

2.7.1.2	Características Morfológicas	19
2.7.1.3	Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos	19
2.7.2	Descripción de la Variedad Waych´a.....	20
2.7.2.1	Características Agronómicas.....	20
2.7.2.2	Características Morfológicas	20
2.7.2.3	Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos	20
3.	LOCALIZACION	20
3.1	Ubicación Geográfica	20
4.	MATERIALES Y METODOS	21
4.1	Materiales	21
4.1.1	Material de Laboratorio	21
4.1.2	Sala de Preparación de Medios de Cultivo.....	21
4.1.3	Sala de Trasferencia.....	21
4.1.4	Sala de Crecimiento.....	21
4.1.5	Material de Vidrio	22
4.1.6	Material Aséptico.....	22
4.1.7	Material Vegetal.....	22
4.1.8	Material de Gabinete	22
4.2	Metodología	23
4.2.1	Obtención de Material.....	23
4.2.2	Procedimiento Experimental	23
4.2.3	Observación y Toma de Datos.....	25
4.2.3.1	Altura de Planta	25
4.2.3.2	Tiempo de Regeneración.....	25
4.2.3.3	Presencia de Cambios Morfológicos.....	25
4.2.3.4	Temperatura.....	26
4.2.3.5	Porcentaje de Contaminación	26
4.3	Diseño Experimental.....	26
4.3.1	Modelo Lineal Aditivo:.....	26
4.3.2	Factores.....	27
4.3.3	Combinación Factorial	27
4.3.4	Variables de Respuesta	28
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
5.1	Establecimiento	29

5.2	Altura de Planta.....	29
5.2.1	Análisis de varianza para el primer subcultivo.....	29
5.2.2	Análisis de varianza para el segundo subcultivo.....	32
5.2.3	Análisis de varianza para el tercer subcultivo.....	35
5.2.4	Análisis de varianza para el cuarto subcultivo.....	38
5.2.5	Análisis de varianza para el quinto subcultivo.....	41
5.3	Días de Recuperación.....	45
5.3.1	Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 1).....	45
5.3.2	Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 2).....	46
5.3.3	Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 3).....	49
5.3.4	Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 4).....	50
5.3.5	Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 5).....	53
5.4	Presencia de Cambios Morfológicos.....	56
5.5	Temperatura.....	61
5.6	Porcentaje de Contaminación.....	61
5.7	Análisis de Costos Parciales de Producción.....	62
6.	CONCLUSIONES.....	65
7.	RECOMENDACIONES.....	66
8.	BIBLIOGRAFIA.....	67
	ANEXOS.....	70

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Foto 1. Variedad Imilla negra cuarto subcultivo explante medio. Quinto subcultivo explante basal.	56
Foto 2. Variedad Imilla Negra cuarto subcultivo explante apical	57
Foto 3. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes medio y basal.	57
Foto 4. Variedad Imilla Negra cuarto subcultivo explantes apical, medio y basal.	58
Foto 5. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes medio y basal	59
Foto 6. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes apical, medio y basal.....	59
Foto 7. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante apical	60
Foto 8. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante apical.....	60
Foto 9. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante medio	61

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores en el estudio de subcultivo	27
Cuadro 2. Tratamientos en el estudio de subcultivos de dos variedades de papa.	27
Cuadro 3. Análisis de varianza para la altura de planta en el primer subcultivo.....	30
Cuadro 4. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	30
Cuadro 5. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	31
Cuadro 6. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta.	31
Cuadro 7. Análisis de varianza para altura de planta en el segundo subcultivo.	33
Cuadro 8. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	33
Cuadro 9. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	34
Cuadro 10. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta. ...	34
Cuadro 11. Análisis de varianza para altura de planta en el tercer subcultivo.	36
Cuadro 12. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	36
Cuadro 13. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	37
Cuadro 14. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en el porcentaje de altura de planta.....	37
Cuadro 15. Análisis de varianza para altura de planta en el cuarto subcultivo.	39
Cuadro 16. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	39
Cuadro 17. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	40
Cuadro 18. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta. ...	40
Cuadro 19. Análisis de varianza para altura de planta en el quinto subcultivo.....	42
Cuadro 20. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad	42
Cuadro 21. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	43
Cuadro 22. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta. ...	43
Cuadro 23. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el primer subcultivo.....	46
Cuadro 24. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedades.	46
Cuadro 25. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el segundo subcultivo.	47
Cuadro 26. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	47
Cuadro 27. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	48
Cuadro 28. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en días de recuperación.....	48
Cuadro 29. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el tercer subcultivo.....	50
Cuadro 30. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el cuarto subcultivo.....	50
Cuadro 31. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	51

Cuadro 32. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	51
Cuadro 33. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en días de recuperación.....	52
Cuadro 34. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el quinto subcultivo.	53
Cuadro 35. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.	53
Cuadro 36. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.....	54
Cuadro 37. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B para días de recuperación.....	54
Cuadro 38. Contaminación de los Subcultivos.....	62
Cuadro 39. Análisis de Costos Parciales para el primer subcultivo	62
Cuadro 40. Análisis de Costos Parciales para el segundo subcultivo.	63
Cuadro 41. Análisis de Costos Parciales para el tercer subcultivo.....	63
Cuadro 42. Análisis de Costos Parciales para el cuarto subcultivo.....	64
Cuadro 43. Análisis de Costos Parciales para el quinto subcultivo.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el primer subcultivo	32
Figura 2. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el segundo subcultivo.	35
Figura 3. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el tercer subcultivo.	38
Figura 4. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para cuarto subcultivo	41
Figura 5. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el quinto subcultivo	44
Figura 6. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para los días de recuperación del segundo subcultivo	49
Figura 7. Efecto de los Tratamientos en la Altura de Planta para los días de recuperación del cuarto subcultivo.....	52
Figura 8. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para los días de recuperación del quinto subcultivo.	55

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar en campo el comportamiento en subcultivos *in vitro* características agronómicas y morfológicas de dos somaclones de papa, Imilla Negra y Waych´a. En la multiplicación de las dos variedades de papa, se utilizaron tipos de explantes apicales, medios y basales. En la preparación del medio de cultivo se utilizó el medio Murashige & Skoog (1962). De cada variedad y de cada tipo de explante se evaluó la altura de las plantas, presencia de cambios morfológicos, tiempo de regeneración, porcentaje de contaminación y temperatura. En los subcultivos realizados los tipos de explante apicales el crecimiento fue de menor tiempo a diferencia de los explantes medios y basales, en las dos variedades de papa. Los cambios morfológicos que se esperaban tener, eran en los subcultivos séptimo u octavo, pero en la variedad Waych´a se presentó en el quinto subcultivo de los explantes medios y basales, en los explantes apicales presentó en el sexto subcultivo.

Para analizar el experimento se utilizó el modelo estadístico Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial,

La variedad Imilla Negra el tiempo de regeneración fue más rápido en los explantes apical y medio que a diferencia de los explantes basales que la variedad Waych´a, en ese llegó al cuarto subcultivo donde presentaron cambios morfológicos en los explantes apicales, medios y basales.

Los cambios morfológicos denominado variación somaclonal por Larkin y Scowcroft (1981), es un evento que puede aparecer durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; son modificaciones genéticas o epigenéticas en las células y los tejidos cultivados.

Esta variación se ha usado en procesos de mejoramiento genético y para ampliar la variación genética natural; sin embargo, cuando el objetivo es la propagación clonal de una variedad, como en el caso de la micro propagación mediante embriogénesis somática, la variación somaclonal resulta un fenómeno poco deseado.

ABSTRACT

With the aim of evaluating field behavior in vitro subcultures agronomic and morphological two somaclones potato Imilla Black and Waych'a features. In the multiplication of the two varieties of potato explants types of apical, middle and basal used. Murashige & Skoog (1962) medium was used in the preparation of the culture medium. Of each variety and each explant type plant height, presence of morphological changes, regeneration time, temperature and contamination rate was evaluated. In subcultures made explant types of apical growth was less time unlike the media and basal explants in the two potato varieties. Morphological changes were expected to have, were in subcultures seventh or eighth, but the variety Waych'a was presented at the fifth subculture media and basal explants in apical explants presented in the sixth subculture.

To analyze the statistical model experiment design was used for bivariate under Random.

The variety Imilla Negra regeneration time was faster in the apical explants and medium unlike basal explants variety Waych'a, then came the fourth subculture where they presented morphological changes in apical explants, middle and basal.

Morphological changes called somaclonal variation Larkin and Scowcroft (1981), is an event that may occur during in vitro plant tissue culture; are genetic or epigenetic alterations in cultured cells and tissues.

This variation has been used in breeding processes and to expand natural genetic variation; however, when the objective is a variety of clonal propagation, as in the case of micro propagation by somatic embryogenesis, somaclonal variation has been poorly is desired.

1. INTRODUCCION

Las papas nativas son el resultado de un proceso de domesticación, selección y conservación ancestral por parte de los habitantes de las zonas alto andinas. Algunas variedades nativas, presentan sabor amargo perceptible, que puede influir en el nivel de aceptabilidad y determinar el rechazo de los tubérculos por los consumidores.

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es originaria de los Andes sudamericanos y actualmente es uno de los cuatro alimentos básicos de la humanidad, junto al trigo, arroz y maíz.

Se reporta que *Solanum tuberosum* L. se domesticó en Sudamérica, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó hace unos 10,000 a 7,000 años, aunque los primeros vestigios se encontraron en el cañón de Chilca, al sur de Lima en Perú que datan de una antigüedad de hace 10,500 años. Aunque existe controversia y opiniones muy diversas en cuanto al origen de la papa, sin duda se estima que el altiplano peruano-boliviano es el centro de origen de este importante cultivo.

La papa ha significado la subsistencia para millones de personas durante los últimos tres siglos. Una ración diaria suplementada con pequeñas cantidades de leche, carne y pescado ha sido la piedra angular de la alimentación de gran parte de la población desde Sur América hasta Europa.

En el cultivo de la papa la producción de semilla tubérculo de buena calidad es un proceso difícil, complejo, laborioso y de alto costo. Dentro de este proceso, el cultivo de explantes es un método eficiente para eliminar a esta especie de virus, viroides y otras enfermedades.

La formación de brotes a partir de ápices, yemas o explantes y la subsecuente regeneración de plantas es el sistema más sencillo de multiplicación *in vitro* y son más de mil las especies en las cuales se ha logrado establecer esta técnica. Sin embargo, estos resultados a nivel de laboratorio no corresponden con la cantidad de

especies que son propagadas a escala comercial y esto obedece a múltiples razones, desde protocolos ineficientes para la multiplicación, enraizamiento y a climatización, la baja calidad de las plantas resultantes del proceso hasta los precios no competitivos en comparación con otros métodos de propagación vegetativa.

El presente trabajo tiene como propósito conocer el número óptimo de subcultivos *in vitro* que permita mantener las características de vigor, multiplicación y cambios morfológicos de las vitroplantas evitando de esta manera plantas atípicas que podrían presentarse de las variedades de papa (waych´a e imilla negra), por lo que nos permita conocer el tipo de explante apropiado para su multiplicación que puedan formar vitroplantas con características para la formación de un organismo completo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

- Determinar el número óptimo de subcultivos a partir de vitroplantas obtenidas mediante cultivo de meristemos, que permita mantener las características de vigor, multiplicación y cambios morfológicos de las dos variedades de papa.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Establecer el comportamiento de las vitroplantas a partir de esquejes apicales, medios y basales en cada subcultivo.
- Cuantificar el tiempo que demora en regenerar nuevas vitroplantas en cada subcultivo.
- Comprobar si existen cambios morfológicos, de las variedades estudiadas en cada subcultivo.
- Realizar el análisis de los costos parciales de producción de los subcultivos.

1.1.3 Hipótesis

Ho.- El comportamiento de las vitroplantas a partir de esquejes apicales, medios y basales en cada subcultivo son las mismas.

Ho.- El tiempo que demora en regenerar nuevas vitroplantas en cada subcultivo son las mismas.

Ho.- No existen cambios morfológicos, de las variedades estudiadas en cada subcultivo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La “*biorrevolución*” trajo consigo el avance de las ciencias biológicas en las últimas dos décadas, dando lugar al desarrollo de técnicas que posibilitan el estudio de las planta a escala celular y molecular. Estas nuevas técnicas se conocen como Biotecnologías y se están convirtiendo en herramientas para el mejoramiento de plantas progreso de la agricultura (Roca y Mroginski, 1991).

Para Darías (1993), la multiplicación de los descubrimientos en el campo de la bioquímica, la genética, la biología molecular y celular a puesto al día la idea de “*Biorrevolución*”.

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).

Biotecnologías “*apropiables*” significan herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible al ser técnicas dentro del nivel de desarrollo técnico-científico de un país. Proveen beneficios tangibles a los destinatarios y son ambientales seguras, socioeconómicamente, culturalmente aceptables. (Escalan, 2002).

En el año1990 la producción mundial de plantas reproducidas o clonadas in vitro, se estimaba en alrededor de 500 millones. Esta producción era realizada en unos 550 laboratorios comerciales, concentrados mayormente en Europa Occidental, Estados Unidos, Israel y algunos países de Europa. En 1993 en Europa Occidental existían un total de 172 laboratorios comerciales con una producción total de 125 millones de

plantas en ese año sin embargo, más de 150 de ellos reportan una capacidad superior a un millón de vitroplantas por año (Darías, 1993).

En la micro propagación convencional, considerada como primera generación, es una tecnología bien conocida y manejada con más de dos décadas de experiencia práctica en muchos países. En la actualidad se conoce que ha sido aplicada, con diversos objetivos, en más de 50.000 variedades de más de 1.000 especies de plantas de flores y ornamentales, agrícolas y forestales, así como especies de uso industrial. De esta técnica se conoce muy bien sus ventajas y sus desventajas. (Darías, 1993)

Es una tecnología relativamente simple, que una vez puesta a punto requiere de una alta disciplina tecnológica y organizativa, pero los requerimientos de personal con alta capacidad técnica son mínimos, así como la complejidad de los equipos y la instalación. Posibilita la obtención de altas tasas de multiplicación y aceptable estabilidad genética al compararse con los sistemas de reproducción agamica o clonal utilizados durante muchos años. Sus costos han sido elevados. (Montes, 1995).

El objetivo principal de la Biotecnología, es el aumento de la productividad de los vegetales, lo cual es imprescindible para lograr un incremento en la producción de alimentos y otros productos producidos por las plantas.

Las investigaciones que se realiza en este campo buscan obtener:

- Producciones superiores por su calidad genética.
- Plantas más resistentes a las condiciones ambientales.
- Plantas resistentes a plagas y enfermedades.
- Conservación de la diversidad de las especies (Darías, 1993).

2.1 Cultivo de Tejidos

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal, se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales. Estas técnicas consistieron en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977, citado por Hurtado y Merino, 1997)

La aptitud para la multiplicación vegetativa puede ser considerada como una potencialidad fundamental de los vegetales. Toda célula diploide, posee en principio en su núcleo, la totalidad de la información característica del genotipo. La reconstitución de un individuo por vía asexual a partir de una célula o de un pequeño grupo de células es la expresión de la "Totipotencia celular" (Aptitud de las células para expresar la totalidad de las potencialidades del genoma) (Moya, 2001).

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín *en vidrio*) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células u órganos. Se llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inoculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas (Ashmore, 1997).

El cultivo de tejidos es una técnica que consiste en aislar una porción de planta (Explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco.

La investigación en cultivos de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades que van desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular hasta la investigación clonal o el mejoramiento genético de las plantas (Roca y Mroginski, 1991).

El concepto de explante se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta, que puede ser un tejido (fragmentos de hojas, tallos, raíces completas, etc.), estructuras como las anteras y los ovarios, o bien células individuales (como en el caso de los protoplastos). Con excepción de los óvulos y el polen, los explantes están constituidos por tejidos y/o células somáticos. (Moya, 2001).

El meristemo es un tejido indiferenciado localizado dentro del ápice de un brote o yema axilar o apical en crecimiento, generalmente observándose bajo el microscopio como una estructura brillante en forma de domo, su medida es menor a 0.1 mm de longitud y en constante división celular, se asume que está libre de virus por carecer aún de los vasos del floema bien diferenciados, impidiéndose así la presencia de partículas vírales en el meristemo al no moverse del tejido infectado de una planta enferma, al tejido sano en formación. (Ashmore, 1997).

El cultivo de tejidos vegetales en un área de la Biotecnología vegetal. Abarca un conjunto de técnicas que consisten en cultivar en condiciones controladas diferentes partes de la planta. Constituyen estudios básicos aplicados en la Micro propagación de especies y como modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y morfológicos (Montes, 1995).

El proceso de cultivo *in vitro* incluye varias etapas, que son:

En la etapa 0. Preparación del material vegetal: El empleo de ex plantas que se encuentran expuestas a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*.

La planta donante debe elegirse sobre la base de una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de ex planta a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

En la etapa I. Establecimiento del cultivo aséptico: El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explanto. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantos. Se inoculan los explantes o ápices en tubos de cultivo; a los pocos días se observa si hay proliferación de organismos contaminantes (hongos o bacterias); los tubos de cultivo contaminados deben eliminarse y los que se mantienen sanos se deben revisar periódicamente para observar el desarrollo de lo que será la futura planta (formación de hojas, yemas, tallo, etc.).

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio.

En la etapa II. Propagación de propágulos sanos (subcultivos): El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Se deben separar los propágulos obtenidos y pasarlos a un medio fresco para la proliferación de nuevos brotes y para el desarrollo de los mismos. De acuerdo con la cantidad de material que se necesite, serán los subcultivos que deben hacerse. Se recomienda no excederse de cinco subcultivos, ya que el vigor de la planta y calidad de la misma pueden decrecer. (Ashmore, 1997).

Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos. (HURTADO M. et al., 1994)

En la etapa III. Enraizamiento de los propágulos obtenidos: En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizogénica, se procede al enraizamiento de los propágulos para la obtención de plantas completas; dura de 2 a 4 semanas. (HURTADO M., 1994)

En la etapa IV. Trasplante a suelo y acondicionamiento a invernadero: La textura, el pH y la composición del sustrato estarán dados en las condiciones específicas de la especie que se trate. La etapa de acondicionamiento a invernadero dura de 6 a 8 semanas. (HURTADO M., 1994)

La Obtención y multiplicación de papa sana in vitro, en su primer fase de la producción de tubérculo-semilla se lleva a cabo en el laboratorio y se inicia con la siembra de una sección de tejido vegetal de la papa, llamado explante, en un medio de cultivo artificial, el cual bajo condiciones de esterilidad y los apropiados requerimientos de temperatura y luz, crece para dar origen a una plántula in vitro en poco tiempo, que es seccionada en micro estacas, las cuales son subcultivadas nuevamente y así sucesivamente hasta tener tantos miles de plantas in vitro como se hayan planeado. (Pérez, 1998).

2.2 Micropropagación

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. (Curso teórico práctico de cultivo de tejidos Cochabamba-Bolivia, 1996).

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. (Calderón, 1987).

La Biotecnología ha desarrollado diversas técnicas entre las que se encuentra la propagación masiva de plantas a través de la micro propagación *in vitro* (Multiplicación a partir de meristemas ápices y yemas). Esta es una tecnología bien conocida y manejada con más de dos décadas de experiencia práctica en muchos países. En la actualidad se conoce que ha sido aplicada con diversos objetivos, en más de 50.000 variedades, de más de mil especies de plantas de flores y ornamentales, agrícolas y forestales, así como en especies de uso industrial. Posibilita la obtención de altas tasas de multiplicación y de aceptable estabilidad genética. (Pérez, 1998).

Para Roca y Mroginski (1991), la palabra Micro propagación fue usada por primera vez en 1968, por Hartman y Kester. Fue definida entonces como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas, de sus órganos, tejidos o células, capaces de producir poblaciones importantes de plántulas. Era un procedimiento que permitía, además, él desvió tanto del proceso sexual normal como la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

La Micro propagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce puede crecer y ser fenotípica y genotípica idéntica a la planta original de la que deriva. Hasta el momento las puntas de tallos y las yemas laterales son las que se usan para estos propósitos. Por esta razón cuando se usa la palabra Micro propagación muy raras veces se piensa en el uso de los callos, de células libres o de otros sistemas de tejidos más exigentes. Sin embargo, hay un hecho claro en todo esto: Las plantas que pueden, multiplicarse o propagarse por medios vegetativos convencionales no siempre responden igualmente bien a los métodos artificiales de propagación vegetativa. Incluso en el caso de las plantas que se propagan con facilidad ocurre generalmente que cuando menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad que se encuentra para fomentar la producción de brotes y raíces (Roca Y Mroginski, 1991).

Según Darías (1993), esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas podemos citar;

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo: Cuando se usan métodos de propagación convencionales, un esqueje produce una planta y una semilla, sin embargo, un explante teóricamente puede producir un infinito número de plantas.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajo costo y en un tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos.

Las plantas Micro propagadas “*in vitro*”, muestran un desarrollo uniforme y un crecimiento en el vigor el cual se expresa como un crecimiento más rápido y un aumento en los rendimientos con respecto a los métodos convencionales, además de reducirse el periodo de cosecha por la uniformidad de la plantación (Darías, 1993).

2.3 Medio de Cultivo para la Multiplicación de Papa *in vitro*

El medio de cultivo semisólido más utilizado para la multiplicación de explantes sencillo, se denomina MS dado que fue desarrollado por Murashige y Skoog en 1962. (Murashige y Skoog, 1962). Ver ANEXO

Una vez establecido el explante, ápices inician rápidamente la brotación y en dos a cuatro semanas se obtiene una planta *in vitro* con seis o siete nudos. Las plántulas *in vitro* son seccionadas en micro estacas con una o dos yemas para ser transferidas nuevamente a recipientes con medio de cultivo MS estéril y así sucesivamente para

incrementar la cantidad de plantas *in vitro* hasta obtener un total preestablecido (Escalan, 2002).

Los meristemas apicales tienen más probabilidad de estar libres de virus que los meristemas axilares, y que si los meristemas provienen de una planta en plena actividad hay mayor probabilidad de obtener plantas libres de virus. El tamaño óptimo a utilizar se decide tomando en cuenta dos factores: tamaño óptimo para la liberación del virus y tamaño óptimo para facilitar el cultivo. Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus si sólo se aísla el meristemo. Por otro lado, utilizar meristemas más grandes hace que la probabilidad de obtener plantas libres de virus sea pequeña. La técnica de cultivo de meristemas ha sido tradicionalmente utilizada en la iniciación de los cultivos *in vitro* y a la vez se ha señalado su uso en la obtención de plantas sanas, o sea libres de patógenos. (Moya, 2001).

El cultivo de meristemas es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma. La razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan los virus que van contaminando a la planta. Existen otros factores:

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

(Pierik, 2002).

Una vez que las plantas han salido de la fase *in vitro* (aclimatación y crecimiento inicial en invernadero y vivero) se dice que han entrado a la etapa *ex vitro*, *extra vitrum* o *post vitro*, y se les llama *vitroplantas*; no obstante cuando salen finalmente al

campo o la naturaleza están nuevamente en condiciones *in situ*. (Cassells & Curry 2001).

En la multiplicación del material vegetal se debe separar los nuevos brotes de los explantes madres, los cuáles se deben sembrar de forma independiente y realizar de uno a tres sub-cultivos. Al aumentar el número de sub-cultivos aumenta la probabilidad de variaciones somaclonales, producto del cultivo *in vitro*. (Pérez, 1998). Es por ello que los medios de cultivo deben ser lo más simple posible y que el uso de los reguladores del crecimiento solo se justifica en los casos estrictamente necesarios y en bajas concentraciones, ya que el uso de altas concentraciones también pueden provocar variaciones en el material vegetal. (Montalvo, 2005)

El número óptimo de subcultivos podría estimarse empíricamente luego de realizar pruebas de fidelidad genética en las plantas regeneradas a través de subcultivos subsecuentes. Una observación común es que en los períodos prolongados de cultivo hay una pérdida de totipotencia y que esto sucedería debido a la acumulación de mutaciones y a la alteración de los genes que son responsables de la regeneración. Sin embargo, un estudio realizado, demostró que las variaciones se producen al azar en los diferentes subcultivos, no habiendo una relación lineal entre el número de subcultivos y la cantidad de variación obtenida en plantas micropropagadas. (Cardone, *et al.*, 2006).

El objetivo de la etapa de multiplicación es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. (Olmos, 2006).

Subcultivo, división y transferencia de una parte de un cultivo a un medio fresco. A veces se utiliza para referirse a la adición de fresco a un cultivo de suspensión. Sinónimo de subcultivo, repicado, resiembra. (Zaid, 2004)

En los subcultivos o replicado cuando sembramos micro estaquillas en cultivo *in vitro*, no interesa que se emitan raíces ni hojas, si no que produzca una proliferación (crecimiento) para obtener nuevas micro estaquillas que se denominan subcultivos. No se pueden hacer infinitamente ya que se agota el material vegetal; tan sólo se hace 8 a 10 veces. (Zaid, 2004)

En el cultivo *in vitro*, un prolongado período de subcultivos puede inducir la aparición de variación somaclonal no deseable, ya que es conveniente introducir sólo las modificaciones que se desean y en forma controlada. (Díaz, 2006)

Finalmente, se observó que a pesar de haber plantas rustificadas en el subcultivo n°7 y n°8, la cantidad de plantas exitosas en invernáculo fue muy baja. Esto puede deberse a que durante los sucesivos subcultivos *in vitro* pueden haberse acumulado variaciones de tipo somaclonal (Cardone, 2004).

Este material fue sometido a cinco ciclos de propagación más para incrementar la cantidad de plántulas hasta lograr aproximadamente 500 para ser usadas como fuente de ápices meristemáticos durante el proceso de congelación. Este resultado concuerda con el trabajo reportado por Golmirzaie y Panta, (1996), quienes recomiendan realizar varios subcultivos para incrementar el vigor de las plántulas antes del congelamiento.

Las prácticas de corte del explante al inicio del cultivo *in vitro* y en los subcultivos posteriores pueden por sí mismas generar estrés oxidativo, de la misma forma en que lo hacen el hipoclorito y/o las sales de mercurio que se utilizan en la esterilización de los tejidos (Cassells & Curry 2001).

Para la conservación se usa la metodología habitual de micropropagación, es decir, una vez que la planta ha crecido y necesita la renovación del medio ya agotado, se subcultiva mediante repicajes sucesivos en condiciones ambientales óptimas. Con este sistema se cuenta con plantas disponibles en todo momento para su adaptación al exterior, pero se incrementan las posibilidades de contaminaciones y variabilidad

genética, dado el contacto continuo del material vegetal con los reguladores de crecimiento del medio de cultivo, que inciden a nivel metabólico sobre la estabilidad genética (variación somaclonal) (Phillips, 1994).

2.4 Factores que Podrían Inducir Variación Somaclonal

Otro aspecto importante de considerar relativo al uso del cultivo *in vitro* como técnica de conservación es la posibilidad de generar variación somaclonal, es decir, alteraciones genéticas de los materiales conservados *in vitro* respecto a la planta madre, situación no deseada desde el punto de vista de la conservación de germoplasma. Algunas de estas variaciones son heredables mientras que otras son epigenéticas, del tipo reversible y no hereditario. La variación somaclonal puede ser atribuida a diversos factores, tales como medios de cultivo, reguladores de crecimiento, tipo de explante y número de “repiques” requeridos entre subcultivos. Por lo tanto, es importante manejar los factores que inducen variación somaclonal y evaluar posibles alteraciones, utilizando análisis citológicos y/o moleculares en los materiales conservados *in vitro* (Pierik, 1987).

Además de la tasa normal de variación, propia de las células vegetales en condiciones normales, formando parte de un tejido, en un órgano y planta intactos, hay factores externos, propios del cultivo *in vitro*, que pueden inducir acumulación de variaciones genéticas y epigenéticas, que se manifiestan en el fenotipo. Algunos factores externos son: (1) método de cultivo *in vitro* y patrón de desarrollo, (2) edad del cultivo y subcultivos, y (3) algunos componentes del medio de cultivo. (Sánchez, 2009)

La variación somaclonal puede ser atribuida a diversos factores como los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el número de ‘repiques’ requeridos entre subcultivos. Por lo tanto, es importante manejar los factores que inducen variación somaclonal y evaluar posibles alteraciones, utilizando análisis citológicos y/o moleculares en los materiales conservados *in vitro* (Ashmore, 1997).

La proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos envejecidos y en plantas con varios subcultivos. Lo anterior probablemente se debe a la acumulación de alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y mutaciones. En ese sentido, mencionan que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos, en el caso de diferentes variedades. (Cardone, 2004)

La variación somaclonal puede ser caracterizada por diversos tipos de marcadores: (a) morfológicos, tales como estudio del cariotipo (análisis citológico), tamaño, color de las flores, forma de la hoja, etc.; (b) patrones isoenzimáticos, que se basan en la presencia de isoformas de enzimas específicas, que tienen la misma actividad, pero con diferente estructura molecular; (c) los basados en proteínas de reserva de las semillas; y (d) aquellos basados en el ADN. (Picca, 2004).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* tiene desventajas como el costo de la mano de obra y la manutención del material vegetal en los medios de cultivo. En algunas especies de propagación vegetativa es laboriosa y puede existir el riesgo de perder el material debido a contaminación por hongos y bacterias, errores humanos o variación somaclonal, la cual es muy perjudicial debido a la pérdida de variabilidad genética (Moya, 2000).

La variación somaclonal es un fenómeno muy difundido en las plantas provenientes de los cultivos de tejidos y la frecuencia con que estas variantes surgen depende de diferentes variables como la fuente de explante, medio de propagación, la cantidad de ciclos de propagación y el cultivar. Se ha demostrado que ocurren modificaciones genéticas en las células y tejidos cultivados *in vitro*, pues cuando las plantas regeneradas han pasado por una fase de callo, es común que se produzcan mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Larkin y Scowcroft, (1981) fueron los primeros en denominar este fenómeno como variación somaclonal, lo cual creó un gran expectativa a nivel mundial, comenzando en muchos laboratorios programas de mejoras utilizando el cultivo de tejidos (Ashmore, 1997).

Diversos autores han estudiado y discutido el origen de la variación somaclonal, llegando a la conclusión que la misma se produce por cambios genéticos pre-existentes o inducidos que se manifiestan o aparecen durante el desarrollo de las células en condiciones de cultivos de tejidos, lo que depende del genotipo de la especie, contenido hormonal del medio y la metodología empleada para la propagación (Dueñas, 2003).

2.5 Uso Práctico de la Variación Somaclonal

El mayor interés de la variación somaclonal radica en el hecho de que una gran frecuencia de las nuevas características de las plantas regeneradas, son heredables y transmitidas a la descendencia, pudiendo constituir una fuente de variabilidad genética y ser utilizadas en los programas de mejoramiento de plantas (Dueñas, 2003).

Mediante esta vía se incrementa el componente de variación que no existía en el pool de genes (PÉREZ, J.N.1998).

Se cambia uno o más caracteres existentes en un cultivo lo que permite mejorar su comportamiento (Escalant, 2002).

La variación somaclonal es superior al mejoramiento por mutaciones inducidas ya que en las plantas regeneradas que se derivan de células individuales, la ocurrencia de mosaicos es mínima (Montes, 1995).

Mayoritariamente es posible estabilizar los somaclones en una generación, mientras que mediante mutaciones se requieren varias generaciones y retrocruces (Montes, 1995).

El cultivo de tejidos brinda la posibilidad de generar nuevos cultivares a través de la variación somaclonal que es la variación entre los tejidos o plantas derivadas de células somáticas cultivadas in vitro, entre ellos callos y cultivos en suspensión. El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un determinado tejido (explante). Según Pérez (1998) en las células se presenta una proliferación continua, acelerada, y de apariencia desorganizada dando origen a una masa amorfa de tejidos. El término variación somaclonal fue adoptado por Larkin y

Scowcroft (1981) para describir la variación mostrada en plantas regeneradas a partir de cultivo de células o de tejidos, las que presentan cambios estables a través de sucesivas generaciones, indicando que se ha originado producto de una alteración del ADN y por tanto constituye una mutación. La variación somaclonal puede ser genética o puede ser el resultado de cambios epigenéticos inducidos por el cultivo (Larkin Y Scowcroft, 1981). Se había considerado que las técnicas de cultivo de tejido generaban copias exactas de la planta madre (Denton, 1997), sin embargo la variación ha sido identificada en un gran número de especies de plantas cuando no se realiza un adecuado manejo del material *in vitro* y ocurre en plantas que se propagan por vía sexual, asexual y a todos los niveles de ploidia (Al Zahim, 1996). Existen discrepancias acerca si la variación somaclonal es resultado de diferencias preexistente en las células somáticas o si es inducida por componentes específicos del medio. Factores como el genotipo de la planta, origen del explante, composición del medio de cultivo y la edad del cultivo *in vitro* afectan la variación somaclonal (Karp, 1995).

2.6 Taxonomía y Morfología

2.6.1 Taxonomía

Familia: solanáceas

Nombre Científico: *Solanum tuberosum*.

La papa pertenece a la familia de las solanáceas. Las especies cultivadas son las Tetraploides ($2n=48$) que pertenecen a las especies *Solanum tuberosum* y *Solanum andigenum*.

2.6.2 Tipo de Planta

Es herbácea anual. Sus raíces son muy ramificadas, finas y largas, dependiendo su desarrollo de que el suelo esté o no mullido.

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 foliolos, cuyo tamaño es tanto mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción.

2.6.3 El fruto

Es una baya redondeada de color verde, que se vuelve amarilla al madurar.

2.6.4 Semilla

Aunque 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”.

2.6.5 Raíz

En 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 posee 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 1.20m. De profundidad, en suelos francos y profundos.

2.6.6 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 T., 2005)

2.7 Descripción de las Variedades Estudiadas

Las variedades que se estudiaron pertenecientes a la familia de las solanáceas se describen cada una de ellas a continuación.

2.7.1 Descripción de la Variedad Imilla Negra

2.7.1.1 Características Agronómicas

Especie *Solanum tuberosum* Ssp *andigena*. Semi erecto ciclo vegetativo tardío 150 a 180 días. Alturas de crecimiento entre 3000 a 4000 msnm de los departamentos de La Paz, Potosí, Oruro, Chuquisaca y Cochabamba.

2.7.1.2 Características Morfológicas

El color de flor es azul morado con jaspes violetas, la forma del tubérculo redondo con ojos profundos, color de la piel es negro, color de la pulpa blanco.

2.7.1.3 Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos

- Susceptible al nematodo rosario (*Nacobus aberrans*)
- Susceptible a verruga (*Synchytrium endobioticum*)
- Tolerante al virus PLRV
- Ligera tolerancia a sequía y helada (PROINPA, 1994).

2.7.2 Descripción de la Variedad Waych´a

2.7.2.1 Características Agronómicas

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

2.7.2.2 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.

2.7.2.3 Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos

- Susceptible al nematodo rosario (*Nacobbus aberrans*)
- Ligera tolerancia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*)

(PROINPA, 1994)

3. LOCALIZACION

3.1 Ubicación Geográfica

El ensayo se llevó a cabo en las dependencias del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés a una altitud de 3630 m.s.n.m. 16°30'00'' latitud sur y 68°80'00'' longitud Oeste del Meridiano de Greenwich (Soliz, 2004).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material de Laboratorio

El material de laboratorio que se utilizó fue de acuerdo al trabajo que se realizó, prácticamente el equipo se detalla a continuación.

4.1.2 Sala de Preparación de Medios de Cultivo

- Refrigerador.
- Olla autoclave.
- Medidor de pH.
- Agitador Magnético.
- Microondas.
- Balanza de precisión.

4.1.3 Sala de Trasferencia

- Cámara de flujo laminar.
- Pinzas.
- Bisturí Nro. 3
- Mechero
- Plafilm
- Marcador indeleble.

4.1.4 Sala de Crecimiento

- Estantería metálica.
- Tubos fluorescentes.
- Termómetro de máxima y mínima.

4.1.5 Material de Vidrio

- Vasos de precipitación.
- Vasos de vidrio de 250 ml.
- Probeta graduada.
- Pipetas.
- Cajas petri.
- Vasos Erlenmeyer.
- Tubos de ensayo de 16x100

4.1.6 Material Aséptico

- Jabón desinfectante.
- Alcohol al 70%.
- Alcohol al 96%.
- Hipoclorito de sodio 3%.
- Agua destilada.

4.1.7 Material Vegetal

Se emplearon 25 vitroplantas de la variedad Waych´a y 25 vitroplantas de la variedad Imilla Negra. Obtenidas de meristemas introducidas a medio de cultivo, Con una altura promedio de 6.5 cm 7.5 cm.

4.1.8 Material de Gabinete

- Regla de 15 cm.
- Cuaderno de anotaciones.
- Cámara fotográfica.
- Programa SAS

4.2 Metodología

4.2.1 Obtención de Material

Para la obtención de meristemos de las variedades de Imilla Negra y Waych'a, se seleccionaron tubérculos obtenidos en campo que no presentaron ningún tipo enfermedad. Se almacenaron en cajas de cartón por el tiempo de un mes, no estuvieron expuestos a la luz; con el propósito de poder desarrollar brotes. Se estableció al cultivo aséptico en frascos por lo que se obtuvieron 25 vitroplantas de la variedad Waych'a y 25 vitroplantas de la variedad Imilla Negra, con una altura promedio de 6.5 y 7.5 cm.

En la preparación del medio de cultivo (Murashige y Skoog,1962), no se adiciono auxinas para la obtencion de vitroplantas de los meristemos y en los subcultivos de los explantes.

4.2.2 Procedimiento Experimental

Para el establecimiento el medio de cultivo de procedió de la siguiente manera:

- a) El material que se utilizó para el establecimiento se esterilizo con rayos UV durante 45 min.
- b) Se realizó la selección de los brotes y se lavaron con agua, esta operación se repitió dos veces.
- c) Posteriormente se lavaron los brotes con agua destilada.
- d) Para el establecimiento al medio de cultivo se realizó la desinfección con alcohol al 70% durante 30 seg.
- e) Se transfirió el material vegetal a la cámara de flujo laminar, donde se realizó el lavado con hipoclorito de Sodio al 3% durante 30 seg.
- f) Posteriormente se lavaron los brotes con agua destilada por tres veces por el tiempo de 3 min.

- g) Una vez que se obtuvieron los brotes desinfectados se realizaron los cortes de los meristemas con una altura de 0.6 mm y se trasladaron al medio de cultivo fresco en frascos con 35 ml de medio de cultivo. Se sellaron con plásfilm se etiquetaron y se transfirieron a la cámara de crecimiento. Donde estuvieron dos semanas y alcanzaron una altura de 6 a 7 cm.

Se procedió para iniciar los subcultivos de los tipos de explante apicales, medios y basales en condiciones asépticas. Para ello, una vez trasladado todo el material necesario a la cámara de flujo laminar se procedió:

- a). Esterilizar pinzas y bisturí (este proceso se repetirá frecuentemente para evitar la contaminación cruzada de los explantes)

- b). Extraer una plántula ya desarrollada y depositarla sobre una caja petri.

- c). Descartar las raíces y trocear la planta en 1 a 2 cm aproximadamente de manera que el tallo por encima de la yema axilar sea notablemente más corto que el tallo por debajo de esta.

- d). Introducir secciones en cada tubo de ensayo con medio de cultivo.

- e). Rotular adecuadamente cada tubo de ensayo.

- f). Llevar los tubos de ensayo a la cámara de cultivo adecuado

- g). Transcurrido el tiempo de duración previsto para cada subcultivo en el experimento, se procedió a la toma de datos. Es conveniente registrar porcentaje de contaminación, altura de los explantes, aspecto general de la planta, presencia de ramificaciones y cualquier otro valor que se considere importante.

Cada microestaca se cultivó en un tubo de ensayo de 16×100 mm, el cual contenía 4 ml de medio de cultivo semisólido. Se realizaron subcultivos a medio de cultivo fresco de acuerdo al tiempo de crecimiento de cada vitroplanta. Las evaluaciones de las diferentes variables se realizaron semanalmente durante todo el período del experimento.

Las vitroplantas subcultivadas presentaban buen crecimiento y ningún síntoma aparente de deficiencia nutricional. Este procedimiento se repitió para cada subcultivo. De las dos variedades de papa (*Solanum tuberosum Ssp andigena.*), se utilizaron de cada vitroplanta tres tipos de explantes, apical, medio y basal.

4.2.3 Observación y Toma de Datos

La toma de datos en los diferentes periodos de crecimiento se fue realizando de manera periódica en los diferentes subcultivos. La observación y toma de datos fue directa en la que se tomó datos de las siguientes variables de respuesta.

4.2.3.1 Altura de Planta

Para determinar la medición se utilizó una regla metálica de 15 cm, se tomó la medida desde el cuello hasta la punta de la vitroplanta, se tomó este dato cada inicio de subcultivo, y de cada tipo de explante, apical, medio y basal.

4.2.3.2 Tiempo de Regeneración

El tiempo de regeneración se registró de acuerdo a los días que paso para tener una altura considerable o cuando era necesario la multiplicación. El criterio de multiplicación fue que las vitroplantas llegaran a una altura considerable, tuvieran un desarrollo en grosor del tallo y diferenciación de los tipos de explante a utilizar.

4.2.3.3 Presencia de Cambios Morfológicos

Para el registro de los cambios morfológicos que presenta cada vitroplantas en los diferentes tipos de explante se registró en cada subcultivo. Los cambios morfológicos que se registraron fue:

- Pigmentación de tallo
- Formación de callo
- Crecimiento desorganizado

- Tamaño

4.2.3.4 Temperatura

Se tomó el dato de la temperatura con un termómetro registrando las temperaturas máximas y mínimas de la cámara de crecimiento. Para la producción de vitroplantas, se realizó controles de temperatura y la iluminación, en lo que se tuvo 23° C, 16 h de fotoperiodo y 34 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ de flujo fotónico.

4.2.3.5 Porcentaje de Contaminación

Para determinar esta variable se realizó la observación de cada unidad experimental, se contó las unidades que presentaban algún tipo de contaminación y de esta forma se determinó el porcentaje de contaminación, este dato se registró cada siete días.

4.3 Diseño Experimental

Para analizar el experimento se utilizó el modelo estadístico Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial (Ochoa, 2007), cuyo Modelo Lineal Aditivo es el siguiente:

4.3.1 Modelo Lineal Aditivo:

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

DONDE:

X_{ij} = Observación cualquiera

μ = Media general

α_i = Efecto i-ésimo nivel del factor medio de cultivo

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor variedad de papa

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción del i –ésimo nivel del factor medio de cultivo con el j-ésimo nivel del factor.

ϵ_{ijk} = Error Experimental

4.3.2 Factores

Los factores de estudio se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Factores en el estudio de subcultivo	
FACTOR A	FACTOR B
VARIEDADES	TIPOS DE EXPLANTE
a1 Imilla Negra	b1 apical
	b2 medio
b1 Waych'a	b3 basal

4.3.3 Combinación Factorial

En base a los factores establecidos, los tratamientos se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos en el estudio de subcultivos de dos variedades de papa.

Tratamiento	Combinación	Descripción
T1	a1b1	Variedad Imilla Negra y Explante Apical
T2	a1b2	Variedad Imilla Negra y Explante Medio
T3	a1b3	Variedad Imilla Negra y Explante Basal
T4	a2b1	Variedad Waych' a y Explante Apical
T5	a2b2	Variedad Waych'a y Explante Medio
T6	a2b3	Variedad Waych'a y Explante basal

ANALISIS DE VARIANZA (ANVA)

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
A	a - 1	SCA	SCA/ (a - 1)	CMA / CME	Tablas
B	b- 1	SCB	SCB/ (b- 1)	CMB / CME	Tablas
A*B	(a - 1) (b- 1)	SCAB	SCAB/(a - 1) (b- 1)	CMAB/ CME	Tablas
ERROR	a*b (r -1)	SCE	SCE/ a*b (r -1)		
TOTAL	a*b r -1	SCT			

4.3.4 Variables de Respuesta

En base a las características del presente estudio se plantearon las siguientes variables de respuesta.

Variable	Descripción	Modo de Medición de la Variable
Altura de Planta	Se midió con una regla en cm al finalizar el subcultivo que varía de acuerdo al tipo de explante.	Calculo de porcentajes, prueba de promedios. ANVA
Tiempo de regeneración	Se midió el tiempo en días que tardo cada subcultivo en regenerar cada subcultivo.	Calculo de porcentajes. ANVA, Prueba de promedios
Presencia de cambios morfológicos	Se observó la presencia de callos, decoloración de vitroplantas. En toda la etapa de multiplicación.	Por observación directa y toma de fotografías.
Temperatura	La temperatura en °C que influye en la regeneración de cada subcultivo	Se midió con un termómetro instalado en la cámara de crecimiento.
Contaminación	Se observó la presencia de virus y hongos en porcentajes.	La contaminación se midió con observación directa de los explantes

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El trabajo de subcultivos realizado con las variedades de papa Waych'a e Imilla Negra y los diferentes tipos de explante apical, medio y basal y después de haber concluido con la toma de datos del trabajo de investigación y con el análisis de los mismos se realizó la evaluación del comportamiento de las dos variedades.

5.1 Establecimiento

Obtenidas las vitroplantas se procedió a la multiplicación en medio de cultivo sólido. De las 25 vitroplantas cultivadas de cada variedad se obtuvieron explantes apical, medios y basales. En los subcultivos siguientes se consideró un control en la asepsia ya que en la etapa de multiplicación se llega a contaminar el material vegetal.

Después de realizada la toma de datos del trabajo de investigación, se realizó el análisis de los mismos, el comportamiento de los subcultivos de los explantes apical, medio y basal de las dos variedades de papa. La aparición de variaciones comenzó después del quinto subcultivo de la variedad Waych'a y en la cuarta en la variedad Imilla Negra.

5.2 Altura de Planta

5.2.1 Análisis de varianza para el primer subcultivo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 3 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 7.77% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos. Del primer subcultivo entre las dos variedades de estudio se realizó un manejo adecuado.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la altura de planta en el primer subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	0,84	0,84	4,94*	4,003	7,171
Explantes(B)	2	27,63	13,81	81,23**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	27,71	13,85	81,47**	3,183	5,057
Error	54	9,52	0,17			
TOTAL	59	65,69				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 7,77 %

Para el factor A en el primer subcultivo se encontró significancia, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, en el Cuadro 4 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existe diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 4. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Waych´a	5,52	A
Imilla Negra	5,28	B

Para el factor B se encontró alta significancia, por lo que se efectuó la prueba de comparación de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el cuadro 5, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante apical (b1), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante medio (b2); por otra parte estos valores son significativamente superiores al explante basal (b3).

Para el presente trabajo en el primer subcultivo lo que se busca es la selección del explante apropiado para la multiplicación. Por lo que en base a los resultados se afirma que el explante apropiado para la multiplicación

Cuadro 5. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Apical	6,11	A
Medio	5,60	B
Basal	4,48	C

En vista de que existe significancia para el primer subcultivo entre tratamientos se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	4,80	4,80	27,24*	4,003
A(b2) medio	1	9,80	9,80	55,59*	4,003
A(b3) basal	1	41,76	41,76	236,88*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	13,52	6,76	38,34*	3,183
B(a2) Waych`a	2	52,71	26,36	149,51*	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en la Altura de Planta dentro de los niveles b1 (explante apical), b2 (explante medio) y b3 (explante basal) entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 1).

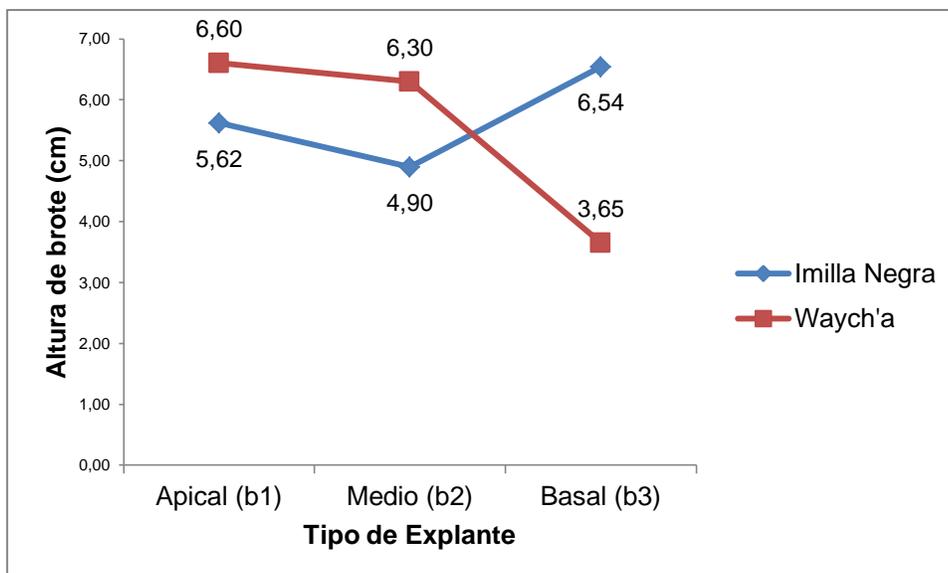


Figura 1. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el primer subcultivo

La figura 1 muestra que para los explantes apicales y medios, la altura de planta en cm es menor para la variedad Imilla Negra, para el explante basal se invierte la relación y la menor altura de planta se da en la variedad Waych'a. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales y medios de la variedad Waych'a presentan mejores características de crecimiento para la multiplicación. Sin embargo el explante basal de la variedad Imilla Negra presenta un mayor crecimiento a diferencia de la variedad Waych'a

5.2.2 Análisis de varianza para el segundo subcultivo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 7 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 10.88% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos. Del segundo subcultivo entre las dos variedades de estudio se realizó un manejo adecuado.

Cuadro 7. Análisis de varianza para altura de planta en el segundo subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	0,01	0,01	0,04 NS	4,003	7,171
Explantes(B)	2	42,71	21,36	82,15**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	35,69	17,85	68,65**	3,183	5,057
Error	54	13,89	0,26			
TOTAL	59					

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 10,88 %

Para el factor A en el segundo subcultivo no se encontró significancia, por lo que se puede afirmar que no existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, en el Cuadro 8 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que no existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 8. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Imilla Negra	4,68	a
Waych´a	4,65	a

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 9, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante medio (b2), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante apical (b1); por otra parte estos valores son significativamente superiores al explante basal (b3). Para el presente trabajo en el segundo subcultivo lo que se busca es la selección del explante apropiado para la multiplicación.

Cuadro 9. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Explantes	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Medio	5,58	a
Apical	4,87	b
Basal	3,54	c

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el segundo subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el Cuadro 10.

Cuadro 10. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	1,248	1,25	7,08*	4,003
A(b2) medio	1	21,015	21,02	119,20*	4,003
A(b3) basal	1	42,63	42,63	241,81*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	5,945	2,97	16,86*	3,183
B(a2) Waych`a	2	75,288	37,64	213,53*	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en el porcentaje de Altura de Planta dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y b3 (explante basal) entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 2).

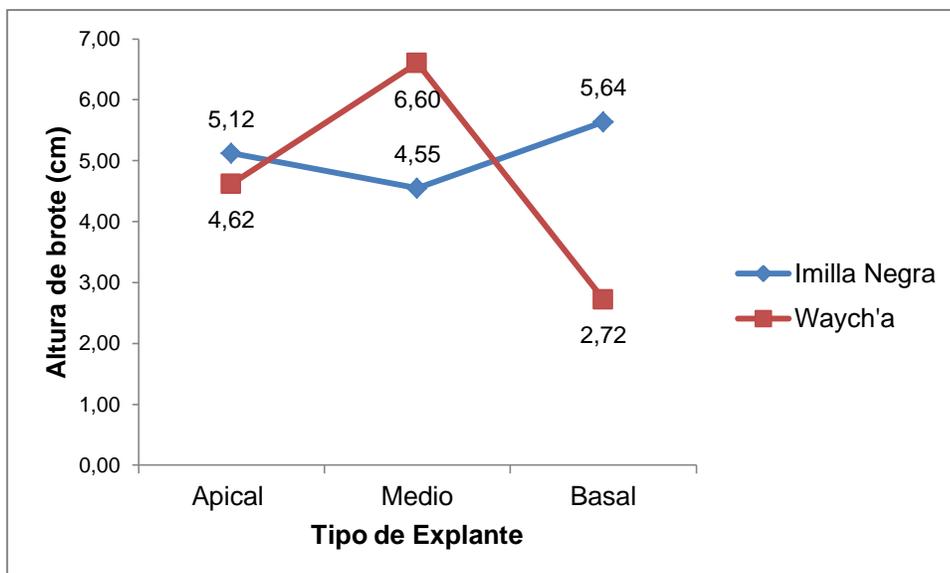


Figura 2. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el segundo subcultivo.

La figura 2 muestra que para el explante apical la altura de planta es mayor para la variedad Imilla Negra, para el explante medio se invierte la relación y la menor altura de planta se da a la variedad Imilla Negra, el explante basal de la variedad Imilla Negra presenta mayor crecimiento. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales y basales de la variedad Imilla Negra presentan mejores características para la multiplicación. El explante medio de la variedad Waych'a presenta características para la multiplicación.

5.2.3 Análisis de varianza para el tercer subcultivo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 11 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 11.06% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos.

Cuadro 11. Análisis de varianza para altura de planta en el tercer subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	32,71	32,71	192,41**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	71,81	35,91	211,23**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	16,78	8,39	49,35**	3,183	5,057
Error	54	9,43	0,17			
TOTAL	59	130,72				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 11,06%

Para el factor A en el tercer subcultivo se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych'a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 12 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 12. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedades	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Waych'a	4,52	a
Imilla Negra	3,04	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 13, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante apical (b1), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante medio (b2); por otra parte estos valores son significativamente superiores al explante basal (b3). Para el presente trabajo en el tercer subcultivo lo que se busca es la selección del explante apropiado para la multiplicación.

Cuadro 13. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Apical	4,94	a
Medio	4,07	b
Basal	2,31	c

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el tercer subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el Cuadro 14.

Cuadro 14. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en el porcentaje de altura de planta.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	6,38	6,38	36,22*	4,003
A(b2) medio	1	42,34	42,34	240,18*	4,003
A(b3) basal	1	2,67	2,67	15,13*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	15,94	7,97	45,22*	3,183
B(a2) Waych`a	2	60,40	30,20	171,31*	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en la Altura de Planta dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y b3 (explante basal) entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 3).

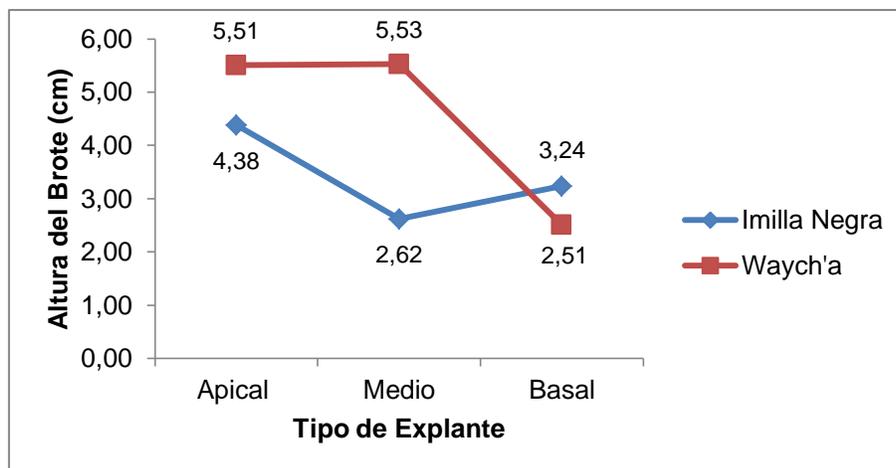


Figura 3. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el tercer subcultivo.

La figura 3 muestra que para los explantes apicales y medios, la altura de planta es menor para la variedad Imilla Negra, para el explante basal se invierte la relación y el menor porcentaje en altura de planta se da a la variedad Waych'a. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales y medios de la variedad Waych'a presentan mejores características de crecimiento para la multiplicación.

5.2.4 Análisis de varianza para el cuarto subcultivo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 15 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 13.18% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos.

Cuadro 15. Análisis de varianza para altura de planta en el cuarto subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	79,35	79,35	721,36**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	28,06	14,03	127,54**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	18,03	9,02	82,00**	3,183	5,057
Error	54	6,11	0,11			
TOTAL	59	131,55				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 13,18%

Para el factor A en el cuarto subcultivo se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 16 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 16. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Waych´a	3,70	a
Imilla Negra	1,40	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 17, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante apical (b1), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante medio (b2); y del explante basal (b3).

Para el presente trabajo en el cuarto subcultivo lo que se busca es la selección del explante apropiado para la multiplicación.

Cuadro 17. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Apical	3,28	a
Medio	2,75	b
Basal	1,64	c

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el cuarto subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el Cuadro 18.

Cuadro 18. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	37,82	37,82	214,50*	4,003
A(b2) medio	1	56,45	56,45	320,19*	4,003
A(b3) basal	1	0,01	0,01	0,07 NS	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	5,80	2,90	16,46*	3,183
B(a2) Waych`a	2	42,24	21,12	119,81*	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en Altura de Planta dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y no presenta significancia dentro del nivel b3, entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 4).

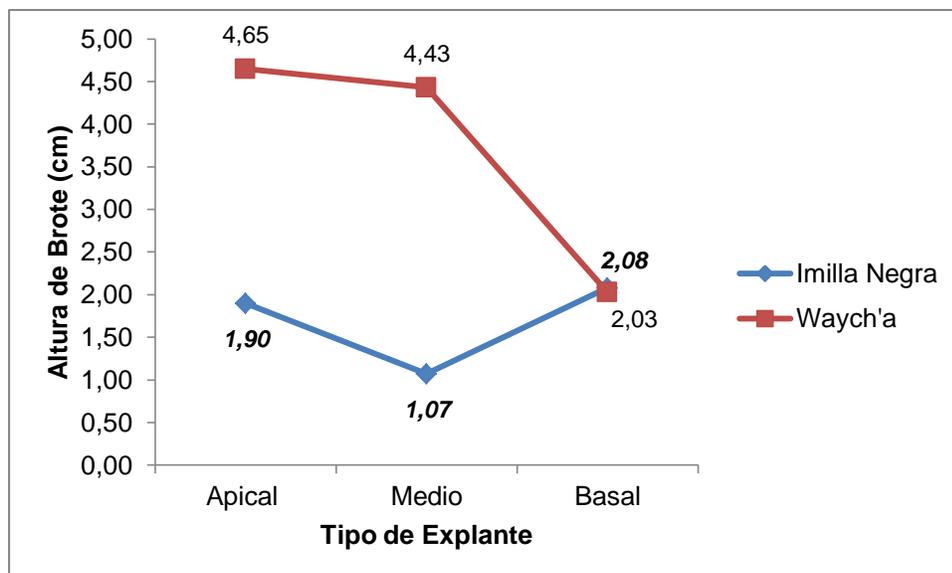


Figura 4. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para cuarto subcultivo

La figura 4 muestra que para los explantes apicales y medio el porcentaje de altura de planta es menor para la variedad Imilla Negra, para el explante basal se acerca a la relación y el menor porcentaje en altura de planta se da a la variedad Waych'a. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales y medios de la variedad Waych'a. son adecuados para la multiplicación en el cuarto subcultivo.

5.2.5 Análisis de varianza para el quinto subcultivo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 19 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 30.43%.

Cuadro 19. Análisis de varianza para altura de planta en el quinto subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	1,77	1,77	19,67**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	2,50	1,25	13,89**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	3,02	1,51	16,78**	3,183	5,057
Error	54	4,92	0,09			
TOTAL	59	12,21				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 30,43 %

Para el factor A en el cuarto subcultivo se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 20 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 20. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad

Variedad	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Imilla Negra	1,16	a
Waych´a	0,82	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 21, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante apical (b1), sin embargo este valor no es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante medio (b2); pero es inferior al porcentaje del explante basal (b3).

Cuadro 21. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (cm)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Apical	1,16	a
Medio	1,11	a
Basal	0,71	b

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el quinto subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el Cuadro 22.

Cuadro 22. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en altura de planta.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	1,99	1,99	11,28*	4,003
A(b2) medio	1	2,38	2,38	13,51*	4,003
A(b3) basal	1	0,06	0,06	0,35 NS	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	5,80	3,52	19,94*	3,183
B(a2) Waych`a	2	42,24	0,06	0,32 NS	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en Altura de Planta dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y no presenta significancia en el nivel b3 (explante basal) entre la variedad Waych`a e Imilla Negra. Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple”. (Figura 5).

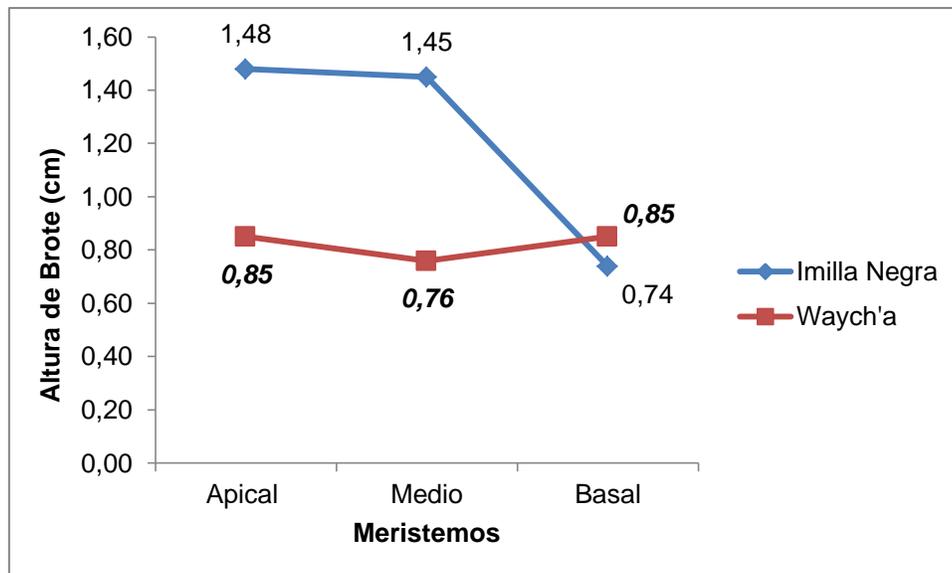


Figura 5. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para el quinto subcultivo

La figura 5 muestra que para los explantes apicales y medio la altura de planta es menor para la variedad Waych'a, para el explante basal se invierte la relación y el menor porcentaje en altura de planta se da a la variedad Imilla Negra. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales y basales de la variedad Imilla Negra son adecuados para la multiplicación en el quinto subcultivo.

En la multiplicación de los explantes de papa se verifica que la que tuvo mayor crecimiento fue la variedad Waych'a quedando como explante apical y el explante medio apropiado para la multiplicación hasta un cuarto subcultivo, quedando el explante basal como explante no considerado para la multiplicación por no presentar un crecimiento considerado para la multiplicación.

Para Moya, (2001) 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.

Darias (1993). En la yema apical se encuentra un grupo de células que conforman el explante apical (con un tamaño entre 0.01 y 0.3 mm). Es un tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta y regenerar plantas completas. El cultivo de explantes tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no está afectada por estos patógenos vegetales

Para la variedad Imilla Negra el explante apical es considerado para la multiplicación hasta en tercer subcultivo y el explante medio es considerado para la multiplicación hasta el tercer subcultivo. El explante basal de la variedad Imilla Negra se puede considerar para la multiplicación hasta un tercer subcultivo ya que en los subcultivos cuarto y quinto no tuvo un crecimiento aceptable.

5.3 Días de Recuperación

5.3.1 Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 1)

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 23 el coeficiente de variación alcanzo un valor de 10.09% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos, ya que se realizó un manejo adecuado de las unidades experimental.

Cuadro 23. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el primer subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _t	
					5%	1%
Variedad(A)	1	1717,74	1717,74	191,22**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	17,18	8,59	0,96 NS	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	17,48	8,74	0,97 NS	3,183	5,057
Error	54	476,10	8,98			
TOTAL	59	2228,50				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 10,09%

En la variable días de recuperación, para el Factor A se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 24 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 24. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedades.

Variedad	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Imilla Negra	35,00	a
Waych´a	24,21	b

5.3.2 Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 2)

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 25 el coeficiente de variación alcanzo un valor de 0.76% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos, ya que se realizó un manejo adecuado de las unidades experimental.

Cuadro 25. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el segundo subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	370,02	370,02	3083,05**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	14,23	7,12	59,33**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	15,63	7,82	65,17**	3,183	5,057
Error	54	6,30	0,12			
TOTAL	59	406,18				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 0,76%

Para el factor A en el segundo subcultivo en los días de recuperación se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 26 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 26. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Imilla Negra	47,70	a
Waych´a	42,73	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 27, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante basal (b3), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante apical (b1); y del explante medio (b2). Por lo que se puede afirmar que los explantes apicales y medio son estadísticamente iguales.

Cuadro 27. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Basal	45,90	a
Apical	44,95	b
Medio	44,80	b

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el segundo subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el cuadro 28.

Cuadro 28. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en días de recuperación.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	84,05	84,05	476,75*	4,003
A(b2) medio	1	96,80	96,80	549,08*	4,003
A(b3) basal	1	1125,00	1125,00	6381,30*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	763,27	381,63	2164,74*	3,183
B(a2) Waych`a	2	0,47	0,24	1,33 NS	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en Días de Recuperación dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y nivel b3 (basal), entre la variedad Waych`a e Imilla Negra.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 6).

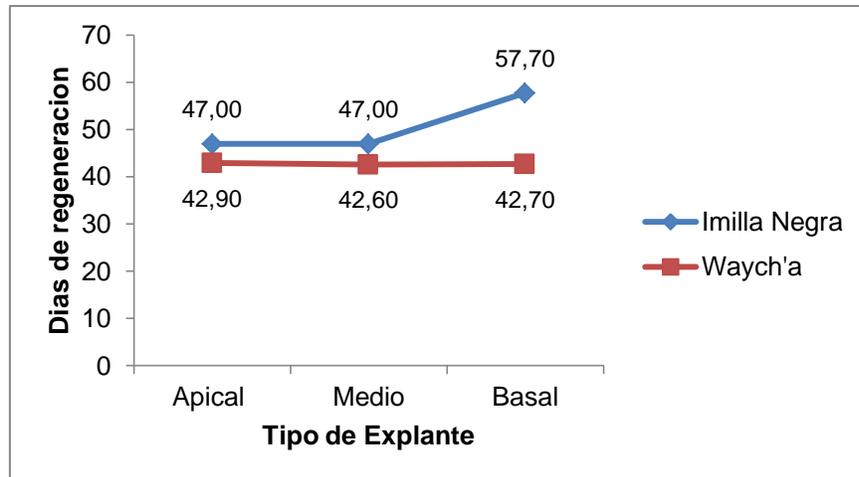


Figura 6. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para los días de recuperación del segundo subcultivo

La figura 6 muestra que para los explantes apicales, medio y basal los días de recuperación es mayor para la variedad Imilla Negra. En base a esto se puede afirmar que los explantes apical, medio y basal se da a la variedad Waych'a. son adecuados para la multiplicación en el segundo subcultivo.

5.3.3 Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 3)

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 29 el coeficiente de variación alcanzo un valor de 0 % por presentar un resultado no significativo no se realiza la prueba de Duncan.

Cuadro 29. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el tercer subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	15	15	99999,99**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	0	0	0 NS	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	0	0	0 NS	3,183	5,057
Error	54	0	0			
TOTAL	59	15				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 0 %

5.3.4 Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 4)

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 30 el coeficiente de variación alcanzo un valor de 1.60% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos, ya que se realizó un manejo adecuado de las unidades experimentales

Cuadro 30. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el cuarto subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	821,40	821,40	1676,33**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	6,40	3,20	6,54**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	6,40	3,20	6,54**	3,183	5,057
Error	54	26,40	0,49			
TOTAL	59	860,60				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 1,60 %

Para el factor A en el cuarto subcultivo en los días de recuperación se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 31 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 31. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Waych´a	47,40	a
Imilla Negra	40,00	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 32, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante basal (b3), sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante apical (b1); y del explante medio (b2). Se puede observar que el explante medio (b2) no es estadísticamente superior al explante (b1).

Cuadro 32. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Basal	44,10	a
Medio	43,70	ab
Apical	43,30	b

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el cuarto subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el cuadro 33.

Cuadro 33. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B en días de recuperación.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	273,80	273,80	1553,07*	4,003
A(b2) medio	1	217,80	217,80	1235,42*	4,003
A(b3) basal	1	7,20	7,20	40,84*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	592,27	296,14	1679,76*	3,183
B(a2) Waych`a	2	9,60	4,80	27,23*	3,183
ERROR	54	9,52	0,18		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en Días de Recuperación dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y nivel b3 (basal), entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple” gráficamente. (Figura 7).

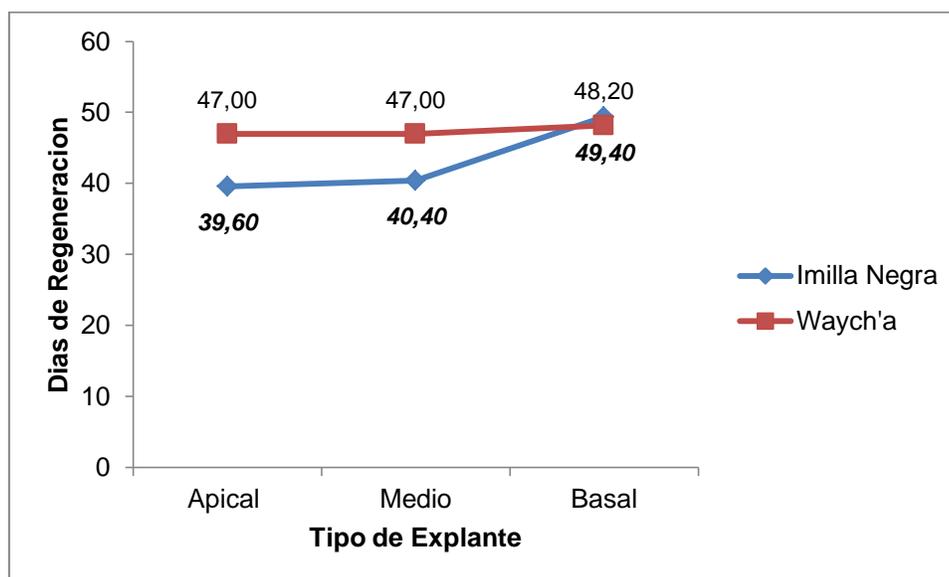


Figura 7. Efecto de los Tratamientos en la Altura de Planta para los días de recuperación del cuarto subcultivo.

La figura 7 muestra que para los explantes apicales y medio, la altura de planta es menor para la variedad Imilla Negra, para el explante basal se invierte la relación y el menor porcentaje en altura de planta se da a la variedad Waych`a.

5.3.5 Análisis de varianza para Días de Recuperación (DR 5)

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 34 el coeficiente de variación alcanzo un valor de 1.19% lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos, ya que se realizó un manejo adecuado de las unidades experimentales.

Cuadro 34. Análisis de varianza para Días de Recuperación en el quinto subcultivo.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma De Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft	
					5%	1%
Variedad(A)	1	13440,07	13440,07	32780,66**	4,003	7,171
Explantes(B)	2	4,93	2,47	6,03**	3,183	5,057
Interacción (AxB)	2	4,93	2,47	6,03**	3,183	5,057
Error	54	22,00	0,41			
TOTAL	59	13471,93				

*= Significativo al nivel 0,05

**= Altamente significativo al nivel 0,01

NS= No Significativo

CV = 1,19 %

Para el factor A en el quinto subcultivo en los días de recuperación se encontró diferencia altamente significativa, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre las variedades Waych´a e Imilla Negra, sin embargo en el Cuadro 35 en la prueba de Duncan (5% de Significancia) se observa que existen diferencias numéricas entre las variedades.

Cuadro 35. Prueba de Duncan para el Factor A: Variedad.

Variedad	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Waych´a	68,33	a
Imilla Negra	38,40	b

Para el factor B se encontró significancia, por lo que se efectuó la prueba de medias de Duncan (5% de Significancia); el resultado se observa en el Cuadro 36, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante medio (b2), sin embargo este valor no es estadísticamente superior al porcentaje de crecimiento del explante apical (b1); y del explante basal (b3).

Cuadro 36. Prueba de Duncan para el Factor B: Explantes.

Tipo de Explante	Promedio (Días)	Duncan ($\alpha= 5\%$)
Medio	53,70	a
Apical	53,40	ab
Basal	53,00	b

En vista de que existe significancia entre tratamientos en el quinto subcultivo se realizó el análisis de efecto simple para la interacción (Variedad x Tipo de explantes) que se observa en el Cuadro 37.

Cuadro 37. “Análisis de efecto simple” sobre el efecto de factor A y B para días de recuperación.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (5 %)
A(b1) apical	1	4263,20	4263,20	34514,66*	4,003
A(b2) medio	1	4681,80	4681,80	37903,63*	4,003
A(b3) basal	1	1280,00	1280,00	10362,82*	4,003
B(a1) Imilla Negra	2	592,27	296,14	2397,49*	3,183
B(a2) Waych`a	2	1197,87	598,94	4848,95*	3,183
ERROR	54	6,67	0,12		
TOTAL	59				

El cuadro de efecto simple indica que existe diferencias significativas en el porcentaje de Días de Recuperación dentro de los nivel b1 (explante apical), b2 (explante medio) y nivel b3 (basal), entre la variedad Waych`a e Imilla Negra, para la variable de estudio.

Para una mejor interpretación, se efectuó la “Comparación de Efecto Simple”. (Figura 8).

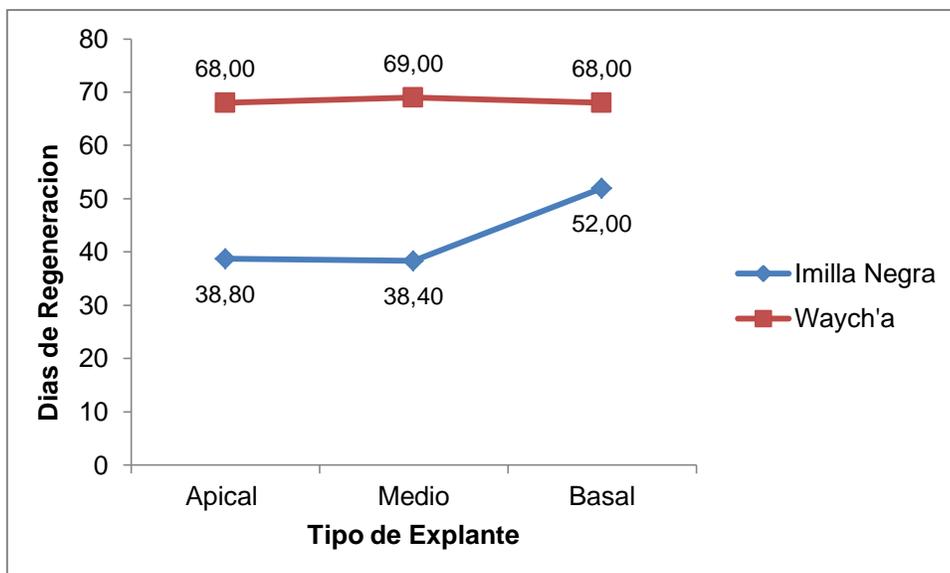


Figura 8. Efecto de los Tratamientos en Altura de Planta para los días de recuperación del quinto subcultivo.

La figura 8 muestra que para los explantes apicales, medio y basal los días de regeneración es menor para la variedad Imilla Negra, para la variedad Waych'a, los días de regeneración es mayor.

En la producción de vitroplantas para la multiplicación y la producción en invernadero es conveniente que se pueda producir con el menor tiempo posible en el presente estudio se observó que la variedad Waych'a presenta características para la multiplicación hasta el segundo subcultivo en los explantes apical y explante medio. La variedad Imilla Negra por el tiempo de regeneración es considerada para su multiplicación hasta el segundo subcultivo en los explantes apical y explante medio.

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

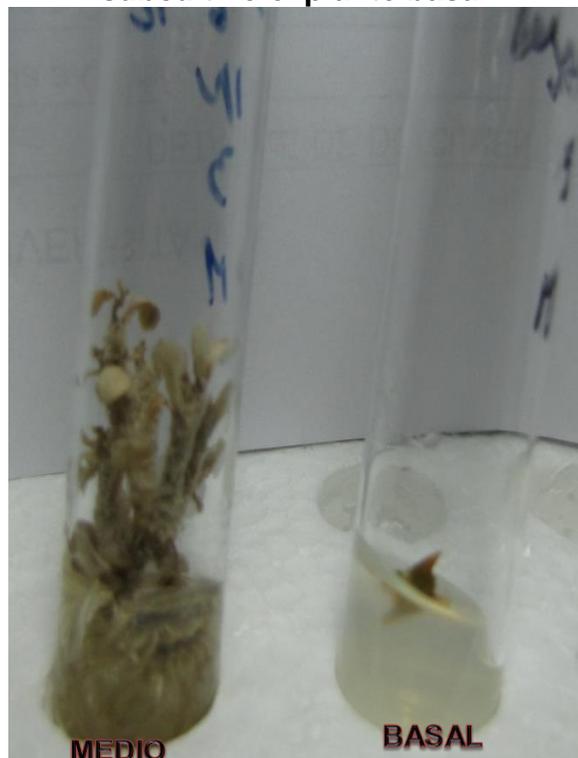
explante, que es la que se desea micropropagar. El número inicial de planta *in vitro* a subcultivar depende de un programa previo de multiplicación masiva, en el cual se establece la cantidad de plantas *in vitro* a producir, dependiendo de los propósitos a alcanzar, ya sean de producción o de investigación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

5.4 Presencia de Cambios Morfológicos

Los cambios morfológicos que presentaron en los diferentes subcultivos fueron visibles a partir del cuarto subcultivo en la variedad Imilla Negra en los explantes medios y basales. La variedad Waych'a los cambios morfológicos se presentaron en el quinto subcultivo en los explantes medio y basal

La variedad imilla negra presento cambios morfológicos en el cuarto subcultivo en los explantes apicales y basales, presenta decoloración, presencia de callo y en explante basal ausencia de altura. (Foto 1).

Foto 1. Variedad Imilla negra cuarto subcultivo explante medio. Quinto subcultivo explante basal.



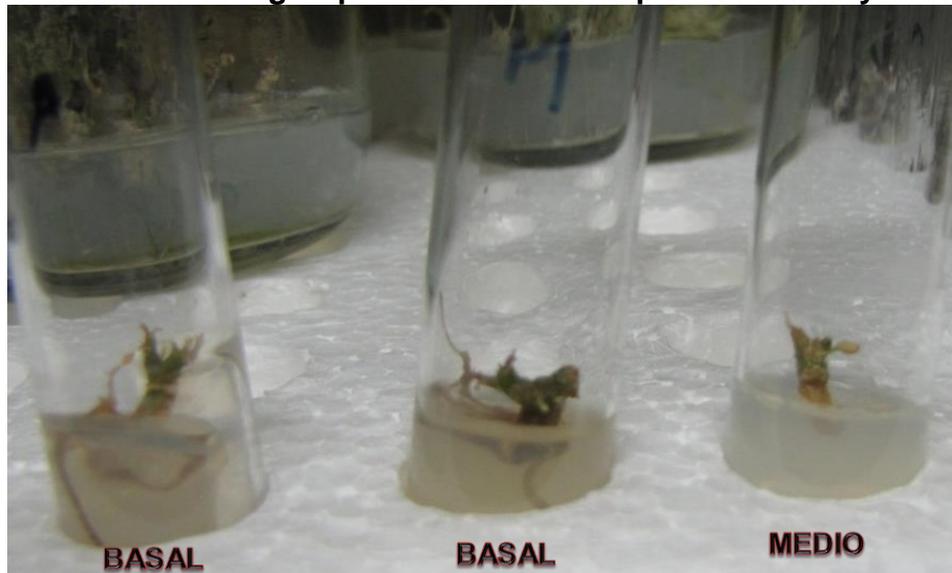
Cuarto subcultivo, explante basal variedad Imilla Negra (Foto 1) presento decoloración de la vitroplanta, crecimiento desorganizado y una menor altura.

Foto 2. Variedad Imilla Negra cuarto subcultivo explante apical.



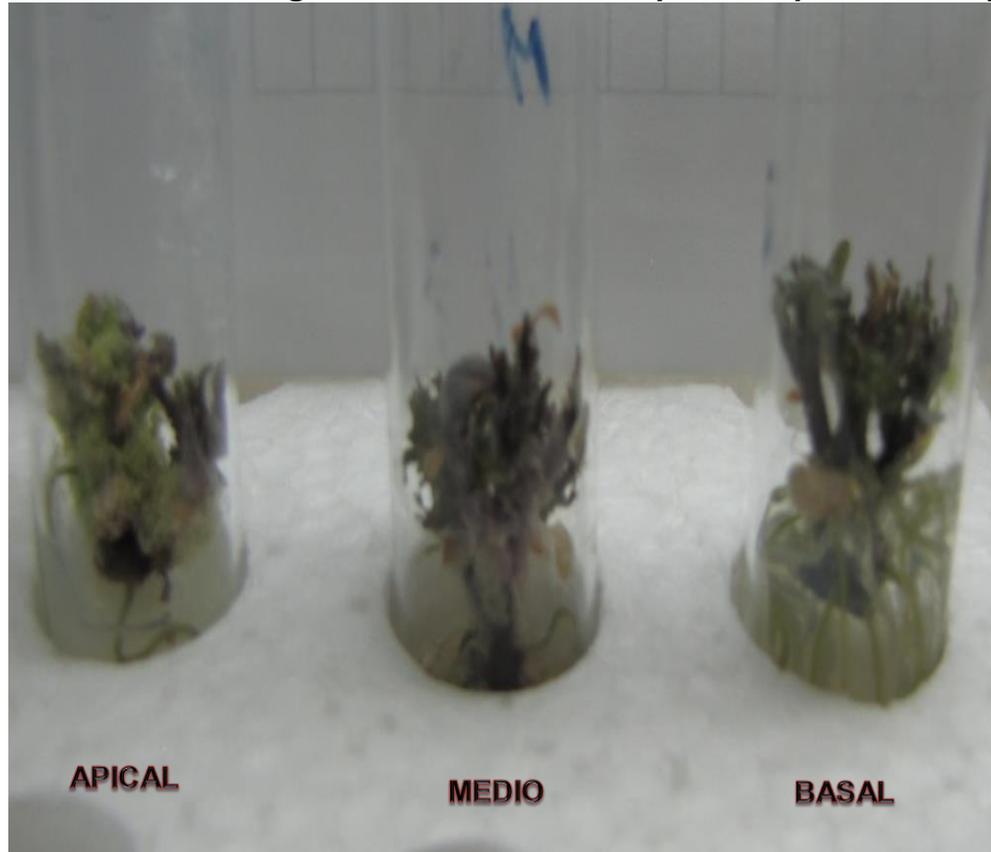
En la Foto 3 a partir del quinto subcultivo de la variedad Imilla Negra el crecimiento tuvo una caída significativa y no se observó desarrollo de la vitroplanta.

Foto 3. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes medio y basal.



En la Foto 3 se observa la formación de callo, un crecimiento desorganizado, decoloración y no presenta crecimiento, los explantes apical, medio y basal. En la Foto 4 no llega a una altura considerable para realizar multiplicaciones de los explantes, presenta decoloración y formación de callo. Según Pérez (1998) en las células se presenta una proliferación continua, acelerada, y de apariencia desorganizada dando origen a una masa amorfa de tejidos.

Foto 4. Variedad Imilla Negra cuarto subcultivo explantes apical, medio y basal.



En el quinto sub cultivo (Foto 5, foto 6) la variedad imilla negra desarrollo formación de callo, decoloración de las vitroplantas en los explantes apical, medios y basales. Se observó un déficit de crecimiento no se observó que formaron hojas ni raíces. Por lo que se puede afirmar que la variación somaclonal es genético.

Foto 5. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes medio y basal

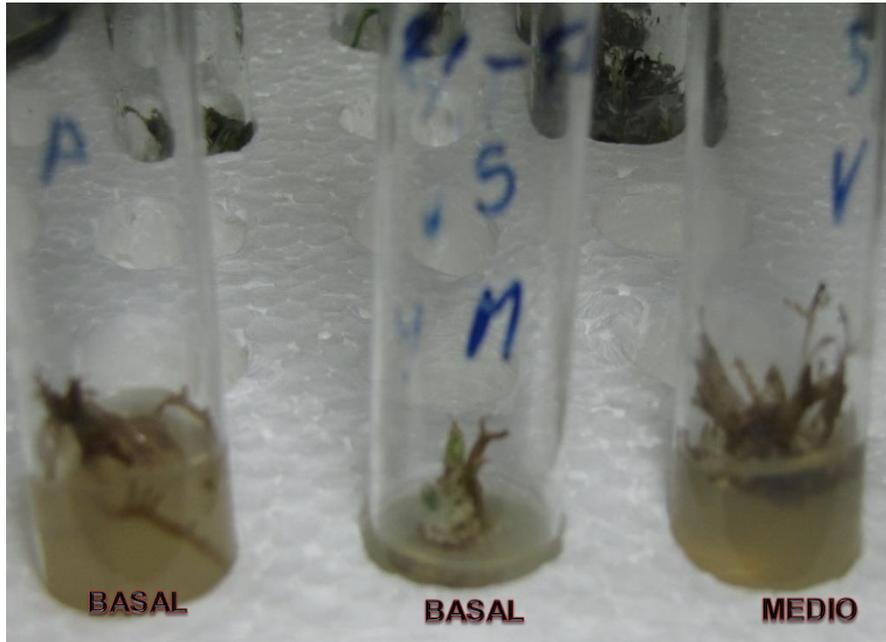


Foto 6. Variedad Imilla Negra quinto subcultivo explantes apical, medio y basal

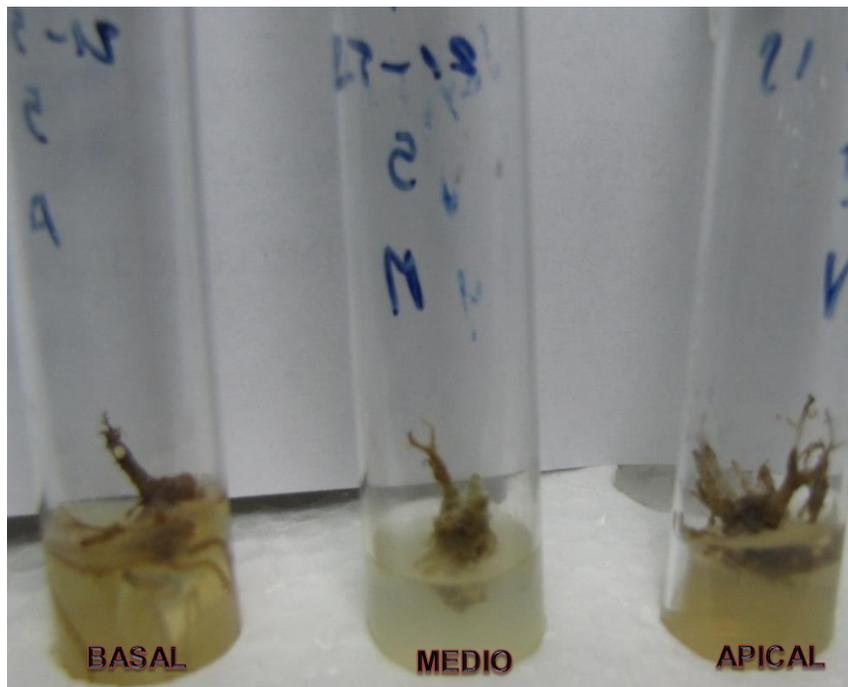


Foto 7. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante apical.



La variedad Waych´a (Foto 7, Foto 8, Foto 9) presento cambios morfológicos a partir del quinto subcultivo, Se observó un crecimiento desorganizado, formación de callo, no presento un crecimiento adecuado.

Foto 8. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante apical.



Foto 9. Variedad Waych´a quinto subcultivo explante medio.



Se observó que la variedad Waych´a en el quinto subcultivo no presento decoloración de las vitroplantas como la variedad Imilla Negra. Se podría realizar un sexto subcultivo pero se tendría el mismo resultado que la variedad Imilla Negra.

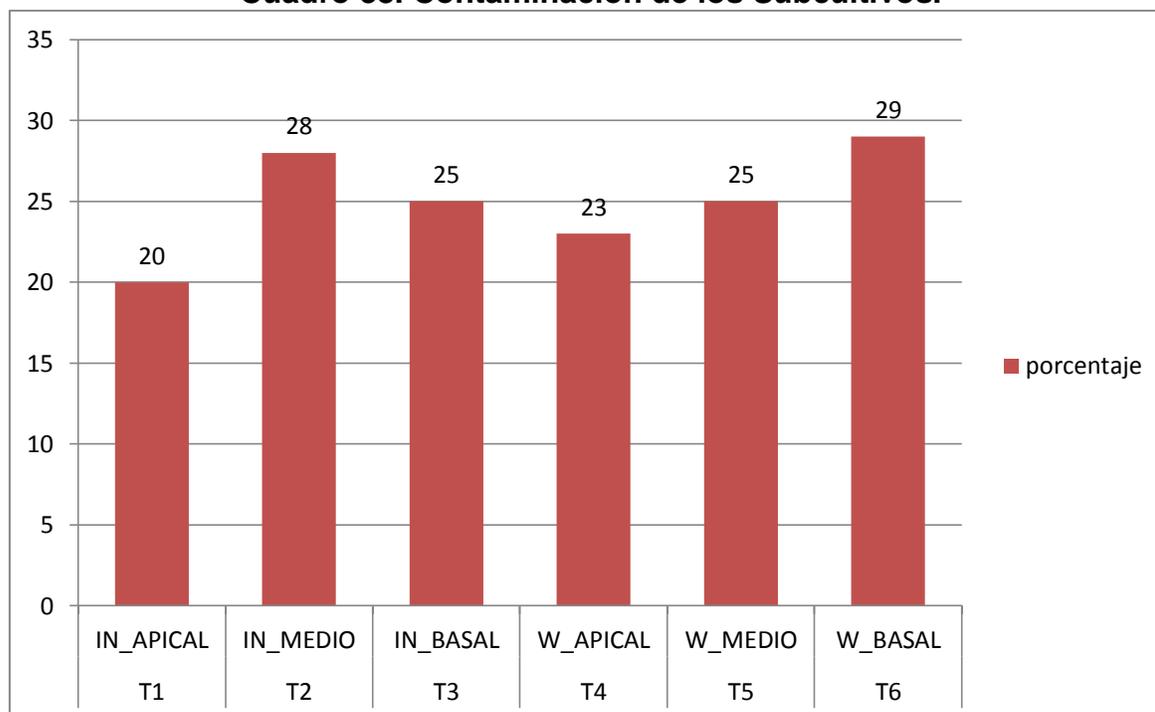
5.5 Temperatura

La temperatura que se tuvo en la cámara de crecimiento fue de 28° C y una humedad relativa de 55% con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

5.6 Porcentaje de Contaminación

La contaminación se registró de manera general en los subcultivos establecidos, el manejo que se tubo para cada subcultivo fue hecha con todas las medidas de seguridad para evitar la contaminación de las vitroplantas. Se detalla a continuación en el Cuadro 38.

Cuadro 38. Contaminación de los Subcultivos.



5.7 Análisis de Costos Parciales de Producción

El presente análisis de costos de producción se realizó en Bs. Se consideró el costo por vitroplanta y aumentando un 30% por cada subcultivo.

Cuadro 39. Análisis de Costos Parciales para el primer subcultivo

Componente	Precio Bs.	Costo Parcial en Bs. Por 100 vitroplantas
Macronutrientes	2,63	5,27
Micronutrientes	0,83	1,63
Vitaminas	0,62	1,22
Aditivos	0,90	1,77
Fitohormonas		2,86
TOTAL		12,67

Cuadro 40. Análisis de Costos Parciales para el segundo subcultivo.

Componente	Precio Bs.	Costo Parcial en Bs. Por 100 vitroplantas
Macronutrientes	2,63	5,27
Micronutrientes	0,83	1,63
Vitaminas	0,62	1,22
Aditivos	0,90	1,77
Fitohormonas		2,86
TOTAL		12,67

Cuadro 41. Análisis de Costos Parciales para el tercer subcultivo.

Componente	Precio Bs.	Costo Parcial en Bs. Por 100 vitroplantas
Macronutrientes	2,63	5,27
Micronutrientes	0,83	1,63
Vitaminas	0,62	1,22
Aditivos	0,90	1,77
Fitohormonas		2,86
TOTAL		12,67

Cuadro 42. Análisis de Costos Parciales para el cuarto subcultivo.

Componente	Precio Bs.	Costo Parcial en Bs. Por 100 vitroplantas
Macronutrientes	2,63	5,27
Micronutrientes	0,83	1,63
Vitaminas	0,62	1,22
Aditivos	0,90	1,77
Fitohormonas		2,86
TOTAL		12,67

Cuadro 43. Análisis de Costos Parciales para el quinto subcultivo.

Componente	Precio Bs.	Costo Parcial en Bs. Por 100 vitroplantas
Macronutrientes	2,63	5,27
Micronutrientes	0,83	1,63
Vitaminas	0,62	1,22
Aditivos	0,90	1,77
Fitohormonas		2,86
TOTAL		12,67

6. CONCLUSIONES

- Para la obtención de vitroplantas se utilizaron meristemas con un tamaño de 0,6 mm de las dos variedades estudiadas.
- Los explantes apropiados para la multiplicación fueron los apicales y medios de la variedad Waych´a hasta el cuarto subcultivo.
- Los explantes apropiados para la multiplicación fueron los apicales y medios de la variedad Imilla Negra hasta el tercer subcultivo.
- El explante basal de la variedad Imilla Negra durante el proceso de multiplicación no presenta cambios morfológicos hasta el segundo subcultivo.
- El explante basal de la variedad Waych´a no es apropiado para la multiplicación.
- En el cuarto subcultivo se observó que la variedad imilla negra presento cambios morfológicos.
- En el quinto subcultivo de la variedad Imilla Negra los explantes apical, medio y basal presentaron engrosamiento de tallo, decoloración y escaso crecimiento.
- En el quinto subcultivo la variedad Waych´a los explantes apical, medio y basal presentaron cambios morfológicos. (formación de callo, engrosamiento de tallo, escaso crecimiento).
- Para la producción y obtención de semilla pre básica los explantes apropiados son los apicales y medios.
- Los costos de producción se tomara en cuenta de la variedad Imilla Negra hasta el tercer subcultivo y de la variedad Waych´a hasta el cuarto subcultivo, ya que en los siguientes subcultivos se obtendrán plantas atípicas.
- En la introducción de los meristemas y en los subcultivos de los explantes no se adiciono auxinas en el medio de cultivo.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la utilización de meristemas de 0.2 mm, con la adición de auxinas en el medio de cultivo.
- Se recomienda para llevar a la etapa de enraizamiento de los propagulos es preferible hacerlo en el tercer subcultivo de la variedad Imilla Negra y en el cuarto subcultivo de la variedad Waych´a. ya que posteriormente se presentan cambios morfológicos.
- Es preferible en la etapa de propagación, la utilización de explantes apicales y medios de las dos variedades estudiadas ya que demuestran desarrollo en altura.
- Por la presencia de cambios morfológicos se recomienda realizar estudios moleculares para determinar variabilidad genética de las variedades Imilla negra en el cuarto subcultivo y Waych´a en el quinto subcultivo.
- Se recomienda realizar estudios con la utilización de hormonas en concentraciones adecuadas para llegar a un número mayor de subcultivos,
- Es recomendable no utilizar explantes basales de la variedad Waych´a por no presentar desarrollo en los diferentes subcultivos.
- Se recomienda la utilización de los explantes basales de la variedad Imilla negra hasta el segundo subcultivo, posterior a este subcultivo no se podrá utilizar por presentar poco desarrollo en el crecimiento.

8. BIBLIOGRAFIA

- **ASHMORE, E.** 1997. Informe de estado: desarrollo y usos de técnicas in vitro para la conservación y empleo de plantas recursos genéticos. Planta Internacional Instituto de Recursos Genético. 67 p.
- **AL ZAHIM, M.** 1996. Inducción de embriogénesis somática in el uso de RAPD la clasificación y la detección de variación somaclonal. Universidad de Birminigham. UK. 184 p.
- **CARDONE, S; OLMOS, S.** 2004. Variación somaclonal. *In* Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA, Argentina. p. 81-96.
- **CARDONE C. SUSANA.** 2006. Métodos para generar variabilidad. Variación somaclonal. Cap. I 86 p.
- **CASSELLS, A.C. Y CURRY, R.F.** 2001. Stress oxidativo y fisiológico, epigenetica y la variabilidad genética en cultivo de tejidos de planta: implicaciones para micro propagadores e ingeniería genética. Cultivo de tejido y órganos 64: 145-157 p.
- **DARIAS, R.** 1993. Recopilación de Temas Sobre Técnicas de Cultivo in vitro. Oruro, Bolivia. U.T.O. Universidad Camilo Cienfuegos de Matanzas. Cuba. 169 p.
- **DENTON, YO. R** 1997. Variación fenotípica de *L. Salanum tuberosum*. Investigación de patatas. 20. 131-136 p.
- **DÍAZ MARINA L.** 2006. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Transformación Genética. Cap. III. 110 p.
- **DUEÑAS, F.** 2003. Estudio de la variabilidad genética en clones y somaclones de plátanos frutas (*Musa spp.*). Tesis de diploma. Facultad de Biología, UH. 56pp.
- **ESCALAN, J. V.** 2002. Estado de mejora convencional genética. Simposio Internacional de Biotecnología de Plantas, VI, Santa Clara 26p.

- **GOLMIRZAI, DE LA MAÑANA Y A. PANTA.** 1996. Avances en papa crio preservación por vitrificación. CIP, Lima. En: [http:// www.cipotato.Org/market/PgmRpts/pr95-96/program2/prog22.htm](http://www.cipotato.Org/market/PgmRpts/pr95-96/program2/prog22.htm). pp. 1-7.
- **HURTADO M. DANIEL V / MERINO M. MARÍA EUGENIA.** 1994. Editorial Trillas. Tercera Edición. Agosto. México. Pp. 233. Pg. 136 – 148.
- **JIMÉNEZ TALAVERA, MARIANO.** 2005. El Cultivo de la Papa. SAG, (Secretaria de Agricultura y Ganadería, Honduras). 13 p.
- **KARP, A.** 1995. Somaclonal variación como un instrumento para mejora de cosecha Euphytica. 85: 295-302.
- **LARKIN, P. Y W. SCOWCROFT.** 1981. Somaclonal Variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. TheorAppl Genet. 60: 197-124.
- **MONTALVO; G QUIALA; E. MATOS, J.** 2005 La biotecnología como una herramienta eficaz para la Restauración ecológica. Cuba.
- **MOYA PICHARDO T; MEDEROS PÉREZ B.** 2001. Cultivo de meristemos para la eliminación del virus S de la papa en plantas cultivadas *in vitro*. Tesis.Cuba, CU. Instituto de Biotecnología de la Plantas. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. 119 p.
- **MONTES, S.** 1995. El cultivo in vitro de células, tejidos y órganos. Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 52-56pp.
- **OLMOS SOFÍA; LUCIANI GABRIELA; GALDEANO ERNESTINA.** 2006. Métodos de propagación y Conservación de germoplasma. España, ES, Cap. I 164-165 p.
- **PÉREZ PONCE, J.** 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. 179-191p.
- **PÉREZ, J.N.**1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Ediciones GEO. Villa Clara, Cuba.
- **PIERIK, R.** 1987. Cultivo in vitro de plantas superiores. Editores Martin Mijhoff. Dorohecht Países Bajos, 321 pp.
- **PIERIK.** 2002. Biotecnología Vegetal. ¿qué es el Cultivo In Vitro?19 p.

- **PICCA, A; HELGUERA, M; SALOMÓN, N; CARRERA, A.** 2004. Marcadores moleculares. *In* Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina, Ediciones INTA. p. 61-68.
- **PHILLIPS, R.L., KEAPLER, S.M., OLHOFT, P.,** 1994. Inestabilidad genética de cultivo de tejidos de plantas: Breakdawn de Mandos Normales. *Proceder de Ciencia Nacional Académica.*, 91: 5222-5226
- **PROINPA.** 1994. Catalogo Boliviano de Cultivares de Papa Nativa. Cochabamba, BO, Programa de Investigación de la Papa. 5-11 p.
- **RAMIRO RAÚL OCHOA TORREZ.** 2007. Diseños Experimentales. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz – Bolivia. Cap. 12 134-145.
- **RAMIREZ E.** 2001. Renovación y Conservación in Vitro de Germoplasma de papa M. Sc. Tesis. Guatemala. GT. Técnico de Innovación Tecnológica en Biotecnología, Laboratorio de Biotecnología, CIAL-ICTA. 50 p.
- **ROCA, W Y MROGINSKI, L.** 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT, Colombia. 970 p.
- **SÁNCHEZ CHIANG, NEIVA; JIMÉNEZ, VICTOR M.** 2009. Técnicas Moleculares Para la Detección de variantes Somaclones. *Agronomía mesoamericana*, Vol. 20, Núm. 1, enero-julio, pp135-151. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- **SIERRA E.; CRUZ J.; ARELLANO R.** 2005. El Cultivo de la Papa. Costa Rica, CR. Proyecto de Modernización de los Servicios de Tecnología Agrícola. 14 p.
- **SOLIZ M.** (2004) Utilización de tres diferentes almidones, como agente de soporte, en medios de propagación *In Vitro* de papas nativas *Solanum Tuberosum* Sub sp andigena, var. Waych´a paceña y *Solanum x Juzepzuki* var. Bola luki. Tesis de Lic. En Ing. Agro. UMSA FAC de Agronomía. La Paz, Bolivia pp. 2-35
- **ZAID A.** 2004. Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Roma. Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. 340 p.

ANEXOS

DATOS DE ALTURA DE PLANTA (cm) DE LA VARIEDAD IMILLA NEGRA

EXPLANTES	REPETICIONES	PRIMER	SEGUNDO	TERCER	CUARTO	QUINTO
		SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO
APICAL	1	6,5	3,5	3,5	1,1	1
APICAL	2	5,2	6,5	4,8	1,5	1,5
APICAL	3	5,3	4,7	5,2	2,5	1,7
APICAL	4	6,2	5,2	3,7	2,6	2,7
APICAL	5	4,2	5,7	3,6	1,3	1,1
APICAL	6	6,5	4,8	4,5	2,1	1,2
APICAL	7	6,3	5,5	4,1	1,9	1,3
APICAL	8	5,6	6,2	5,5	1,5	1,5
APICAL	9	4,8	5,3	5,3	2,4	1,6
APICAL	10	5,6	3,8	3,6	2,1	1,2
MEDIO	1	5,4	3,9	3,1	0,7	1,5
MEDIO	2	4,3	5,3	2,3	1,2	1,2
MEDIO	3	5,3	4,5	2,5	0,5	1,6
MEDIO	4	5,7	4,1	3,4	1,3	2,1
MEDIO	5	4,9	5,3	2,2	1,5	1,8
MEDIO	6	5,1	5,2	2,1	0,8	1,1
MEDIO	7	4,9	4,2	3,1	0,9	1,1
MEDIO	8	4,1	3,8	2,9	1,5	1,3
MEDIO	9	5,2	5,1	2,4	1,4	1,5
MEDIO	10	4,1	4,1	2,2	0,9	1,3
VASAL	1	5,3	4,3	2,1	0,9	0,5
VASAL	2	5,3	4,1	1,9	1,1	0,9
VASAL	3	5,1	4,1	2,1	0,9	0,5
VASAL	4	5,2	4,5	2,3	1,5	0,6
VASAL	5	5,5	4,1	1,5	0,8	0,5
VASAL	6	4,9	4,5	2,1	1,3	0,7
VASAL	7	5,7	4,8	2,1	1,3	0,5
VASAL	8	5,2	4,6	2,5	1,6	0,4
VASAL	9	5,5	4,5	2,4	1,5	0,4
VASAL	10	5,5	4,1	2,2	1,5	0,6

DATOS DE ALTURA DE PLANTA (cm) DE LA VARIEDAD WAYCH'Á

EXPLANTES	REPETICIONES	PRIMER	SEGUNDO	TERCER	CUARTO	QUINTO
		SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO
APICAL	1	6,5	4,3	5,5	4,6	0,5
APICAL	2	6,8	4,4	5,3	4,7	0,8
APICAL	3	6,6	4,1	5,7	4,3	1,1
APICAL	4	6,5	4,5	5,5	5,2	0,7
APICAL	5	6,8	5,1	5,5	4,5	0,5
APICAL	6	6,5	4,5	5,4	4,5	0,7
APICAL	7	6,3	5,3	5,3	4,7	0,8
APICAL	8	6,3	4,6	5,5	4,1	1,2
APICAL	9	6,9	4,7	5,7	5,1	1,4
APICAL	10	6,8	4,7	5,7	4,8	0,8
MEDIO	1	6,3	6,7	5,3	4,1	0,5
MEDIO	2	6,1	6,4	5,6	4,2	0,9
MEDIO	3	6,4	6,5	5,5	4,5	0,8
MEDIO	4	6,3	6,5	5,1	4,3	0,7
MEDIO	5	6,3	6,3	5,8	4,5	1,1
MEDIO	6	6,1	6,7	5,6	4,5	1,2
MEDIO	7	6,5	6,6	5,7	4,6	0,6
MEDIO	8	6,3	6,7	5,3	4,7	0,7
MEDIO	9	6,2	6,8	5,8	4,2	0,5
MEDIO	10	6,5	6,8	5,6	4,7	0,6
VASAL	1	3,7	2,7	2,5	1,9	0,8
VASAL	2	3,5	2,8	2,1	2,1	0,9
VASAL	3	3,8	2,6	2,1	2,1	1,2
VASAL	4	3,8	2,5	2,6	1,9	1,1
VASAL	5	3,9	2,9	2,6	1,8	0,8
VASAL	6	3,6	2,7	2,8	1,8	0,7
VASAL	7	3,7	2,5	2,6	2,1	0,7
VASAL	8	3,7	3,1	2,3	2,3	0,9
VASAL	9	3,3	2,7	2,8	2,2	0,9
VASAL	10	3,5	2,7	2,7	2,1	0,5

DATOS DE DIAS DE RECUPERACIÓN DE LA VARIEDAD IMILLA NEGRA

EXPLANTES	REPETICIONES	PRIMER	SEGUNDO	TERCER	CUARTO	QUINTO
		SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO
APICAL	1	35	47	36	40	38
APICAL	2	35	47	36	40	38
APICAL	3	35	47	36	40	38
APICAL	4	35	47	36	40	38
APICAL	5	35	47	36	40	38
APICAL	6	35	47	36	40	38
APICAL	7	35	47	36	40	38
APICAL	8	35	47	36	40	38
APICAL	9	35	47	36	40	38
APICAL	10	35	47	36	40	38
MEDIO	1	35	47	36	40	38
MEDIO	2	35	47	36	40	38
MEDIO	3	35	47	36	40	38
MEDIO	4	35	47	36	40	38
MEDIO	5	35	47	36	40	38
MEDIO	6	35	47	36	40	38
MEDIO	7	35	47	36	40	38
MEDIO	8	35	47	36	40	38
MEDIO	9	35	47	36	40	38
MEDIO	10	35	47	36	40	38
VASAL	1	35	47	36	40	38
VASAL	2	35	47	36	40	38
VASAL	3	35	47	36	40	38
VASAL	4	35	47	36	40	38
VASAL	5	35	47	36	40	38
VASAL	6	35	47	36	40	38
VASAL	7	35	47	36	40	38
VASAL	8	35	47	36	40	38
VASAL	9	35	47	36	40	38
VASAL	10	35	47	36	40	38

DATOS DE DIAS DE RECUPERACIÓN DE LA VARIEDAD WAYCH'Á

EXPLANTES	REPETICIONES	PRIMER	SEGUNDO	TERCER	CUARTO	QUINTO
		SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO	SUBCULTIVO
APICAL	1	25	43	35	47	68
APICAL	2	25	43	35	47	68
APICAL	3	25	43	35	47	68
APICAL	4	25	43	35	47	68
APICAL	5	25	43	35	47	68
APICAL	6	25	43	35	47	68
APICAL	7	25	43	35	47	68
APICAL	8	25	43	35	47	68
APICAL	9	25	43	35	47	68
APICAL	10	25	43	35	47	68
MEDIO	1	25	43	35	47	68
MEDIO	2	25	43	35	47	68
MEDIO	3	25	43	35	47	68
MEDIO	4	25	43	35	47	68
MEDIO	5	25	43	35	47	68
MEDIO	6	25	43	35	47	68
MEDIO	7	25	43	35	47	68
MEDIO	8	25	43	35	47	68
MEDIO	9	25	43	35	47	68
MEDIO	10	25	43	35	47	68
VASAL	1	25	43	35	47	68
VASAL	2	25	43	35	47	68
VASAL	3	25	43	35	47	68
VASAL	4	25	43	35	47	68
VASAL	5	25	43	35	47	68
VASAL	6	25	43	35	47	68
VASAL	7	25	43	35	47	68
VASAL	8	25	43	35	47	68
VASAL	9	25	43	35	47	68
VASAL	10	25	43	35	47	68

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/L)	Volumen de la solución madre por litro de medio
Macros		100 ml
NH ₄ NO ₃	16,5	
KNO ₃	19	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	
KH ₂ PO ₄	1,7	
Micros		10 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86	
H ₃ BO ₃	0,62	
KI	0.083	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	
CuSO ₄ .5H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
CoCl ₂ .6H ₂ O 10 ml de solución 25 mg/100ml		
Fuente de hierro		10 ml
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.00556	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.00746	
Vitaminas		10 ml
Inositol	10	
Nicotínico	0,05	
HCl-Piridoxina	0,05	
Glicina	0,2	
HCl-Tiamina	0,01	

Adicionar al medio 3% de sacarosa y 0.7% de agar.