

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



**TESIS DE GRADO**

**ESTABLECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y TIPO DE EXPLANTE EN VITRO  
PLANTAS DE PAPA VARIEDAD HUAYCHA (*Solanum tuberosum* sp.) PARA  
MEJORAR LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE SEMILLA**

**PRESENTADO POR:**

**RUTH KAREM CAILLANTE ASENCIO**

**La Paz - Bolivia**

**2017**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**ESTABLECIMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y TIPO DE EXPLANTE EN VITRO  
PLANTAS DE PAPA VARIEDAD HUAYCHA (*Solanum tuberosum* sp.) PARA  
MEJORAR LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE SEMILLA**

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

**CAILLANTE ASENCIO RUTH KAREM**

**Asesor (es):**

Ing. Rafael Adolfo Murillo García .....

**Tribunal Examinador**

Ing. Ph.D. Hugo Bosque Sánchez .....

Ing. M. Sc. Rubén Trigo Riveros .....

Ing. Fidel Hernán Cortez Álvarez .....

**Aprobada:**

**Presidente Tribunal Examinador:** .....

**LA PAZ - BOLIVIA**

**2017**

## ***DEDICATORIA***

*A Dios sobre todas las cosas, que nos de valor para seguir adelante.*

*Con mucho cariño a mi padre José Luis Caillante coronado, a mi madre Lucía Asencio Limachí y a mi hermano por su amor y comprensión y constante apoyo moral, durante estos años.*

*También dedicar el presente trabajo a mis amigos de la facultad de Agronomía por su constante motivación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Ing. Rafael Adolfo Murillo García quien de manera desinteresada me transmitió sus conocimientos y me brindo su amistad.

A mis revisores Ing. Fidel Hernán Cortez Álvarez, Ing. M. Sc. Rubén Trigo Riveros e Ing. Ph.D. Hugo Bosque Sánchez por sus correcciones acertadas y su tiempo brindado.

A Ing. Marizol Nina Gutierrez quien con su experiencia profesional, sugerencias, hicieron efectiva la culminación del presente trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos quienes con su apoyo hicieron posible la ejecución de mi tesis.

Mi reconocimiento al personal docente y administrativo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés que posibilitó mi formación profesional.

## SUMMARY

The present put a title to research work establishment of means of cultivation and guys of ex-stoppage in vitroplantas of potato variety Huaycha ( *Solanum tuberosum* sp. ) for the better the systems of production of seed, he was in the Laboratory accomplishedly of Vegetable Biotecnología of Agronomía's Faculty UMSA; Where objectives were: Analyzing the behavior of potato Huaycha in the phases of: Establishment, multiplication and enraizamiento *in vitro*, Determining the best concentration of The fact that he stimulates the vitro's development sets up, Evaluating the several guys of ex-stoppage of potato Huaycha for the multiplication to conditions *in vitro*. The vegetative material used for ex-stoppages was potato sprouts of seed variety Huaycha. Treatments were distributed in a design completely at random with repair bi-factorial, with twelve treatments and ten repetitions, where each treatment was shaped by a different concentration of With different guy of ex-stoppage. It was determined at laboratory than the bigger height apical, half an and basal ex-stoppage was obtained to a concentration in them of To the 1.5 mg lt, with 8,81, 7,37, 6.19 cm's average respectively, as to number of better sheets ex-stoppages were apical and average with an average of 7 and 5 sheets respectively to a concentration of To the 1.5 mg lt, for number of roots the vitroplantas that got out an average of 7 and 5 roots were the apical and half an ex-stoppages to a concentration of To the 1.5 mg lt, likewise a percentage of survival 91.66 %, percentage of contamination 6.66 % and percentage of oxidation 0 %.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado establecimiento de medios de cultivo y tipos de explante en vitroplantas de papa variedad Huaycha (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de producción de semilla, fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía- UMSA; donde los objetivos fueron: Analizar el comportamiento de papa Huaycha en las fases de: establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*, Determinar la mejor concentración de  $AG_3$  que estimule el desarrollo de la vitro planta, Evaluar los distintos tipos de explante de papa Huaycha para la multiplicación a condiciones *in vitro*. El material vegetativo utilizado para los explantes fue brotes de semilla de papa variedad Huaycha. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, con doce tratamientos y diez repeticiones, donde cada tratamiento estaba conformado por una distinta concentración de  $AG_3$  con diferente tipo de explante. En laboratorio se determinó que la mayor altura se obtuvo en los explante apical, medio y basal a una concentración de  $AG_3$  al 1,5 mg/lit, con un promedio de 8.81, 7.37, 6,19 cm respectivamente, en cuanto a número de hojas los mejores explantes fueron apicales y medios con un promedio de 7 y 5 hojas respectivamente a una concentración de  $AG_3$  al 1,5 mg/lit, para número de raíces las vitroplantas que obtuvieron un promedio de 7 y 5 raíces fueron los explantes apicales y medios a una concentración de  $AG_3$  al 1,5 mg/lit, así mismo un porcentaje de supervivencia = 91,66%, porcentaje de contaminación = 6,66% y porcentaje de oxidación = 0%.

## INDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación .....	2
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo General .....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Origen y evolución de la papa cultivada. Descripción del cultivo.....	4
3.2 Taxonomía .....	5
3.3 Descripción Morfológica de la papa cultivada REDUCIR.....	5
3.4 Características de la variedad Huaycha <i>Solanum tuberosum</i> .....	6
3.4.1 Características Morfológicas .....	6
3.4.2 Descripción Botánica .....	7
3.4.3 Características Agronómicas .....	7
3.4.4 Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos .....	7
3.4.5 Semilla.....	8
3.5 Biotecnología vegetal.....	9
3.6 Cultivo de tejidos.....	10
3.6.1 Cultivo de células y tejidos .....	11
3.6.2 Cultivo de órganos.....	12
3.6.3 Cultivo de ápices y meristemo.....	13
3.7 Explante.....	15
3.8 Medio de cultivo.....	16
3.8.1 Composición del medio de cultivo .....	17
3.9 Giberelinas.....	23
3.10 Micropropagación .....	24
3.10.1 Ventajas de la micropropagación.....	25
3.10.2 Factores limitantes de la micropropagación .....	25
3.11 Fases de la micropropagación.....	26
3.11.1 Fase 0 Selección de materiales vegetales .....	27

3.11.2	Fase I Establecimiento .....	27
3.11.3	Fase II Multiplicación .....	28
3.11.4	Fase III Enraizamiento.....	28
3.11.5	Fase IV Aclimatación.....	29
3.11.6	Semilla pre-básica .....	29
4	LOCALIZACIÓN.....	30
4.1	Ubicación Geográfica.....	30
5	MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
5.1	Material Experimental .....	31
5.1.1	Material Vegetal.....	31
5.1.2	Laboratorio de Biotecnología Vegetal Facultad de Agronomía UMSA.....	31
5.1.3	Equipos y Materiales de laboratorio.....	32
5.1.4	Reactivos químicos.....	33
5.1.5	Materiales de gabinete.....	33
5.2	Metodología.....	33
5.2.1	Obtención de Material.....	33
5.2.2	Procedimiento Experimental.....	34
5.2.3	Etapa 0 Tratamiento del material vegetal .....	34
5.2.4	Etapa I Establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i> .....	34
5.2.5	Etapa II Micropropagación de vitroplantas .....	36
5.2.6	Modelo Lineal Aditivo.....	40
6	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
6.1	Establecimiento.....	48
6.1.1	Altura de la planta.....	49
6.1.2	Número de hojas.....	52
6.1.3	Número de raíces.....	54
7	CONCLUSIONES.....	58
8	RECOMENDACIONES.....	59
9	BIBLIOGRAFÍA.....	60

## INDICE DE TABLA

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la papa.....	5
---	---

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Factores y niveles de estudio.....	40
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales.....	41
Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia en la etapa de micropropagación Factor A: Explante. .....	42
Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia en la etapa de micropropagación Factor B: Concentraciones de <b>(AG3)</b> .....	43
Cuadro 5. Porcentaje de contaminación en la etapa de micropropagación. Factor A: Explante. ....	44
Cuadro 6. Porcentaje de contaminación en la etapa de micropropagación. Factor B: Concentraciones de <b>(AG3)</b> .....	44
Cuadro 7. Porcentaje de oxidación en la etapa de micropropagación. Factor A: Explante. ...	45
Cuadro 8. Porcentaje de oxidación en la etapa de micropropagación. Factor B: Concentraciones de <b>(AG3)</b> .....	46
Cuadro 9. Análisis de varianza para la altura de la vitroplanta .....	49
Cuadro 10. Prueba de Duncan para el Factor A: Explante. ....	49
Cuadro 11. Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de <b>AG3</b> .....	50
Cuadro 12. Análisis de varianza para número de hojas en vitroplantas .....	52
Cuadro 13. Prueba de Duncan para el Factor A: Explante. ....	52
Cuadro 14. Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de <b>AG3</b> .....	53
Cuadro 15. Análisis de varianza para número de raíces.....	54
Cuadro 16. Prueba de Duncan para el Factor A: Explante. ....	55
Cuadro 17. Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de <b>AG3</b> .....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de vitroplantas para determinar supervivencia. ....	42
Figura 2. Vitroplantas contaminadas con bacterias.....	43
Figura 3 . Vitroplantas sin presencia de oxidación. ....	45
Figura 4. Altura de vitroplanta registrada cada 2 días .....	46
Figura 5. Número de hojas presentes en vitroplantas .....	47
Figura 6. Formación de raíces a partir del explante sembrado registrada cada 2 días.....	47
Figura 7. Efecto de los tratamientos en altura de la vitro planta .....	51
Figura 8. Efecto de los tratamientos en número de hojas presenten en vitroplantas .....	53
Figura 9. Efecto de los tratamientos en número de raíces presentes en las vitroplantas. ....	56

# 1 INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la papa es típicamente cultivada en pequeñas superficies dentro de las zonas altas interandinas, ocupando una superficie estimada de 133.375 ha de cultivo, y representando la principal fuente de ingresos de 125.00 personas en la fase productiva, industrial y de comercialización. A pesar de la gran importancia que tiene en el país, la producción y productividad es baja, con un rendimiento promedio de 6 t/ha, aunque algunas zonas como los valles interandinos y los valles meso térmicos de Cochabamba y Santa Cruz, los rendimientos son mayores a 10t/ha.

El cultivo de papa reviste gran importancia constituyéndose como el principal alimento en la dieta del poblador en el altiplano boliviano, por proporcionar almidón otras fuentes de energía: azúcar, albúminas, vitaminas, grasas, aceites y elementos minerales; se consume tanto en forma fresca o deshidratada (chuño y tunta).

Debido a la población creciente en nuestro país, a través del tiempo se han ido reduciendo los espacios destinados a la agricultura, lo cual sumado a la degradación de los suelos, los factores climáticos, la falta de recursos hídricos y la presencia de enfermedades y plagas presentes limitan la intensificación de la producción en el Altiplano Boliviano.

Es importante producir semillas obtenidas en condiciones *in vitro*, obteniendo plantas que presentan características fisiológicas y morfológicas, óptimas para su utilización como forraje, abono y principalmente tubérculos de buena calidad para el agricultor a diferencia de la planta obtenida por la siembra de semilla obtenida en campo.

## 1.1 Antecedentes

El incremento poblacional es uno de los factores que provoca una demanda en las necesidades alimenticias por tal motivo el hombre ha ido desarrollando diferentes técnicas de cultivo que permita cumplir estas necesidades. Una actividad esencial es la introducción de la agricultura en ambientes controlados, para contrarrestar los factores climáticos adversos, a la falta de recursos hídricos para riego y la presencia de plagas y enfermedades. Para mejorar los sistemas de producción es necesario el

uso de semilla de buena calidad para satisfacer la demanda de alimentos, que permita lograr la Seguridad y Soberanía Alimentaria.

En la actualidad las técnicas de multiplicación masiva como la micropropagación *in vitro* representa, una alternativa para mejorar la producción de cultivos.

La técnica de micropropagación de cultivos *in vitro* está siendo implementado en diferentes países de América Latina, especialmente en zonas donde la pérdida de la producción del cultivo de papa por causa de enfermedades o plagas disminuyen el rendimiento de dicho cultivo, este método es considerado como un sistema de producción agrícola apto para la producción de plantas libres de enfermedades y plagas logrando mejorar los rendimientos hasta un 50por ciento .

## **1.2 Justificación**

Entre la baja producción de papa se debe a varios factores entre las razones que explican esta situación, están las condiciones en las que se cultiva, con falta de riego, suelos pobres en materia orgánica, variedades con bajo potencial de rendimiento, semilla de baja calidad producto del ataque de plagas y enfermedades falta de mecanización, falta de créditos y políticas de producción. Por consiguiente es importante contar con semillas de alta calidad genética, libre de virus y enfermedades que pueda producir mejor de esta manera mejorar las condiciones de vida del agricultor.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite la eliminación de virus, acompañada de la micropropagación que permite la multiplicación masiva de plantas de esta manera incrementar los volúmenes de producción, además de producir alimentos de buena calidad la rentabilidad del sistema podría convertirse en un atractivo que estimule la participación de muchas personas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Establecer medios de cultivo y tipo de explante en vitroplantas de papa: variedad Huaycha (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de producción de semilla.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar el comportamiento de papa Huaycha en las fases de: establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro*.
- Determinar la concentración óptima de  $AG_3$  que estimule el desarrollo de las vitroplantas.
- Evaluar los distintos tipos de explante de las vitroplantas de la variedad Huaycha para mejorar la multiplicación en condiciones *in vitro*.

### 3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Origen y evolución de la papa cultivada. Descripción del cultivo

Hawkes, citado por el CIP (2001), basándose en evidencias científicas, se hace una estimación inteligente de cómo se originó y evolucionó la papa cultivada a partir de las papas silvestres. La papa cultivada probablemente se originó en los Andes Centrales peruano-bolivianos, siendo *Solanum stenotomum* la más primitiva, y cuyo probable ancestro sea *Solanum leptophyes*. El evento más importante en este proceso evolutivo fue sin duda la hibridación de *Solanum stenotomum* con la especie silvestre *Solanum sparsipilum* para formar *Solanum tuberosum*. La subespecie original fue seguramente *Solanum tuberosum ssp andigena*. Mucho después, de la subespecie *andigena* se derivó la subespecie *tuberosum* en el Sur de Chile. Así, pues, la subespecie *tuberosum* no solo es mucho más reciente, sino que se originó en otro ámbito ecológico.

La papa junto con el trigo, arroz y maíz, es uno de los cuatro productos más importantes de la alimentación mundial. Bolivia es el país que consume más papa, en promedio cada habitante consume 80 kg de papa al año por habitante (Ugarte, 2001). La papa es uno de los alimentos más populares del mundo, junto con el arroz y el trigo constituyen los alimentos más consumidos por el hombre. Este tubérculo posee diferentes bio-moléculas como constituyentes. A decir de (Sánchez, 2003) la papa, excepto en carbohidratos, es pobre en sustancias nutritivas. Contiene un 75 por ciento de agua, 20 por ciento de carbohidratos, un 2 por ciento de proteínas y el resto son minerales como potasio, magnesio y fósforo.

### 3.2 Taxonomía

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la papa

<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	Solanum
<b>Especie</b>	Solanum tuberosum sp.

Fuente. Huasco, (2000)

### 3.3 Descripción Morfológica de la papa cultivada REDUCIR

Parsons (2003), describe a la papa (*Solanum tuberosum* sp.) como una planta anual de tipo herbácea arbustiva, que alcanza un altura de 40 a 80 cm, y que se propaga por medio de tubérculos. Las raíces de la planta son de tipo adventicias y se encuentran en los primeros 40 cm del suelo. Presenta tallo normal de tipo herbácea, erecto, un poco veloso y con ramificaciones no muy desarrolladas. Las hojas son de tipo compuesto con varios folíolos opuestos y uno grande como terminal. La inflorescencia es del tipo cima compuesta terminal, con pedúnculos largos, la flor es completa y los cinco pétalos se funcionan formando el tubo floral.

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

Las hojas son alternas, igual que los estolones. Las primeras hojas tienen aspecto simple, vienen después las hojas compuestas, imparipinadas con 3-4 pares de hojuelas laterales y una hojuela terminal. Entre las hojuelas laterales hay hojuelas pequeñas de segundo orden. Las raíces se desarrollan principalmente en el verticilo,

en los nódulos del tallo principal. Su crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25-50 cm, y a veces, cuando el suelo lo permite, nuevamente vertical hasta 90 cm. La planta de papa posee un sistema radicular fibroso muy ramificado. La inflorescencia es cimosa; las flores son hermafroditas, tetracíclicas, pentámeras; el cáliz es gamosépalo lobulado; la corola es rotácea pentabulada de color blanco a púrpura, con 5 estambres. Cada estambre posee dos anteras de color amarillo pálido, amarillo más fuerte o anaranjado, que producen polen a través de un tubo terminal; gineceo con ovario bilocular. El fruto es una baya bilocular de 15-30 mm de diámetro, color verde, verde amarillento o verde azulado. Cada fruto contiene aproximadamente 200 semillas (Montaldo, 1984).

El tubérculo de la papa es un tallo subterráneo ensanchado. En la superficie posee yemas axilares en grupo de 3-5 y protegidas por hojas escamosas (ojos). Una yema representa una rama lateral del tallo subterráneo. El tubérculo es un sistema morfológico ramificado; los ojos de los tubérculos tiene una disposición rotada alterna desde el extremo proximal del tubérculo (donde va inserto el estolón) hasta el extremo distal, donde los ojos son más abundantes. La yema apical del extremo distal es la que primero se desarrolla domina el crecimiento de todas las otras. A este fenómeno se le ha denominado “dominancia apical” (Montaldo, 1984).

### **3.4 Características de la variedad Huaycha *Solanum tuberosum*.**

Plantas vigorosas, erectas color predominante de las flor violeta, color secundario de la flor morado, grado de la floración profuso, color del tallo; verde con mucha pigmentación, forma del tubérculo: redondo, ojos profundos. Numero cromosómico  $2n=4x=48$ . Gabriel, J.; Pereira, R. y A, Gandarillas, (2011)

#### **3.4.1 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. (PROINPA, 1994)

### **3.4.2 Descripción Botánica**

Las raíces son fibrosas, ramificadas; sus raíces son de carácter adventicio, se originan a partir de yemas subterráneas. Presentan tallos aéreos, que se originan a partir de las yemas presentes en el tubérculo utilizado como semilla, son herbáceos. Los rizomas crecen de la base del tallo aéreo, a través de un engrosamiento en su extremo distal, genera un tubérculo.

Los tubérculos se hallan engrosados y están adaptados para almacenar los nutrientes. Presenta hojas compuestas de 7 a 9 folíolos, de forma lanceolada. La flor es de color lila con rojo morado, las flores tienen de 3 a 4 cm de diámetro, con cinco pétalos. El fruto es una baya, con un diámetro de 1 y 3 cm. Presentan semillas pequeñas, aplanadas de forma arriñonada.

### **3.4.3 Características Agronómicas**

Especie *Solanum tuberosum* sp. 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. (PROINPA, 1994).

Aunque la especie *Solanum tuberosum* sp tiene la más amplia distribución geográfica que cualquier especie de papa cultivada, se cultiva entre los 2500 – 4000 m de la región andina de Sudamérica, desde las serranías del noreste de Argentina, Punas y Pre-punas de Bolivia, centro y sur del Perú, Jalcas del norte de Perú y los Páramos y Sub-páramos del Ecuador, Colombia y Venezuela (Ochoa, 2001).

### **3.4.4 Reacción a Enfermedades y Factores Abióticos**

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

### 3.4.5 Semilla

Una semilla artificial es una estructura vegetal de origen normalmente asexual obtenida *in vitro* a partir de cultivo de tejidos y modificada, que intenta imitar una semilla natural. Estará formada por tejido meristemático totipotente capaz de producir una planta completa o por brotes originados por cultivos de meristemas (embriogénesis somática), y una cubierta y endospermo artificiales en el caso de tenerlos (Querejeta et al. , S.F.).

Una semilla es definida como aquella unidad formada de un embrión cigótico y su provisión de alimento almacenado, rodeados por cubiertas protectoras. Las semillas naturales tienen, en su mayoría, un contenido de humedad bajo, un metabolismo a nivel reducido y no presentan actividad aparente de crecimiento sino hasta la germinación. La semilla sintética mantiene muchas de estas características, pero adquiere otras nuevas gracias a su naturaleza de propagación vegetativa (López, S.F.; Hartmann y Kester, 1999).

Inicialmente los investigadores utilizaron el concepto de semilla sintética desde un punto de vista estricto, definiendo a esta aplicación, como la ingeniería de los embriones somáticos, donde es utilizado el encapsulamiento como forma de propagación. No obstante, en la actualidad esta definición ha sido revolucionada debido a la posibilidad del encapsulado de otros tejidos con capacidad meristemática (Artola, 2002).

Las semillas sintéticas son propágulos clonales de fuente parental, que tienen la capacidad para germinar *in vitro* y luego ser trasplantadas, pero que también pueden ser sembradas directamente en un sustrato *in vivo*. Aunque en la actualidad, la propagación vegetativa por este método es una práctica limitada a cultivos de alto valor comercial, podría llegar a difundirse ampliamente si se lograra bajar significativamente los costos de producción (Artola, 2002).

La definición de “Semilla Artificial” es “Embriones Somáticos” encapsulados o revestidos que se plantan y se tratan como semillas (Zaid et al., 2004).

Las semillas sintéticas, también denominadas semillas artificiales o semillas clonales, son estructuras vegetales de origen normalmente asexual, capaces de producir un vástago (brotes y ramificaciones aéreas) y una raíz (Retamal y Durán, 1989; citado por (González et al. 2004).

### **3.5 Biotecnología vegetal**

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

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que fue desarrollando para la investigación, multiplicación y mejoramiento de las plantas. Existen muchos investigadores que han aportado significativamente razón por la cual podemos entender mejor el cultivo de tejidos vegetales y su relación con otras áreas como la fisiología, bioquímica, morfogénesis, anatomía y otras así como contribuciones prácticas en la multiplicación y mejoramiento de las plantas. (Murillo, R., 2014).

Moderno conjunto de técnicas que utiliza sistemas biológicos vegetales para crear o modificar productos o procesos, para modernizar y mejorar la producción agrícola (Marza, s.f.).

Mendoza; citado por Monroy (2009), indica es el área de la ciencia y tecnología que utiliza organismos vivos o algunas de sus partes constituyentes, para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaria y/o industria. Tiene como objeto principal el aumento de la productividad de los vegetales, lo cual es indispensable para lograr un incremento en la producción de alimentos y otros productos producidos por las plantas. Las investigaciones se encuentran en producciones superiores, valor nutritivo más elevado, plantas más resistentes a las condiciones ambientales, plantas resistentes a plagas y enfermedades, conservación de la diversidad de las especies.

Conjunto de diferentes tecnologías moleculares tales como la manipulación y transferencia de genes, el tipo de ADN y la clonación de plantas y animales (FAO, 2004).

### **3.6 Cultivo de tejidos**

El cultivo *in vitro*, es el conjunto de técnicas y metodologías que permiten el cultivo de partes de una planta tales como órganos, tejidos, células o simples protoplastos en un recipiente que contienen sustancias nutritivas en condiciones de esterilidad y en un ambiente controlado. Esta técnica aprovecha la totipotencia de las células vegetales, o sea la capacidad de reproducir órganos como retoños y/o raíces, organogénesis, en un medio de cultivo favorable en un recipiente (Mendoza, 1994; citado por Villalba, 2003).

“*In vitro*” significa, sencillamente, “en vidrio”, porque durante las primeras etapas del proceso las plantas crecen en tubos de ensayo y matraces. Esta técnica se basa en la “totipotencia celular”, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo condiciones, dadas en el cultivo *in vitro* (Hewstone y Reyes, 2011).

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

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante estas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. (Murillo, R., 2014).

También se los conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio. Actualmente las primeras experiencias realizadas con el cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento

exitoso: la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plantas obtenidas se transfirieron a un medios de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias). (Murillo, R., 2014).

Según el CIAT (1991), define que es un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos células desprovistas de pared celular– células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

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

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con propiedades de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. (CATIE, 1994).

Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Se define el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con la cual se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfo genéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (CATIE, 1994).

### **3.6.1 Cultivo de células y tejidos**

El material de partida de los cultivos *in vitro* son los explantes, definición que se da a una parte de la planta con características de regeneración. Es por eso que los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la

planta, sin embargo la fuente inicial del material vegetal puede ser determinante para el éxito del establecimiento de un determinado cultivo, muchos autores sugieren comparar sistemáticamente varias fuentes de células y tejidos antes de decidirse por uno de ellos, sus pruebas preliminares garantizan el prendimiento del explante en los diferentes medios de cultivo utilizados como sustrato artificial. (Espinoza, R., 2013).

El éxito de cultivo de células y tejidos disminuye con el aumento de la edad de la planta, por eso se recomienda utilizar plantas jóvenes como fuentes de explantes, otro factor influyente es el tipo de la planta, por ejemplo los tejidos de plantas gimnospermas son más difíciles de cultivar que las angiospermas, por otro lado del material derivado de plantas dicotiledóneas puede cultivarse con más facilidad que las monocotiledóneas. (Espinoza, R., 2013).

El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe incluirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular. Un proceso de este tipo sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas y la formación de yemas adventicias. (Murillo, R., 2014).

No existen que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo* el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el arreglo de compuestos que emiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos se denominan reguladores de crecimiento, y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta. (Murillo, R., 2014).

### **3.6.2 Cultivo de órganos**

Este método fue uno de los primeros en poner en práctica, consiste en emplear explantes provenientes de raíces, tallos, hojas, embriones, anteras, meristemas y

otros. Entre los mencionados el cultivo de anteras, de embriones y de meristemos son muy importantes porque tienen una utilización frecuente en la propagación y mejoramiento genético. (Espinoza, R., 2013).

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

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

Entre los métodos para lograr la multiplicación de propágulos *in vitro*, la proliferación de yemas axilares posibilita la estabilidad genética en las plantas producidas y puede ser fácilmente establecida en la mayoría de las especies. Es el método que mayor popularidad ha alcanzado en los últimos años. (Murillo, R., 2014).

### **3.6.3 Cultivo de ápices y meristemo**

CORPOICA (2000), el cultivo de meristemos es una técnica que se utiliza para producir materiales libres de virus y otros patógenos. El meristemo es el punto de crecimiento de las yemas vegetales de las plantas, considerado libre de virus. El aislamiento del meristemo en condiciones asépticas y su posterior siembra en un medio de cultivo específico, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y

humedad relativa, permite el desarrollo de plánulas *in vitro*, después de seis a ocho semanas (semilla inicial).

El cultivo de meristemas tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no es afectada por estos patógenos vegetales. Otra muy importante es la multiplicación vegetal. La técnica permite también multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas), o acelerar la producción de plantas bianuales (Segretín, 2006).

Un meristemo está compuesto por células no especializadas que se dividen para formar nuevas células y tejidos. Por ello, las células que componen los meristemas suelen llamarse células embrionicas. Los meristemas que se encuentran en las partes terminales de las raíces, tallos y en las axilas formando las yemas axilares, se denomina en su conjunto meristemas apicales (Fontúrbel et al 2007).

La técnica de cultivo de meristemas es empleada para la obtención de plantas libres de patógenos y se fundamenta en el hecho de que la distribución de microorganismos como los virus, bacterias, micro plasmas y otros en los tejidos de la planta infectada no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo, por tanto las posibilidades de que las células del meristemo se encuentren mayor número de partículas o estén libres estas son mayores que en los tejidos más diferenciados de la planta. (Espinoza, R., 2013).

El termino cultivo de meristemas ha sido utilizado para designar a fragmentos o tejidos en un rango de 0.1 mm hasta 1mm, sin embargo para el cultivo aséptico y el saneamiento este término implica el aislamiento del domo meristemático mas es primer primordio foliar en un rango de 0.1-0.5 mm, a partir de este tamaño se considera cultivo de ápices. (Espinoza, R., 2013).

La técnica de cultivo de meristemas, como método de saneamiento, se fundamenta en la distribución no uniforme de los microorganismos (virus, bacterias, mico plasmas) en los tejidos de las plantas infectadas y su disminución progresiva hacia el ápice del tallo. Por tanto, son mayores las posibilidades que las células del

meristemo apical se encuentren libres de microorganismos, a diferencia de los tejidos más organizados de las plantas. (Murillo, R., 2014).

Esta técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática con 1-3 de los primordios foliares más jóvenes e implantarla en un medio de cultivo estéril, con el propósito de inducir la diferenciación de células y tejidos en plantas completas, mediante la utilización de medios de cultivo adecuados. (Murillo, R., 2014).

### **3.7 Explante**

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).

La selección de un adecuado explante inicial determina mejores resultados en la regeneración o formación de las plantas *in vitro*. La sección de tejido utilizada varía en dependencia de las características morfológicas de las diferentes especies, como regla general, se toman las yemas del tallo principal y de los brotes axilares de las plantas. (Murillo, R., 2014).

Existen especies donde pueden utilizarse diferentes partes vegetativas como material inicial, por ejemplo en papa (*Solanum tuberosum* sp.) se utilizan las yemas brotadas de los tubérculos o las yemas apicales y axilares de plantas completas. Sin embargo los mejores resultados se obtienen al tomar las yemas de tubérculos brotados, por facilitarse su desinfección y manejo, con el 56,6 por ciento de regeneración de meristemas de 0.1 a 0.4 mm. (Murillo, R., 2014).

Los explantes en crecimiento que tienen su zona de tejido cubierto son más fáciles de desinfectar que los explantes de plantas adultas o plantas perennes. El tamaño del explante es otro factor que influye en la desinfección y regeneración de plantas, si el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración mientras que con el aumento del tamaño del explante hay ms

contaminación y el crecimiento y la regeneración de plantas es más rápida. (Espinoza, R., 2013).

### **3.8 Medio de cultivo**

Según Rodríguez (1999), el medio de cultivo se compone de sales minerales, las cuales remplazan a los fertilizantes además de sustancias orgánicas como los azúcares (fuentes de carbono), vitaminas (complejo B) y hormonas de crecimiento (auxinas que estimulan el crecimiento de las raíces y las citocininas que inducen el crecimiento de la parte aérea o el vástago).

Roca y Mroginski (1991), afirman que el éxito del cultivo de tejidos depende de la composición química del medio de cultivo y de su estado físico. En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

a) Carbono b) Nutrientes minerales c) Vitaminas d) Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos) e) Sustancias reguladoras de crecimiento f) Otros compuestos

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento. Ocasionalmente con otras sustancias y gelificando generalmente con agar. También se pueden encontrar variantes de acuerdo a la etapa de propagación, específicamente para la multiplicación (Sandoval, 2001).

Se da el nombre de medio de cultivo al sustrato artificial de composición completa, utilizando para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. (Espinoza, R., 2013).

El medio de cultivo permite que de forma artificial y bajo condiciones estériles puedan vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen. Los medios de cultivo contienen macronutrientes, micronutrientes además de carbohidratos, usualmente la sacarosa puede reemplazar el carbono que la planta normalmente fija en la atmósfera por medio de la fotosíntesis y compuestos

orgánicos en pequeñas cantidades como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. (Espinoza, R., 2013).

Estos componentes del medio de cultivo se clasifican en: Sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales, material de soporte (estado físico). (Espinoza, R., 2013).

Los medios de cultivo deben ser preparados con sumo cuidado, ya que los diversos productos que lo conforman intervienen en cantidades pequeñas. Un adecuado medio de cultivo debe tener sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos y otros elementos inorgánicos los que varían ampliamente respecto a su composición y concentración. Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: Sales inorgánicas, Compuestos orgánicos, Complejos naturales y Materiales inertes de soporte. (Murillo, R., 2014).

### **3.8.1 Composición del medio de cultivo**

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

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).

#### **a) Sales inorgánicas o minerales**

Barba (2001), indica que se dividen en macro y micronutrientes, esta división se basa en la cantidad que absorben las plantas ciertos elementos: calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fosforo y azufre son requeridos por la planta en grandes cantidades (g/l) y se les llama macronutrientes. Otros como el hierro, manganeso, boro, cobre, zinc,

molibdeno y cloro, se requieren en pequeñas cantidades en pequeñas cantidades (mg/l o ppm) y se llaman elementos traza o micronutriente.

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

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

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

La fórmula de Murashige y Skoog (1962), es la que se utiliza con mayor frecuencia, pues ha demostrado que es medio adecuado para una gran variedad de especies así como para diferentes partes de una planta. (Murillo, R., 2014).

## **b) Compuestos orgánicos**

Según Hurtado y Merino (1997), se clasifica en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

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

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

### **c) Fuentes de Carbono**

Hurtado y merino (1997), indica que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3 por ciento; sin embargo en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12 por ciento). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivo de monocotiledóneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

Mendoza (2007), indica que intervienen en el crecimiento, metabolismo y estructura de los vegetales.

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

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4 por ciento. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa, almidón, lactosa, maltosa, sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados. (Murillo, R., 2014).

### **d) Reguladores de crecimiento**

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

Pierik (1990), en el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante, se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores. De acuerdo con Hurtado y Merino (1997), actualmente los reguladores de crecimiento están bien agrupadas y divididas en: promotores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), inhibidores de Crecimiento (ácido abscísico) y etileno.

Las auxinas y las citocininas son las fitohormonas que tienen esencial importancia en el cultivo de tejidos y células de las plantas, sin embargo son consideradas también reguladores de crecimiento las giberelinas y el ácido abscísico. (Espinoza, R., 2013).

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

#### ❖ Auxinas

Espinoza (2013), indica que las auxinas ayudan a la elongación de las células, entre ellas tenemos la auxina natural AIA (Ácido indolacético) y las auxinas artificiales ANA (Ácido naftalenacético), IBA (Ácido indolbutírico), PCPA (Ácido p-clorofenoxiacético), 2,4-D (Diclofenoxiacético) siendo esta la más importante y mundialmente usado en los medios de cultivo para células y tejidos con finalidad de obtener callos porque ocasiona un crecimiento desorganizado en las células y el más débil es el AIA por que fácilmente es inactivado por la luz, los tejidos con alta actividad y es considerado un compuesto termolábil porque reacciona con temperaturas altas.

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

Murillo (2014), indica que las auxinas se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen

movimiento basipétalo (descendente), estimula la división celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias. Promueve el enraizamiento, tiene efecto en la síntesis de enzimas del ARN, de proteínas y en la permeabilidad celular. La actividad de las auxinas en el medio es degradada por las bacterias.

La concentración de las auxinas utilizadas varía desde 0.1-10 mg/l, siendo el rango más empleado el comprendido entre 0.25-3 mg/l. la actividad auxinica en células cultivadas se considera de la siguiente manera: 2,4-D>ANA>AIB>AIA. (Murillo, R., 2014).

### ❖ **Citocininas**

Son consideradas citocininas aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular citocinesis. (Espinoza, R., 2013).

Casi todas las citocininas son sintéticas y derivadas de la adenina dentro de este grupo se encuentran las kinetina (6-furfuril amino-purina), BAP (6 benzil aminopurina), 2ip (6 dimetil alil purina) y la zeatina (6(hidroxi. 3 metil, 2 bunetil) adenina, esta última es considerada citocinina natural porque es extraída del endospermo del maíz. La citocininas realizan su efecto incrementando la división celular, dicha acción está relacionado con la presencia de auxinas. (Espinoza, R., 2013).

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

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

### **e) Vitaminas y aminoácidos**

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las vitaminas más usadas son: la vitamina B1, es la vitamina más usada por ser esencial en los medios de cultivo para la micropropagación de plantas, se añade como Tiamina HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. (Espinoza, R., 2013).

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

López (1990), ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio.

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

### **f) Materiales inertes de soporte**

Desde hace mucho tiempo atrás, los medios de cultivo han sido gelificados con agar, un compuesto extraído de algas marinas del género *Gelidium*. El agar se ha convertido en el material de soporte más ampliamente usado, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como explante. Sin embargo fisiológicamente no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento, la concentración de dichas sustancias está determinada generalmente por la calidad del agar, este añadido al medio de concentraciones de 6 a 9 g/l para medios sólidos y 2 a 4 g/l para medios semisólidos. (Espinoza, R., 2013).

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

### 3.9 Giberelinas

Otro regulador de crecimiento es el Ácido Giberélico ( $AG_3$ ), aunque no tiene un uso tan amplio pero si es esencial en el cultivo de meristemos en algunas especies de plantas como la micropropagación con medios líquidos de vitroplantas de papa, banano, piña y totora. (Espinoza, R., 2013).

Este compuesto es recomendado para la regeneración de las plantas. Su principal acción del Ácido Giberélico es ayudar a la elongación de las vitroplantas y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado. (Espinoza, R., 2013).

En la planta son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelinas. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El Ácido Giberélico ( $AG_3$ ), es el más frecuente empleado en el cultivo *in vitro*. Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar como las de estas, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa. (Murillo, R., 2014).

División y elongación celular, crecimiento de longitud de la raíz principal e inhibición de la ramificación radical y promueve germinación de semillas. (INTAGRI, 2017).

La adición de 1,0 mg/L. de ácido giberélico en el medio de cultivo, constituye una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta. (Jiménez, 2009).

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. Esta

hormona induce el crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y el adulto, inducción a la floración y la determinación sexual de la flor, inducción de la germinación además de promover la elongación internodal. (Sandoval, 2001).

### **3.10 Micropropagación**

Según el INTA (2010), la micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados.

Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* (CIAT, 1991).

La propagación vegetativa *in vitro*, también denominada micropropagación, es la aplicación más completa del cultivo de tejidos, de la mayor impacto y el más ampliamente utilizado en todos los laboratorios de biotecnología vegetal. Consiste en producir plantas conformes a la planta madre por las estimulaciones de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie por la inducción de una nueva organogénesis de brotes y raíces. La micropropagación aplicación en la multiplicación rápida de variedades nuevas o introducidas recientemente, o en aquellas especies que tienen un bajo porcentaje de reproducción, también es usado ampliamente en programas de mejoramiento genético. (Espinoza, R., 2013).

Se entiende por micropropagación cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la

propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. (Murillo, R., 2014).

Este procedimiento implica que cada una de las plántulas que se produzcan pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de que se deriva. (Murillo, R., 2014).

### **3.10.1 Ventajas de la micropropagación**

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

#### **❖ Mayor rapidez en la introducción de productos**

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

#### **❖ Mayor calidad del producto**

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

#### **❖ Mayor facilidad en la comercialización**

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

### **3.10.2 Factores limitantes de la micropropagación**

#### **❖ Costo de producción relativamente alto**

La micropropagación aún requiere de un alto componente de mano de obra altamente calificada. Por tanto los costos en muchas especies son más altos que los

de métodos convencionales como la producción de esquejes y la propagación por semillas. La mano de obra puede representar hasta un 70 por ciento del costo final, la producción en países con mano de obra más barata es solo una solución temporal, se necesitan métodos con costos reducidos.

#### ❖ **Aparición de plantas fuera de tipo**

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

#### ❖ **No es aplicable a todos los cultivos**

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

### **3.11 Fases de la micropropagación**

Para tener buenos resultados en el proceso de la micropropagación depende del control de un gran número de variables, no solamente de la composición de medio de cultivo como normalmente se cree sino también del material vegetal, de manipuleo desde el aislamiento del explante inicial hasta el transporte de la planta. Esta manipulación incluye el manejo de la planta madre, las características del explante utilizado, el procedimiento del cultivo adoptado, las condiciones ambientales y micro ambientales dentro del frasco de cultivo y el trasplante. (Espinoza, R., 2013).

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

### **3.11.1 Fase 0 Selección de materiales vegetales**

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

Inicialmente esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban convenientemente en la Fase I (Debergh y Maene, 1981). (Murillo, R., 2014).

Sin embargo en la actualidad existe un consenso de que esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético. (Murillo, R., 2014).

### **3.11.2 Fase I Establecimiento**

El objetivo de esta fase es obtener un cultivo aséptico de la especie que se requiere multiplicar, el establecimiento incluye la desinfección y siembra del explante en condiciones asépticas en medios de cultivo, esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación visibles y suficientemente adaptadas a las condiciones *in vitro* de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de fitoreguladores en la fase siguiente. (Espinoza, R., 2013).

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

### **3.11.3 Fase II Multiplicación**

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 sub cultivadas nuevamente y así sucesivamente hasta tener tantos miles de plantas *in vitro* como se hayan planeado. (Pérez, 1998).

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

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

### **3.11.4 Fase III Enraizamiento**

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 rizo génica, se procede al enraizamiento de los propágulos para la obtención de plantas completas; dura de 2 a 4 semanas. (Hurtado M., 1994)

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta formar plantas completas y desarrollan un sistema radicular que les permite ser trasplantadas a un sustrato, pero no siempre esta fase es llevada a condiciones *in vitro*, existe las posibilidad de hacerlo en recipientes con sustratos en condiciones de

laboratorio, sumergiendo los brotes antes de trasplantar en una solución enraizadora. (Espinoza, R., 2013).

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

#### **3.11.5 Fase IV Aclimatación**

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)

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

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

#### **3.11.6 Semilla pre-básica**

Entre los insumos para la producción de papa, la semilla es el más importante, ésta se produce generalmente en zonas altas, siendo el departamento de Cochabamba el primer productor y consumidor de semilla certificada de papa (Guidi y Mamani, 2001).

El proceso de producción de semilla de papa de calidad empieza en el laboratorio, multiplicando plantas libres de patógenos, luego pasan a invernaderos donde las plántulas se tienen que multiplicar en sustratos estériles para obtener la semilla pre básica. Luego estos se multiplican en campo para obtener la semilla básica y otras categorías de semilla de acuerdo al grado de sanidad y la legislación de cada país.

Según Mariscal (2000), la semilla pre-básica es producida por instituciones registradas, además deben de provenir de cultivo de tejidos, ser producidos en invernaderos aprueba de áfidos con un sistema de esterilización de suelos y contar con pruebas para el control fitosanitario.

Las categorías reconocidas en la producción de semilla certificada de papa son: genética, pre-básica, básica, registrada y certificada. De estos, la semilla pre-básica es resultante de la multiplicación de la semilla genética. Esta categoría está destinada para semillas de aquellas especies que por su naturaleza requieren de una multiplicación vegetativa mediante el cultivo de tejidos (Polar, 2001).

Para el Programa Nacional de Semillas (PNS), resumido en la memoria del Lanzamiento del Año Internacional de la Papa en Bolivia, (2008) los volúmenes de producción de semilla certificada se incrementaron de 6.980 TM en 1987 hasta volúmenes superiores de 57.736,96 TM en los últimos años.

Según información procesada por Murillo (2012), en Bolivia se utiliza solo el 3por ciento de semilla certificada de papa para la producción. En ese sentido, se considera que una alternativa para producir semilla pre-básica de papa de alta calidad genética y fitosanitaria es a través de las técnicas de propagación *in vitro* que facilitan la producción masiva en un espacio reducido y en corto tiempo.

## **4 LOCALIZACIÓN**

### **4.1 Ubicación Geográfica**

La presente investigación se realizó en ambientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San

Andrés (UMSA), ubicado a una altura aproximada de 3650 msnm, geográficamente situada entre los paralelos 16°30'00" latitud Sur, y 68°08'00" Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich.(Soliz, 2004).

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Material Experimental**

#### **5.1.1 Material Vegetal**

El material vegetal utilizado, fueron tubérculos de *Solanum tuberosum* sp, variedad Huaycha, de gran aceptación en mercados regionales, las cuales se obtuvieron de la provincia Ayopaya del departamento de Cochabamba.

Según Huasco, (2000); Merino, (2004); Mena, (2005) y Mamani, (2006); las características morfo-agronómicas de la variedad en estudio son las siguientes:

**Color de flor:** Lila con rojo morado

**Forma del tubérculo:** Redondo con ojos profundos 40

**Color de la piel:** Rojo con áreas de color amarillo alrededor de los ojos

**Color de la pulpa:** Crema

**Ciclo vegetativo:** Semi-tardío (150 -160 días)

**Zonas de cultivo:** Se adapta de los Andes al Sub - trópico

**Adaptación:** Muy productiva

#### **5.1.2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal Facultad de Agronomía UMSA**

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

**a) Área de lavado:** Destinado a limpieza de instrumental, frascos, recipientes, material vegetal; Provista de mesones, lavaderos de acero, bañadores de plástico y destilador de agua.

**b) Área de preparación de medio de cultivo y esterilización:** Establecida para preparar medios de cultivo, equipada con estantes para almacenar reactivos químicos, materiales de vidrio; cuenta con mesones para la preparación de medios.

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

**d) Área de incubación:** Los cultivos *in vitro* se incuban en una sala que provee condiciones ambientales mínimamente requeridas, llegando a tener una temperatura promedio 28°C y humedad relativa 60 por ciento .

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

### 5.1.3 Equipos y Materiales de laboratorio

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

**b) Materiales de vidrio:** Pipetas graduadas (10,25 ml), probetas (250 ml), vasitos de vidrio cocteleros (40x80mm), placas petrí, vaso de precipitación (1000 ml), varilla de vidrio.

**c) Instrumental de disección e implementos de laboratorio:** Hojas de bisturí (N° 20), mangos para bisturí, pinzas largas, tijeras, mechero de alcohol, bandeja de metal, papel aluminio, papel toalla, plastifilm.

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

#### **5.1.4 Reactivos químicos**

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

**b) Reguladores de crecimiento:** Acido Giberélico (AG)<sup>3</sup>.

**c) Reactivos:** Hidróxido de sodio (NaOH al 1N), ácido clorhídrico (HCl al 1N), agua destilada, alcohol etílico al 70 por ciento y 96 por ciento (v/v), hipoclorito de sodio (NaClO) 3 por ciento (p/v), agar 50 por ciento, sacarosa 2 por ciento (p/v).

#### **5.1.5 Materiales de gabinete**

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

### **5.2 Metodología**

#### **5.2.1 Obtención de Material**

Para la obtención de meristemos de la variedad Huaycha, se seleccionaron tubérculos obtenidos en campo que no presentaron ningún síntoma de enfermedad. Se almacenaron en una incubadora 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 60 vitroplantas de la variedad Huaycha con una altura promedio de 6.5 y 7.5 cm. En la preparación del medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962), no se adiciono auxinas, citocininas ni giberelinas para la obtención de vitroplantas de los meristemos y en los sub cultivos de los explantes.

## **5.2.2 Procedimiento Experimental**

Se efectuaron ensayos preliminares, que abarcaran desde realización de pruebas piloto, adecuación del laboratorio, instrumental y material vegetal; la investigación se dividió en etapas para su análisis.

## **5.2.3 Etapa 0 Tratamiento del material vegetal**

La priorización de tubérculos madre de la variedad Huaycha (*Solanum tuberosum* sp.), se basó en la selección por condiciones físicas y estado de sanidad óptima (síntoma de contaminación fúngica, bacteriana), presencia de rugosidades, daños físicos u otro aspecto no deseable que influya en la obtención de brotes de buena calidad.

El material vegetal (tubérculos madre) seleccionado, se lavó con agua corriente para eliminar restos de sustratos y materia orgánica.

## **5.2.4 Etapa I Establecimiento del material vegetal a condiciones *in vitro***

### **5.2.4.1 Preparación del medio de cultivo**

El medio base Murashige y Skoog (1962), es ampliamente utilizado en los laboratorios de producción de plántulas de papa; las concentraciones de sales y vitaminas que contiene son las adecuadas para su normal crecimiento de las plántulas en condiciones *in vitro* (CIP, 1998).

De acuerdo al requerimiento de medio de cultivo para la investigación, se formuló soluciones stock, donde los nutrimentos están dispuestos en altas concentraciones.

Se pesó el medio basal Murashige y Skoog (1962), no se adicionó reguladores de crecimiento.

#### **5.2.4.2 Desinfección y establecimiento a condiciones *in vitro* del material vegetal**

En condiciones asépticas, se procedió seccionar los brotes desarrollados por los tubérculos, de una longitud aproximada de 20 mm, los explantes fueron sometidos a desinfección externa mediante inmersión en alcohol al 70 por ciento por diez segundos y en una solución de hipoclorito de sodio al 3 por ciento por diez minutos. Para eliminar residuos de los agentes desinfectantes, que poseen efectos oxidativos en los explantes, se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril.

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

Cada explante fue sembrado en un vaso que contenía 15 ml de medio básico MS (fuente de carbono + nutrimentos minerales + vitaminas), una vez sembrados los explantes en los vasos, fueron sellados con plastifilm, se registró la variedad y fecha de la actividad, transfiriéndolos inmediatamente a sala de crecimiento o incubación que cuenta con ambientes controlados.

#### **5.2.4.3 Análisis estadístico**

Para la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*, se procedió con el análisis estadístico descriptivo de una muestra de 40 vitroplantas escogidas completamente al azar de una población total de 60 vitroplantas.

#### **5.2.4.4 Periodos de evaluación**

Las evaluaciones y análisis de datos fueron realizados; para las variables supervivencia, contaminación y oxidación a cinco días, después de iniciarse la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

#### 5.2.4.5 Variables de respuesta

Las variables de respuesta consideradas en la etapa establecimiento a condiciones *in vitro*, fueron priorizadas bajo el siguiente detalle:

**a) Porcentaje de supervivencia:** Expresa el número de vitroplantas que lograron desarrollar favorablemente en porcentajes, la relación refiere a número de plántulas desarrolladas entre el número de vitroplantas totales por cien.

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

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

**d) Altura de vitro planta :** Expresa el desarrollo longitudinal alcanzado medido en milímetros (mm), datos tomados desde inicio del vástago hasta el ápice, la evaluación se realizó, cada dos días después de la siembra durante cuatro semanas.

#### 5.2.5 Etapa II Micropropagación de vitroplantas

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

Los vasos fueron abiertos extrayendo las plántulas, colocándolas en placas petrí, aislando segmentos uninodales provistos de yema más una hoja, tomando en cuenta las partes apicales, medios y basales de la plántula, con la finalidad de evaluar desarrollo de las vitroplantas.

Las vitroplantas fueron micro propagadas y sembradas a razón de un segmento uninodal por vaso, que contenía 15 ml de medio basal MS (Murashige y Skoog,

1962) y distintas concentraciones de AG3; finalmente fueron sellados con plastifilm, en posición vertical y en sentido del desarrollo de la vitroplantas, debiendo quedar el meristemo y la hoja encima del medio basal.

#### **5.2.5.1 Preparación del medio de cultivo**

- ❖ Para preparar 2000 ml (aproximadamente 500 ml por tratamiento) de medio, se realizó la siguiente actividad:
- ❖ Se disolvió y mezcló el medio basal Murashige y Skoog 1962. En un vaso de precipitado previamente lavado y enjuagado.
- ❖ Posteriormente se agregó sacarosa (azúcar comercial) en cantidades, según concentración 3 por ciento (p/v).
- ❖ Se añadió el regulador de crecimiento Acido Giberélico (AG3) en sus diferentes concentraciones (0,0.5, 1, 1,5 mg/l) según tratamiento.
- ❖ Se enrazó el volumen a 500 ml por tratamiento, con agua destilada.
- ❖ El pH de los medios se ajustó a 5.7 (elevar con hidróxido de sodio NaOH al 1N).
- ❖ Añadir g de agar como agente gelificante, con la finalidad de formar un medio en estado semisólido.
- ❖ Se disolvió el agente gelificante en horno microondas, agitar el vaso de precipitados hasta que el agar se disuelva, obteniendo una solución homogénea, evitando que hierva.
- ❖ Se distribuyó 15 ml del medio de inducción *in vitro*, por cada vaso de vidrio, previamente lavado y esterilizado.
- ❖ Se procedió a sellar los frascos de cultivo con papel aluminio y sujetos por banditas elásticas (parafilm).
- ❖ La esterilización del medio, fue por vapor bajo presión (autoclave) a 121 °C y 15 libras de presión, durante 10 minutos.

#### **5.2.5.2 Siembra en medio de cultivo**

- ❖ Se procedió a seccionar segmentos uninodales de las vitroplantas (apical, medio y basal) propagadas en la etapa de establecimiento y micropropagación, se seleccionaron las mejores vitroplantas, suprimiendo plántulas ahiladas que

desarrollaron un escaso crecimiento longitudinal, descartando plántulas afectadas por vitrificación; se introdujo un segmento nodal por vaso de vidrio, tomando en cuenta que para cada tratamiento cada vaso de vidrio contenía 15 ml del medio que contenía Acido Giberélico (AG3) en sus diferentes concentraciones (0,0.5, 1, 1,5 mg/l) según tratamiento.

- ❖ Una vez realizadas las siembras de los explantes en medios de inducción a tuberización *in vitro*, se selló con plastifilm; previo flameo de los frascos, debidamente etiquetadas, transfiriéndolos inmediatamente a sala de crecimiento o incubación, que cuenta con ambientes controladas mínimamente requeridos con temperatura 27 °C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad (fotoperiodo largo).
- ❖ Las vitroplantas fueron incubadas en tres regímenes de fotoperiodo, treinta días en fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), que favorece el desarrollo *in vitro* de gran cantidad de especies.

### **5.2.5.3 Análisis estadístico**

Para la etapa micropropagación *in vitro*, se procedió con el análisis estadístico descriptivo, una muestra de 120 vitroplantas; la población total durante la micropropagación estaba comprendida por 60 vitroplantas, de las cuales se escogieron las mejores 40 muestras.

### **5.2.5.4 Periodos de evaluación**

Las evaluaciones y análisis de datos fueron realizados; para la variable altura de vitro planta, número de hojas, número de raíces, presencia de vitrificación a tres semanas y para las variables supervivencia, contaminación, oxidación a cinco días, después de iniciarse la etapa de micropropagación.

### **5.2.5.5 Variables de respuesta**

Las variables de respuesta consideradas en la etapa de micropropagación *in vitro* fueron priorizada bajo el siguiente detalle:

- a) **Porcentaje de supervivencia:** Expresa el número de explantes que lograron expresar su totipotencia favorablemente.
- b) **Porcentaje de contaminación:** Expresa el número de vitroplantas contaminadas en porcentajes, el fenómeno se da por presencia de bacterias, hongos o algún agente contaminante externo.
- c) **Altura de vitroplantas:** Definido por el desarrollo longitudinal de las plántulas, mediciones tomadas con una regla en milímetro (mm).
- d) **Número de hojas de planta:** Definido por el desarrollo longitudinal de la planta, con un número de hojas.
- e) **Número de nudos de raíces:** Definido por el número de raíces desarrolladas por cada vitro planta
- f) **Porcentaje de oxidación:** Expresa el número de explantes que presentaron coloración oscura.

#### **5.2.5.6 Fotoperiodos que favorecen la tuberización *in vitro***

El fotoperiodo que se tomó en cuenta fue: 16 Hr. luz / 8 oscuridad ya que favorece el desarrollo longitudinal de los explantes y a las raíces.

#### **5.2.5.7 Diseño experimental**

(Ochoa, 2007) El Diseño Experimental empleado en la investigación, durante la etapa de multiplicación *in vitro* fue Completamente al Azar, con arreglo bi factorial y diez repeticiones por tratamiento, los factores (3x4) de estudio son tipo de explantes (apical, medio y basal) y concentración de Ácido Giberélico (AG3) en sus diferentes concentraciones (0,0.5, 1, 1,5 mg/l) según tratamiento.

### 5.2.6 Modelo Lineal Aditivo

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

$Y_{ij}$  = Observación cualquiera

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto i-ésimo nivel del factor tipo de explante

$\beta_j$  = Efecto del j-ésimo nivel del factor concentración de  $AG_3$

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Interacción del i –ésimo nivel del factor tipo de explante con el j-ésimo nivel del factor concentración de  $AG_3$

$\epsilon_{ijk}$  = Error Experimental.

#### 5.2.6.1 Factores

**Cuadro 1.** Factores y niveles de estudio

Factores y niveles de estudio	
Factor A (Tipo de explante)	Factor B (Concentración de $AG_3$ )
$a_1 = Apical$	$b_0 = 0mg/l$
$a_2 = Medio$	$b_1 = 0.5 mg/l$
$a_3 = Basal$	$b_2 = 1.0 mg/l$
	$b_3 = 1.5mg/l$

En el Cuadro 1 se observa los factores de estudio los cuales son: tres tipos de explantes representados por el Factor A y distintas concentraciones de  $AG_3$  representados por el factor B.

### 5.2.6.2 Combinación factorial

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales

Tratamiento Combinados		
Tratamientos	Combinación	Descripción
		Tipo de explante x concentración de $AG_3$
$T_1$	$a_1b_0$	Explante apical x $0\text{ mg/l}AG_3$
$T_2$	$a_1b_1$	Explante apical x $0.5\text{ mg/l}AG_3$
$T_3$	$a_1b_2$	Explante apical x $1.0\text{ mg/l}AG_3$
$T_4$	$a_1b_3$	Explante apical x $1.5\text{ mg/l}AG_3$
$T_5$	$a_2b_0$	Explante medio x $0\text{ mg/l}AG_3$
$T_6$	$a_2b_1$	Explante medio x $0.5\text{ mg/l}AG_3$
$T_7$	$a_2b_2$	Explante medio x $1.0\text{ mg/l}AG_3$
$T_8$	$a_2b_3$	Explante medio x $1.5\text{ mg/l}AG_3$
$T_9$	$a_3b_0$	Explante basal x $0\text{ mg/l}AG_3$
$T_{10}$	$a_3b_1$	Explante basal x $0.5\text{ mg/l}AG_3$
$T_{11}$	$a_3b_2$	Explante basal x $1.0\text{ mg/l}AG_3$
$T_{12}$	$a_3b_3$	Explante basal x $1.5\text{ mg/l}AG_3$

### 5.2.6.3 Factores de variación

Los criterios de selección del factor A (tipos de explante) y factor B (niveles de concentración de Ácido Giberélico ( $AG_3$ ) en sus diferentes concentraciones (0,0.5, 1, 1.5 mg/l)), están determinadas por investigaciones de evaluación de diferentes combinaciones de fitohormonas en la regeneración de *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*) que presentan óptimos resultados con dichas concentraciones.

### 5.2.6.4 Variables de respuesta

Los resultados obtenidos fueron evaluados en forma semanal durante tres semanas, en función a las siguientes variables de respuesta:

a) **Porcentaje de supervivencia:** Se identificó el número total de vitroplantas que lograron desarrollarse, (detectando su crecimiento) este valor se expresó en porcentaje.



**Figura 1.** Comparación de vitroplantas para determinar supervivencia.

En la Figura 2 se observa vitroplantas que no llegaron a desarrollarse en comparación a una muestra la cual tiene diferencia en tamaño, número de hojas y raíces.

**Cuadro 3.** Porcentaje de sobrevivencia en la etapa de micropropagación Factor A: Explante.

FACTOR A TIPO DE EXPLANTES	VITROPLANTAS MUERTAS	VITROPLANTAS VIVAS	TOTAL	VITROPLANTAS MUERTAS (%)
APICAL	1	39	40	2,5
BASAL	5	35	40	12,5
MEDIO	4	36	40	10
<b>Total</b>	10	110	120	25

En el cuadro 3 se observa que el porcentaje de sobrevivencia es de 75 por ciento dando un 25 por ciento de vitroplantas muertas, en el factor A con los tres tipos de explantes de un total de 120 vitroplantas en estudio.

**Cuadro 4.** Porcentaje de sobrevivencia en la etapa de micropropagación Factor B: Concentraciones de (**AG<sub>3</sub>**).

FACTOR B CONCENTRACION DE AG3	VITROPLANTAS MUERTAS	VITROPLANTAS VIVAS	TOTAL	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA (%)
AG30	3	27	30	10
AG30,5	3	27	30	10
AG31	4	26	30	13,33333333
AG31,5	0	30	30	0
<b>Total</b>	10	110	120	33.3

En el cuadro 4 se observa que el porcentaje de sobrevivencia es de 66.7 por ciento dando un 33.3 por ciento de vitroplantas muertas, en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 120 vitroplantas en estudio.

**a) Porcentaje de contaminación:** Se identificó el número total de vitroplantas contaminadas (presencia de hongos y /o bacterias) este valor se expresó en porcentaje.



**Figura 2.** Vitroplantas contaminadas con bacterias.

En la Figura 3 se observa vitroplantas contaminadas con bacterias las cuales presentan un color blanquecino.

**Cuadro 5.** Porcentaje de contaminación en la etapa de micropropagación. Factor A: Explante.

FACTOR A	VITROPLANTAS SIN CONTAMINACION	VITROPLANTAS CONTAMINADAS	TOTAL DE VITROPLANTAS	PORCENTAJE DE CONTAMINACION (%)
APICAL	37	3	40	7.5
BASAL	38	2	40	5
MEDIO	37	3	40	7.5
<b>Total</b>	112	8	120	15.5

En el cuadro 5 se observa que el porcentaje de vitroplantas no contaminadas es de 84.5por ciento dando un 15.5por ciento de vitroplantas contaminadas, en el factor A con los tres tipos de explantes de un total de 120 vitroplantas en estudio.

**Cuadro 6.** Porcentaje de contaminación en la etapa de micropropagación. Factor B: Concentraciones de ( $AG_3$ ).

FACTOR B	VITROPLANTAS SIN CONTAMINACION	VITROPLANTAS CONTAMINADAS	TOTAL DE VITROPLANTAS	PORCENTAJE DE CONTAMINACION (%)
AG30	29	1	30	3.33
AG30,5	28	2	30	6.66
AG31	28	2	30	6.66
AG31,5	27	3	30	10
<b>Total</b>	112	8	120	26.65

En el cuadro 6 se observa que el porcentaje de sobrevivencia es de 66.7 por ciento dando un 33.3 por ciento de vitroplantas muertas, en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 120 vitroplantas en estudio.

**b) Porcentaje de oxidación:** Se identificó el número total de vitroplantas contaminadas (presencia de hongos y /o bacterias) este valor se expresó en porcentaje.



**Figura 3 .**Vitroplantas sin presencia de oxidación.

En la Figura 4 se observa que las vitroplantas no presentaron oxidación por tanto el porcentaje de oxidación fue de 0 por ciento.

**Cuadro 7.**Porcentaje de oxidación en la etapa de micropropagación. Factor A: Explante.

FACTOR A	VITROPLANTAS OXIDACION	VITROPLANTAS OXIDADAS	TOTAL DE VITROPLANTAS	PORCENTAJE DE OXIDACION (%)
APICAL	40	0	40	0
BASAL	40	0	40	0
MEDIO	40	0	40	0
<b>Total</b>	120	0	120	0

En el cuadro 7 se observa que el porcentaje de vitroplantas oxidadas es de 0 por ciento en el factor A con los tres tipos de explantes de un total de 120 vitroplantas en

estudio, lo que nos indica que en el cultivo de papa variedad Huaycha no presenta oxidación.

**Cuadro 8.** Porcentaje de oxidación en la etapa de micropropagación. Factor B: Concentraciones de (**AG<sub>3</sub>**).

FACTOR B	VITROPLANTAS SIN OXIDACION	VITROPLANTAS OXIDADAS	TOTAL DE VITROPLANTAS	PORCENTAJE DE OXIDACION (%)
AG30	30	0	30	0
AG30,5	30	0	30	0
AG31	30	0	30	0
AG31,5	30	0	30	0
<b>Total</b>	120	0	120	0

En el cuadro 8 se observa que el porcentaje de oxidación es de 0 por ciento en el factor B con las 4 concentraciones, de un total de 120 vitroplantas en estudio, esto indica que si el medio de cultivo presenta alguna giberelina este no influye en la oxidación.

**c) Altura del explante:** Se midió el largo de cada vitroplanta desde la base terminal del tallo emergente del medio de cultivo, hasta el final de la hoja más alta, expresado en milímetros.



**Figura 4.** Altura de vitroplanta registrada cada 2 días

En la figura 5 se observa cómo se midió la altura de cada vitro planta con la ayuda de una regla.

**d) Número de hojas:** Evaluado por conteo directo, indica el número de hojas presente en cada vitro planta.



**Figura 5.** Número de hojas presentes en vitroplantas

En la Figura 6 se observa como de desarrollaron las hojas por cada vitro planta cuantificando de forma directa.

**e) Número de raíces:** Evaluadas por observación directa de la vitroplanta emergente del explante, se cuantifico las raíces cada semana.



**Figura 6.** Formación de raíces a partir del explante sembrado registrada cada 2 días.

En la figura 7 se observa la cantidad de raíces que formaron las vitroplantas con los tratamientos utilizados.

## **6 RESULTADOS Y DISCUSIONES**

El trabajo realizado con las variedad de papa Huaycha y los diferentes tipos de explante apical, medio y basal y concentraciones de AG3 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 variedad.

Debido a que los coeficientes de variación (CV) en el análisis de varianza (ANVA) para las variables de respuesta tenían valores altos, y estos estaban fuera de una curva normal se realizó la transformación de los datos utilizando transformación raíz cuadrada.

Los datos obtenidos en altura de la planta, número de hojas y número de raíces, fueron analizados por medio del programa estadístico INFOSTAT, Software Estadístico versión 2009, se aplicó una prueba de Duncan al (5 por ciento). Realizando antes la transformación de datos usando al formula  $\sqrt{x+1}$ , debido a que algunos parámetros observados eran cero "0" en las variables de respuesta altura de la planta, número de hojas y número de raíces.

### **6.1 Establecimiento**

Obtenidas las vitroplantas se procedió a la multiplicación en medio de cultivo sólido. De las 40 vitroplantas cultivadas se obtuvieron explantes apical, medios y basales, para luego estas introducir las en el medio en estudio.

### 6.1.1 Altura de la planta

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para la altura de la vitroplanta

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F	p-valor
FACTOR A (Tipo de explante)	3,36	2	1,68	61,58	<0,0001**
FACTOR B (concentraciones de $AG_3$ )	14,50	3	4,83	177,29	<0,0001**
FACTOR A*B	0,06	6	0,01	0,39	0,8846 NS
ERROR	2,94	108	0,03		
TOTAL	20,87	119			

Coefficiente de Variabilidad= 7,04

N.S.= No significativo

\*= significativo

\*\*= Altamente significativo

Una vez realizado el análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 6 que al nivel 5 por ciento existe diferencia altamente significativa en los tres tipos de explantes (factor a) en relación a la altura de la vitroplanta.

Al nivel del 5 por ciento existe diferencia altamente significativa para las distintas concentraciones de  $AG_3$  (factor b) en relación a la altura de las vitroplantas.

Al nivel de 5 por ciento no existe significancia entre la interacción de los dos factores lo cual no influye en el crecimiento de altura de las vitroplantas.

En cuanto al coeficiente de variación alcanzó un valor de 6,11 por ciento lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos.

**Cuadro 10.** Prueba de Duncan para el Factor A: Explante.

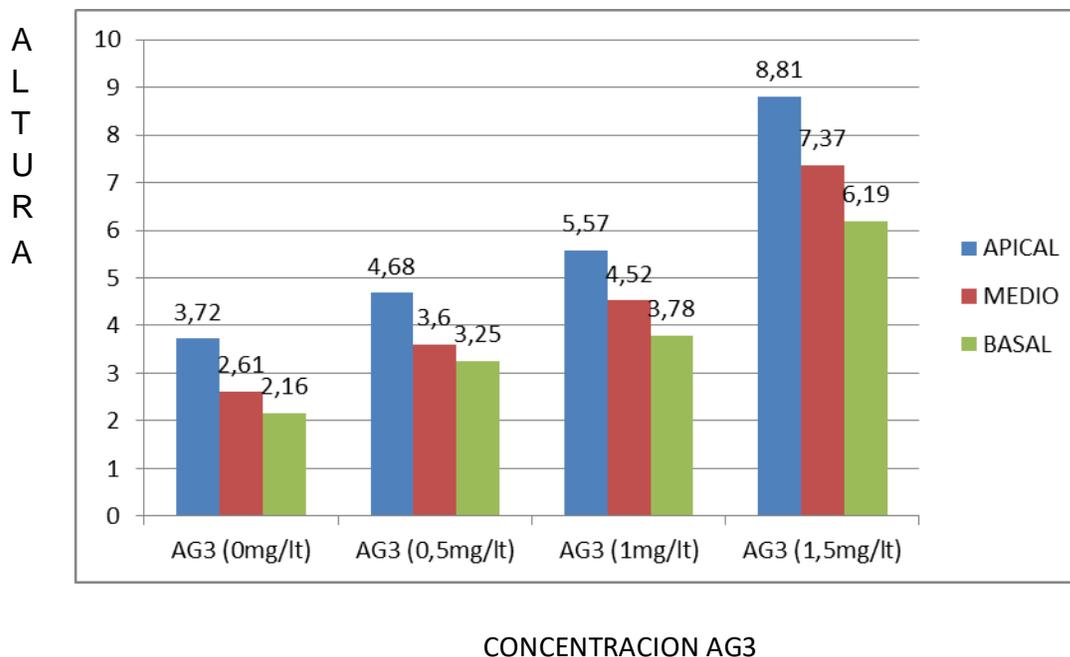
EXPLANTES	MEDIAS	N	E.E.			
APICAL	5,7	40	0,11	A		
MEDIO	4,53	40	0,11		B	
BASAL	3,8	40	0,11			C

Para el factor A se encontró alta significancia, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre los tres tipos de explantes, en el Cuadro 7 en la prueba de Duncan (5por ciento de Significancia) se observa que el mayor porcentaje de crecimiento es el explante apical, sin embargo este valor es superior al porcentaje de crecimiento del explante medio y por otra parte estos valores son significativamente superiores al explante basal.

**Cuadro 11.** Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de **AG<sub>3</sub>**.

CONCENTRACION	MEDIAS	N	E.E.				
AG3 1,5	7,46	30	0,13	A			
AG3 1	4,62	30	0,13		B		
AG3 0,5	3,78	30	0,13			C	
AG3 0	2,83	30	0,13				D

Para el factor B se encontró alta significancia, por lo que se efectuó la prueba de comparación de medias de Duncan (5por ciento de Significancia); el resultado se observa en el cuadro 5, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es la concentración de **AG<sub>3</sub>** 1,5mg/ lt, sin embargo este valor es superior al porcentaje de concentración **AG<sub>3</sub>** 1mg/lt, y por otra parte este valor es superior a la concentración **AG<sub>3</sub>** 0.5mg7lt, siendo estas tres concentraciones significativamente superiores a la concentración de **AG<sub>3</sub>** 0mg/lt.



**Figura 7.** Efecto de los tratamientos en altura de la vitro planta

La figura 8 muestra que para los explantes apicales, medios y basales a una concentración de  $AG_3$  1,5mg/ Lt es diferente en relación a los otros tratamientos. En base a esto se puede afirmar que los explantes apicales, medios y basales de la variedad Huaycha a concentraciones altas de  $AG_3$  1,5mg/ Lt presentan mejores características de crecimiento para la multiplicación que a concentraciones menores.

Este compuesto es recomendado para la regeneración de las plantas. Su principal acción del Ácido Giberélico es ayudar a la elongación de las vitroplantas. (Espinoza, R., 2013).

La adición de 1,0 mg/L. de ácido giberélico en el medio de cultivo, constituye una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta. (Jiménez, 2009).

En la planta son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelinas. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El Ácido Giberélico ( $AG_3$ ), es el más frecuente empleado

en el cultivo *in vitro*. Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar como las de estas, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa. (Murillo, R., 2014).

### 6.1.2 Número de hojas

**Cuadro 12.** Análisis de varianza para número de hojas en vitroplantas

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F	p-valor
FACTOR A	5,67	2	2,83	41,92	<0,0001**
FACTOR B	14,76	3	4,92	71,75	<0,0001**
FACTOR A*B	0,71	6	0,12	1,75	0,1159 NS
ERROR	7,30	108	0,07		
TOTAL	28,44	119			

C.V.=13,46

N.S.= No significativo

\*=Significativo

\*\*=Altamente significativo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 10 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 13,46por ciento lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos.

**Cuadro 13.** Prueba de Duncan para el Factor A: Explante.

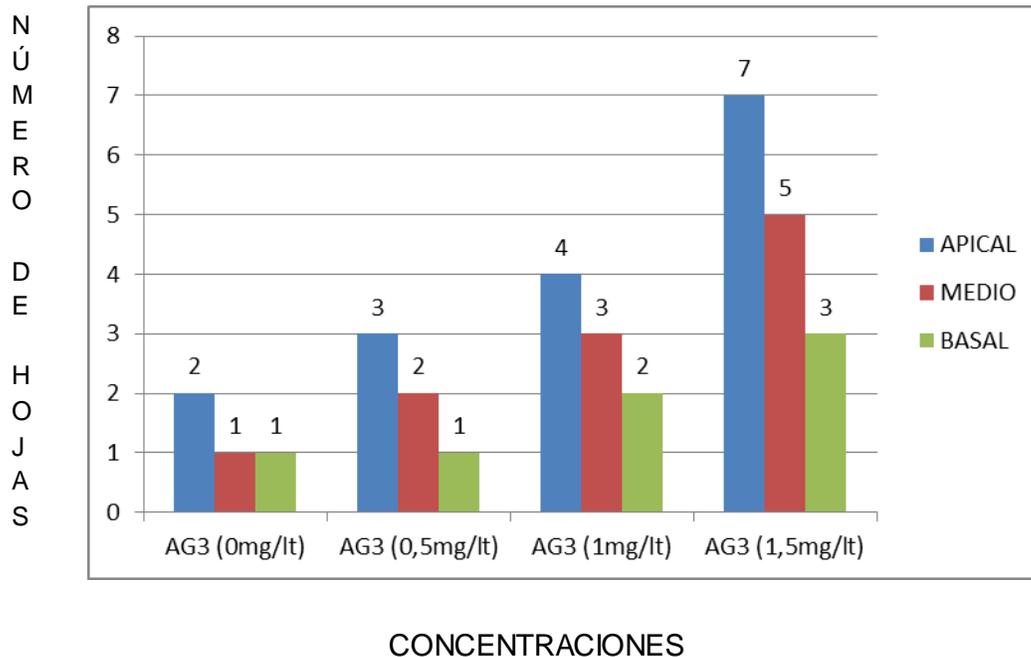
EXPLANTES	MEDIAS	N	E.E.			
APICAL	5,58	40	0,16	A		
MEDIO	3,63	40	0,16		B	
BASAL	2,85	39	0,16			C

Para el factor A se encontró alta significancia, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre los tres tipos de explantes, en el Cuadro 11 en la prueba de Duncan (5por ciento de Significancia) se observa que existe diferencias entre los tres tipos de explantes.

**Cuadro 14.** Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de **AG<sub>3</sub>**.

CONCENTRACION	MEDIAS	N	E.E.				
AG3 1,5	6,83	29	0,19	A			
AG3 1	4,23	30	0,19		B		
AG3 0,5	3,1	30	0,19			C	
AG3 0	1,9	30	0,19				D

Para el factor B se encontró alta significancia, por lo que se efectuó la prueba de comparación de medias de Duncan (5por ciento de Significancia); el resultado se observa en el cuadro 12, indica que el mayor porcentaje a número de hojas por vitro planta es el explante apical, sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de numero de hojas del explante medio; por otra parte estos valores son significativamente superiores al explante basal.



**Figura 8.** Efecto de los tratamientos en número de hojas presenten en vitroplantas

La figura 9 muestra que para los explantes apicales y medios, el número de hojas por vitro planta es mayor en relación al explante basal. En base a esto se puede afirmar

que los explantes apicales y medios de la variedad Huaycha presentan mejores características de crecimiento y desarrollo para la multiplicación.

La adición de 1,0 mg/L. de ácido giberélico en el medio de cultivo, constituye una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta. (Jiménez, 2009).

Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces, en los frutos, tejidos jóvenes y semillas en desarrollo. Esta hormona induce el crecimiento del tallo, regulación de la transición entre la fase juvenil y el adulto, inducción a la floración y la determinación sexual de la flor, inducción de la germinación además de promover la elongación internodal. (Sandoval, 2001).

### 6.1.3 Número de raíces

**Cuadro 15.** Análisis de varianza para número de raíces.

F.V.	S.C.	G.L.	C.M.	F	p-valor
FACTOR A	7,95	2	3,98	55,22	<0,0001 **
FACTOR B	17,23	3	5,74	79,73	<0,0001**
FACTOR A*B	1,31	6	0,22	3,03	0,9026 NS
ERROR	7,78	108	0,07		
TOTAL	34,27	119			

C.V.=12,39

N.S.= No significativo

\*=Significativo

\*\*=Altamente significativo

El análisis de varianza para esta variable se observa en el Cuadro 14 el coeficiente de variación alcanzó un valor de 12,39 por ciento lo que permite otorgar confiabilidad a los datos obtenidos.

**Cuadro 16.** Prueba de Duncan para el Factor A: Explante.

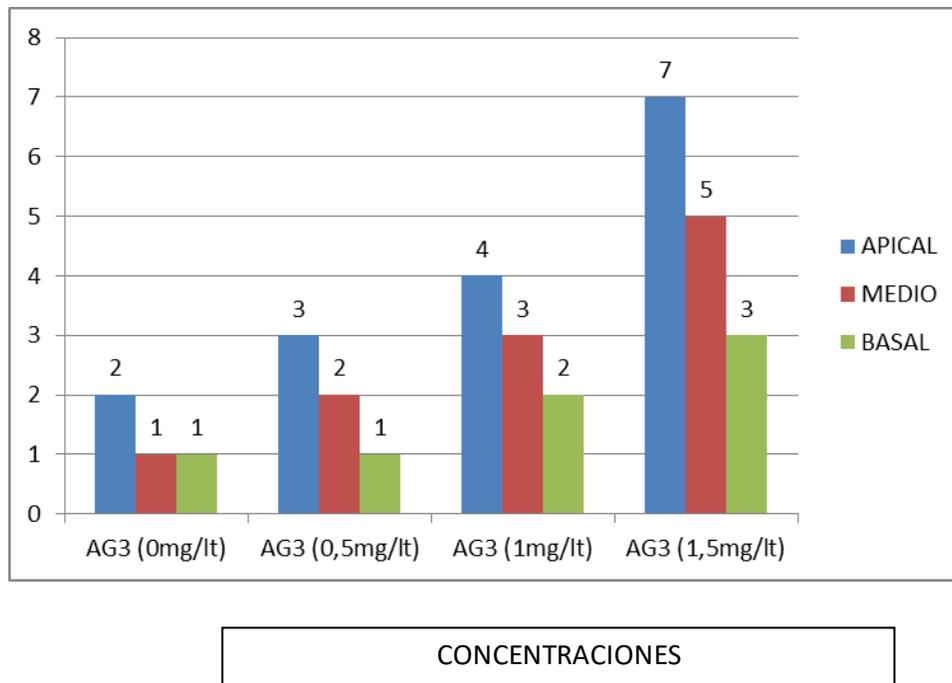
EXPLANTES	MEDIAS	n	E.E.			
APICAL	5,7	40	0,11	A		
MEDIO	4,53	40	0,11		B	
BASAL	3,8	40	0,11			C

Para el factor A se encontró alta significancia, por lo que se puede afirmar que existe diferencia entre los tres tipos de explantes, en el Cuadro 15 en la prueba de Duncan (5por ciento de Significancia) se observa que existe diferencias entre los tres tipos de explantes, en relación al número de raíces.

**Cuadro 17.** Prueba de Duncan para el Factor B: Concentración de **AG<sub>3</sub>**.

CONCENTRACION	MEDIAS	n	E.E.				
AG3 1,5	7,46	30	0,13	A			
AG3 1	4,62	30	0,13		B		
AG3 0,5	3,78	30	0,13			C	
AG3 0	2,83	30	0,13				D

Para el factor B se encontró alta significancia, por lo que se efectuó la prueba de comparación de medias de Duncan (5por ciento de Significancia); el resultado se observa en el cuadro 16, indica que el mayor porcentaje de crecimiento es a una concentración de AG3 1,5 mg/lt, sin embargo este valor es estadísticamente superior al porcentaje de concentración AG3 1 mg/lt, por otra parte estos valores son significativamente superiores a la concentración de AG3 de 0.5 mg/lt.



**Figura 9.** Efecto de los tratamientos en número de raíces presentes en las vitroplantas.

La figura 10 muestra que para los explantes apicales y medios, son los que presentan mayor cantidad en número de raíces respecto al explante basal, se debe tomar en cuenta que la concentración de AG3 también ayuda al desarrollo de este órgano.

Otro regulador de crecimiento es el Ácido Giberélico ( $AG_3$ ), aunque no tiene un uso tan amplio pero si es esencial en el cultivo de meristemas en algunas especies de plantas como la micropropagación con medios líquidos de vitroplantas de papa, banano, piña y totora. (Espinoza, R., 2013).

Este compuesto es recomendado para la regeneración de las plantas. Su principal acción del Ácido Giberélico es ayudar a la elongación de las vitroplantas y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado. (Espinoza, R., 2013).

En la planta son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelinas. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El Ácido Giberélico ( $AG_3$ ), es el más frecuente empleado

en el cultivo *in vitro*. Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar como las de estas, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa. (Murillo, R., 2014).

División y elongación celular, crecimiento de longitud de la raíz principal e inhibición de la ramificación radical y promueve germinación de semillas.(INTAGRI, 2017).

La adición de 1,0 mg/L. de ácido giberélico en el medio de cultivo, constituye una formulación hormonal adecuada para inducir el proceso de organogénesis indirecta. (Jiménez, 2009).

## 7 CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y los resultados obtenidos de al presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- Para la obtención de vitroplantas se utilizaron meristemos con un tamaño de 10 mm de la variedad estudiada.
- El explante basal de la variedad Huaycha no es apropiado para la multiplicación en concentraciones de AG3 bajas.
- En el cuanto a altura de la planta se obtuvieron alturas de: 8,81 cm en el tipo de explante apical, 7,37 cm en el tipo de explante medio y 6,19 cm en el tipo de explante basal, en los tres tipos de explantes a una concentración de AG3 de 1,5 mg/lt.
- En cuanto a la variable número de hojas los explantes que tuvieron mayor cantidad de hojas fueron: el explante apical con 7 hojas, el tipo de explante medio con 5 hojas y el tipo de explante basal con 3 hojas.
- Para la variable número de raíces las vitroplantas que presentaron raíces en mayor cantidad en relación a otros tratamientos fueron los explantes apicales con un promedio de 7 raíces, el tipo de explante medio presento 5 raíces y basales con 3 raíces pero estos a una concentración de 1,5 mg/lt.
- En la introducción de los meristemos y en los tratamientos de los explantes no se adiciono auxinas en el medio de cultivo.

## 8 RECOMENDACIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos y de acuerdo a las conclusiones del presente estudio, se realiza las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda la utilización de meristemas de 0.5 mm, para tener vitroplantas con menor cantidad de virus.
- Se recomienda para llevar a la etapa de enraizamiento de las vitroplantas es preferible hacerlo a concentraciones altas de AG3.
- Es preferible en la etapa de propagación, la utilización de explantes apicales y medios de las dos variedades estudiadas ya que demuestran eficiencia en el desarrollo en altura, numero de hojas y numero de raíces.
- Se recomienda realizar estudios con la utilización de hormonas en concentraciones adecuadas para llegar a un medio establecido donde la vitro planta pueda desarrollarse en menor tiempo, con características morfológicas adecuadas.
- Es recomendable no utilizar explantes basales de la variedad Huaycha por no presentar desarrollo óptimo en los tratamientos que contengan menor concentración de AG3. Al 1,5 mg/lit.
- Se recomienda desinfectar muy bien las muestras para obtener un por ciento de contaminación bajo.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

ALIAGA, R. 2008. Sustitución de la solución de vitaminas del medio Murashigue y Skoog (1962) por extracto de harina de quinua y cañahua para la multiplicación “*in vitro*” de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* spp *andigenum*). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 73 p.

ARTOLA, A. 2002. La semilla artificial y su tecnología (en línea). Monografías.com. Consultado 7 agosto 2012. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/semar/semar.shtml>

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.

CADMO, R. 1990. Fundamentos teórico – prácticos del cultivo de tejidos Vegetales. Editorial FAO. pp. 25-27.

CASSELLS, A.C. Y CURRY, R.F. 2001. Stress oxidativo y fisiológico, epigenética y la variabilidad genética en cultivo de tejidos de planta: implicaciones para micros 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.

DÍAZ MARINA L. 2006. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Transformación Genética. Cap. III. 110 p.

DIAZ, M.D. 2017. Biorreguladores de Crecimiento de Plantas. Serie Nutricion Vegetal Núm 89. Notas Tecnicas de INTAGRI. Mexico. 5 p.

ESCALAN, J. V. 2002. Estado de mejora convencional genética. Simposio Internacional de Biotecnología de Plantas, VI, Santa Clara 26p.

ESPINOZA, RG. 2013. Biotecnología Agrícola: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Esp. 1° ed. BO. Universitaria. 68p.

ESTRADA, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Centro internacional de la papa. PROINPA. La Paz-Bolivia. pp. 308-329.

GABRIEL, J.; PEREIRA, R. Y A, GANDARILLAS, (2011) Catálogo de Nuevas Variedades de Papa en Bolivia. Cochabamba. PROINPA

GUIDI, A.; MAMANI, P. 2001. Características de la Cadena Agroalimentaria de la Papa y su Industrialización en Bolivia. PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 21p.

GONZÁLEZ, O.; SILVA, J. Y ESPINOZA, A. 2004. "La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial". Cuadernos de biodiversidad. Nº 15. Editor: Universidad de Alicante. Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. pp. 17-22. Consultado 7 mayo 2012. Disponible en: [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1115/1/cuadbiod15\\_3.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1115/1/cuadbiod15_3.pdf)

HALL, C.; VILLALOBOS, V. 1996. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma. pp. 15-17

HUASCO, V. 2000. Producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*), Var. Sani Negra por medio de selección positiva, testeo serológico y utilización de brotes de araca, prov. Loayza. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 32 p.

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, (Secretaría de Agricultura y Ganadería, Honduras). 13 p.

JIMENEZ B. JENNY P / CHAPARRO G. ALEJANDRO/ BLANCO JENNIFER 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de

*solanum tuberosum* (Solanaceae) var. Pastura Suprema a partir de explantes internodales. 73 p.

MONTALVO; G QUIALA; E. MATOS, J. 2005 La biotecnología como una herramienta eficaz para la Restauración ecológica. Cuba.

MONTES, S. 1995. El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos. Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 52-56pp.

MURILLO, RA. 2014. Introducción a la Biotecnología Agrícola: Historia del cultivo de tejidos vegetales. Esp. 1° ED. Bo. MMAYA. 101p.

PÉREZ PONCE, J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. 179-191p.

PIERIK. 2002. Biotecnología Vegetal. ¿qué es el Cultivo *In vitro*? 19 p.

PROINPA. 1994. Catalogo Boliviano de Cultivares de Papa Nativa. Cochabamba, BO, Programa de Investigación de la Papa. 5-11 p.

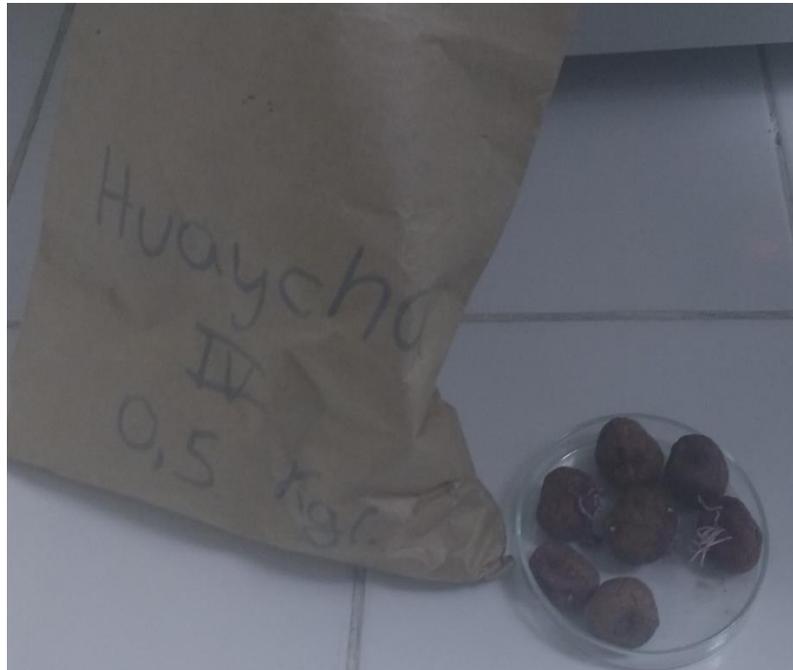
RAMIRO RAÚL OCHOA TORREZ. 2007. Diseños Experimentales. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz – Bolivia. Cap. 12 134145.

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.

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. Huaycha paceña y *Solanum x Juzepzuki* var. Bola luki. Tesis de Lic. En Ing. Agro. UMSA FAC de Agronomía. La Paz, Bolivia pp. 2-35.

**ANEXOS**



**Anexo N° 1.** Semilla variedad Huaycha



**Anexo N° 2.** Semillas colocadas en la incubadora



**Anexo N° 3.** Brotes de papa obtenidos despues de un mes



**Anexo N° 4.** Pesado de myo- inositol, MS y sacarosa



**Anexo N° 5** Cibración de PH del medio de cultivo



**Anexo N° 6.** Sellado y autoclavado de vasitos cocteleros con 15 ml de medio de cultivo.



**Anexo N° 7** Preparación de etanol y hipoclorito de sodio



**Anexo N° 8** Esterilizado de brotes con rayos ultravioleta



**Anexo N° 9** Introduccion de brotes de papa variedad Huaycha a medios de cultivo de la etapa



**Anexo N° 10** Sellado y rotulado de brotes de papa variedad Huaycha a medios de cultivo de la etapa I



**Anexo N° 11** Pesado de myo inositol, sacarosa y MS para medios de cultivo de la etapa II



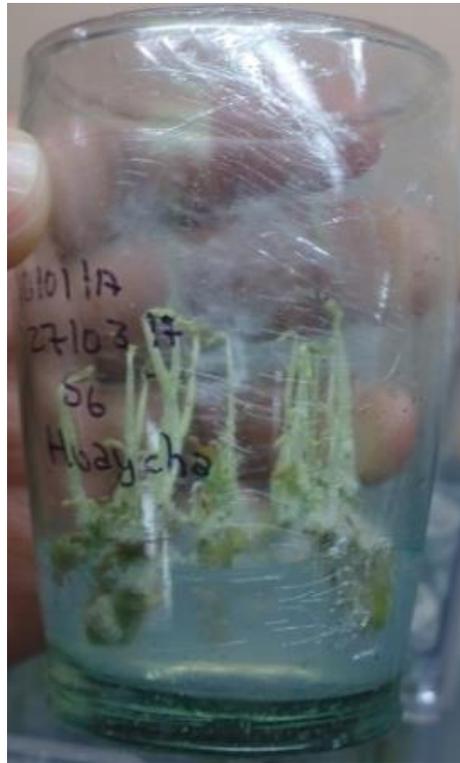
**Anexo N° 12** Disolucion de los reactivos pesados y agregado de concentraciones de AG3



**Anexo N° 13** Repartición del medio de cultivo



**Anexo N° 14** Autoclavado de medios de cultivo



**Anexo N° 15** Vitroplantas en desarrollo



**Anexo N° 16** Vitroplanta desarrollada lista para la multiplicación



**Anexo N° 17** Explantes listos para la introducción a nuevos medios de cultivo



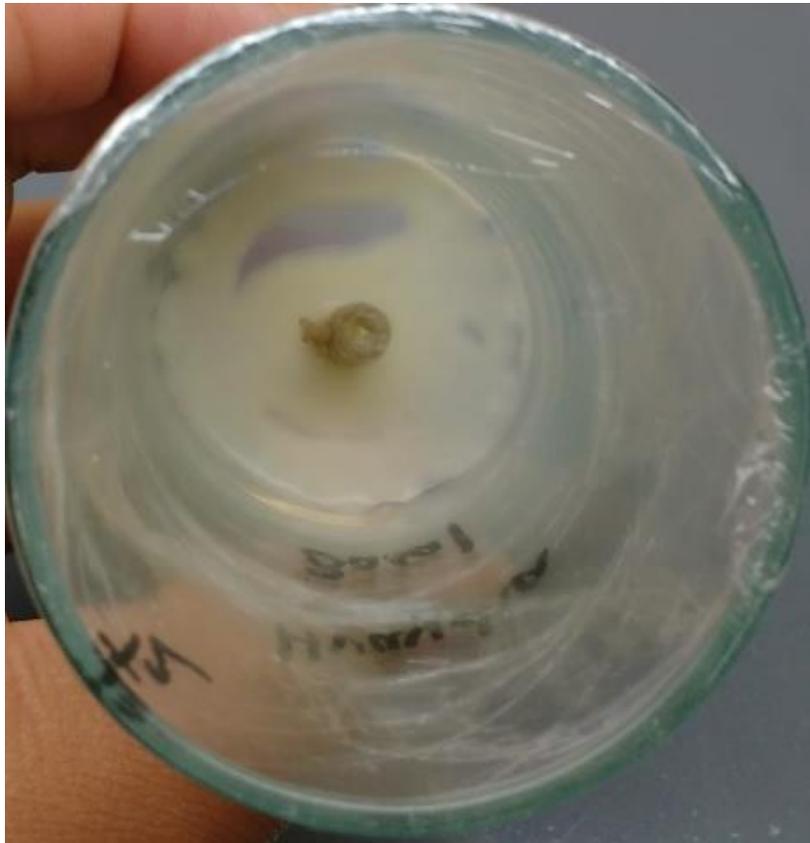
**Anexo N° 18** Roturado de muestras introducidas



**Anexo N° 19** Marbeteado de vitroplantas en distintos medios de cultivo



**Anexo N° 20** Desarrollo de vitroplantas



**Anexo N° 21** Vitroplanta contaminada con bacterias



**Anexo N° 22** Evaluación y registro de variables de respues