

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



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO 2,4
DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA FORMACIÓN DE CALLOS DE
PAPA (*Solanum tuberosum* sp) DE LAS VARIEDADES WAYCHA
PACEÑA E IMILLA NEGRA EN AMBIENTE ATEMPERADO**

DORIS FANNY MOLLISACA MAMANI

LA PAZ – BOLIVIA

2024

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

EFFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO 2,4
DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA FORMACIÓN DE CALLOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum* sp.) DE LAS VARIEDADES WAYCHA PACEÑA E IMILLA
NEGRA EN AMBIENTE ATEMPERADO

*Tesis de Grado presentado como requisito
para optar al Título de
Ingeniero Agrónomo*

MOLLISACA MAMANI DORIS FANNY

Asesor:

Ing. Rafael Adolfo Murillo García

Tribunal Examinador:

Ing. MSc. Carlos López Blanco

Ing. Marco Antonio Echenique Quezada

Ing. Esther Tinco Mamani

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador _____

LA PAZ – BOLIVIA

2024

DEDICATORIA:

Con mucho cariño a mis padres: Paulino Mollisaca y Eloyza Mamani por su gran cariño, su apoyo inagotable y darme la oportunidad de estudiar, también a mis hermanos por ser la fuente de mi inspiración y darme fuerzas para continuar.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la virgen por su misericordia, por su sabiduría, guiarme para salir adelante, el acompañamiento en todo momento de mi vida y recursos para mí y mis seres queridos.

Al laboratorio de Biotecnología vegetal de la facultad de agronomía, por abrirme las puertas y brindarme el apoyo para poder ejecutar el presente trabajo.

A mi asesor Ing. Rafael Murillo García y a mis revisores: Ing. MSc. Carlos López Blanco, Ing. Marco Antonio Echenique Quezada, Ing. Esther Tinco Mamani quienes me colaboraron en las situaciones y guiarme con sus recomendaciones, el conocimiento y la experiencia para la realización de este trabajo de investigación.

A los doctores Alejandro Bonifacio Flores, Augusto Vargas Hudson, e Ing. Félix Rojas Ponce, Jesús Flores y Yakov Arteaga por los consejos y transmitirme su conocimiento por medio de la auxiliatura de docencia que desempeñé bajo su tutoría.

A mis padres Paulino Mollisaca y Eloyza Mamani por la dedicación, esfuerzo para brindarme una educación superior, su apoyo constante en todo el transcurso de mi vida y ser mi más grande inspiración, muchas gracias.

A mis hermanos y hermanas Ofelia, Limber, Judith y Pablo por todo su apoyo y cariño. También a mis adorados sobrinos Beymar, Fernando e Iber.

A mis amigas del colegio: Gilda, Helen, Ninoska, Vania, Maribel, Wara, Johana, Elahe, Kiki ;de agronomía : Gladys, Mariela, Denisse, Sandra, María Astu, Anggie, Ruth, Rebeca Tudela, Franz, Enrique, Julia, Mishel, Jhoel Mayra, Magui, Silvia Cumara, Wilder, Eva, Silvia Apanqui ;de geología: Ginna, Micaela, Aydee, Nayeli, Omar, Benjamin, Nayheli, Adriana, Wayra, Karol, Joel, Israel, Noe, Milton, Dina, Salvador, Jose, Cristina, Magui ;del Ceti: Laleska, Estefaní, Carla, Jose, Arlen, Islaet, Luis, Pablo, Jhoel, Veronica y Cristhian por su amistad y el acompañamiento a lo largo de mi vida brindándome momentos maravillosos.

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es uno de los cultivos de alto interés de la región Andina y es la base de la alimentación de miles de familias agricultoras. Sin embargo, es afectado por agentes patógenos entre los principales están bacterias, hongos y virus los cuales reducen el rendimiento al tiempo que el material vegetal es difícil de limpiar. La principal técnica empleada para la limpieza de virus en papa es la técnica por cultivo de meristemos, pero también se han obtenido buenos resultados utilizando el cultivo de callos.

El cultivo de callos también tiene la ventaja de producir mayores cantidades de plantas para obtención de semilla limpia de forma masiva, por tanto el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de tres concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de papa (*Solanum tuberosum sp.*) de las variedades waycha paceña e imilla negra en ambiente atemperado, donde se evaluaron tres tipos de cortes (material vegetal): (raíz, tubérculo y hoja), en un medio de cultivo (MS, 1962) con diferentes concentraciones de Ácido 2,4 diclorofenoxiacético de (1, 3 y 6 ml/L), donde la fase de observación se evaluaron fue de tres meses.

Los resultados de callos obtenidos fueron: en cultivo de hojas tanto el factor A (variedades waycha e imilla), el factor B (Dosis 1,3 y 6 ml/L) y la interacción las variedades y dosis no influyeron en la obtención de callos en el cultivo en base a hoja. En el cultivo de raíz el único factor significativo es el factor B siendo la dosis 6 ml/L la más óptima con obtención de 75 % de callos. En tubérculo el factor A no es significativo y el factor B resulta significativo y tras las pruebas Duncan resulta que el mejor tratamiento es de 6 ml/L de 2,4 D ya que con esta dosis se obtuvo más callos, mientras que la dosis 1 ml/L no formó callos y es la dosis menos recomendada.

En cuanto a la interacción la mejor combinación es Variedad imilla negra empleando 6 ml/L de 2,4 d con lo cual se obtuvo 25% de explantes que formaron callos. La interacción con rendimiento más bajo y la menos recomendable es de 1 ml/L (de 2,4 D) ya que esta no produjo callos.

SUMMARY

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the crops of high interest in the Andean region and is the basis of the diet of thousands of farming families. However, is affected by pathogenic agents, the main ones being bacteria, fungi and viruses, which reduce yield while making the plant material difficult to clean. The main technique used to clean viruses in potatoes is the meristem culture technique, but good results have also been obtained using callus culture.

Callus cultivation also has the advantage of producing larger quantities of plants to obtain clean seed on a massive scale, therefore the objective of this was to evaluate the effect of three concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on the formation of potato tripe (*Solanum tuberosum* sp.) of the varieties Waycha paceña and imilla negra in a temperate environment, where three types of cuts (plant material) were evaluated: (root, tuber and leaf), in a culture medium (MS, 1962) with different concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (1, 3 and 6 ml/L), where the observation phase was evaluated was three months.

The callus results obtained were: in leaf cultivation, both factor A (waycha and imilla varieties), factor B (Dose 1.3 and 6 ml/L) and the interaction of varieties and doses did not influence the obtaining of callus. in leaf-based cultivation. In the root culture, the only significant factor is factor B, with the 6 ml/L dose being the most optimal, obtaining 75% callus. In tuber factor A is not significant and factor B is significant and after the Duncan tests it turns out that the best treatment is 6 ml/L of 2.4 D since with this dose more calluses were obtained, while dose 1 ml/L did not form calluses and is the least recommended dose.

Regarding the interaction, the best combination is the Imilla Negra variety using 6 ml/L of 2.4 d, which resulted in 25% of explants that formed callus. The interaction with the lowest performance and the least recommended is 1 ml/L (2.4 D) since this did not produce calluses.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Origen de la papa.....	5
3.2 El cultivo de papa.....	5
3.3 Clasificación taxonómica de la papa	6
3.4 Descripción morfológica de la papa.....	6
3.4.1 Raíz	6
3.4.2 Tallos	7
3.4.3 Hojas	7
3.4.4 Inflorescencia.....	7
3.4.5 Fruto y semilla.....	7
3.4.6 Brotes	8
3.4.7 Estolones	8
3.4.8 Tubérculo.....	8
3.5 Descripción de las variedades.....	8
3.5.1 Descripción de la variedad waycha pacaña	8
3.5.1 Características agronómicasde la variedad waycha pacaña	8
3.5.2 Características morfológicas.....	9
3.5.3 Características agronómicas de la variedad imilla negra	9
3.5.4 Características morfológicas.....	9
3.6 Biotecnología vegetal	10

3.7 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	10
3.7.1 Ventajas del cultivo de tejidos vegetales	11
3.7.2 Desventajas del cultivo de tejidos vegetales:	12
3.8 Tipos de contaminantes en el cultivo <i>in vitro</i>	12
3.8.1. Bacterias.....	13
3.8.2. Hongos	13
3.8.3. Oxidación.....	13
3.8.4. Ritketsias y fitoplasmas.....	14
3.8.5. Virus y viroides.....	14
3.8.6. Vitricación	15
3.9 Factores que intervienen en la micropropagación	15
3.10 Calogénesis	16
3.10.1 Diferenciación de embriones somáticos.....	18
3.11 Medio de cultivo	18
3.11.1 Composición del medio de cultivo.....	19
3.11.1.1 Sales inorgánicas o minerales.	19
3.11.1.2 Compuestos orgánicos.	19
3.11.1.3 Fuentes de carbono.	20
3.11.1.4 Reguladores de crecimiento.	20
3.11.1.5 Vitaminas.....	22
3.11.1.6 Agentes solidificantes	23
3.11.2 Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	23
3.12 Etapas de la micropropagación de plantas.....	24
3.13 Cultivo <i>in vitro</i> de papa.....	26
3.13.1 Calogénesis en papa y características	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29

4.1 Localización	29
4.2 Materiales	30
4.2.1 Material vegetal.....	30
4.2.2 Equipos e insumos de laboratorio	30
4.2.3 Material de gabinete.....	31
4.3 Metodología	31
4.3.1 Flujograma de la investigación	31
4.3.2 Procedimientos experimentales de la investigación.....	32
4.3.2.1 Selección de las plantas	32
4.3.2.2 Preparación del medio de cultivo	32
4.3.2.3 Esterilización de los materiales	33
4.3.2.4 Limpieza y descontaminación del material vegetal	33
4.3.2.5 Desinfección de explantes	33
4.3.2.6 Introducción de los explantes.....	34
4.4 Análisis estadístico.....	34
4.4.1 Etapa de introducción	34
4.4.1.1 Diseño experimental	34
4.4.1.2 Modelo lineal aditivo	35
4.4.1.3 Factores de estudio para la etapa de introducción	35
4.4.1.4 Croquis del diseño experimental en la etapa de introducción	36
4.4.2 Variables de respuesta en la etapa de introducción	37
4.4.2.1 Porcentaje de contaminación.....	37
4.4.2.2 Porcentaje de oxidación.....	38
4.4.2.3 Porcentaje de supervivencia	38
4.4.2.4 Formación de callos	38
4.4.2.5 Vitroplantas sin respuesta	38
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
5.1 Porcentaje de contaminados	39

5.2 Porcentaje de oxidación	43
5.3 Porcentaje de supervivencia.....	47
5.4 Formación de callos	51
5.5 Vitroplanta sin respuesta.....	58
6. CONCLUSIONES	63
7. RECOMENDACIONES	66
8. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los factores de estudio para raíz, hoja y tubérculo	36
Tabla 2. Porcentaje de contaminación del factor a: variedad de papa nativa.....	39
Tabla 3. Porcentaje de contaminación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	39
Tabla 4. Porcentaje de contaminación del factor a: variedad de papa nativa.....	40
Tabla 5. Porcentaje de contaminación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	41
Tabla 6. Porcentaje de contaminación del factor a: variedad de papa nativa.....	41
Tabla 7. Porcentaje de contaminación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	42
Tabla 8. Porcentaje de oxidación del factor a: variedad de papa nativa.....	43
Tabla 9. Porcentaje de oxidación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	44
Tabla 10. Porcentaje de oxidación del factor a: variedad de papa nativa.....	44
Tabla 11. Porcentaje de oxidación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	45
Tabla 12. Porcentaje de oxidación del factor a: variedad de papa nativa.....	46
Tabla 13. Porcentaje de oxidación del factor b: concentraciones de 2,4d.....	46
Tabla 14. Porcentaje de supervivencia del factor a: variedad de papa nativa.....	48
Tabla 15. Porcentaje de supervivencia del factor b: concentraciones de 2,4d.....	48
Tabla 16. Porcentaje de supervivencia del factor a: variedad de papa nativa.....	49
Tabla 17. Porcentaje de supervivencia del factor b: concentraciones de 2,4d.....	49
Tabla 18. Porcentaje de supervivencia del factor a: variedad de papa nativa.....	50
Tabla 19. Porcentaje de supervivencia del factor b: concentraciones de 2,4D.....	50

Tabla 20. Análisis de varianza para formación de callos obtenidos en raíz.	53
Tabla 21. Prueba de duncan para la comparación de medias del factor b diferentes concentraciones de 2,4 d.	54
Tabla 22. Análisis de varianza para formación de callos obtenidos en tubérculo.	55
Tabla 23. Prueba de duncan para la comparación de medias del factor b diferentes concentraciones de 2,4 d.	55
Tabla 24. Análisis de varianza de efectos simples para interacción variedad*concentración en relación a la formación de callos en tuberculo.	56
Tabla 25. Análisis de varianza de efectos simples para interacción concentración * variedad en relación a la formación de callos en tuberculo.	57
Tabla 26. Análisis de varianza para explantes sin respuesta.	60
Tabla 27. Prueba de duncan para la comparación de medias del factor b diferentes concentraciones de 2,4 D.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Callogénesis.....	17
Figura 2. Estructura química del ácido 2,4D	23
Figura 3. Localización del área de investigación.....	29
Figura 4. Diagrama de flujo de la investigación.	31
Figura 5. Croquis del diseño experimental de la investigación.....	37
Figura 6. Resultados y comparación del porcentaje de contaminación.	43
Figura 7. Resultados y comparación del porcentaje de oxidación.	47
Figura 8. Resultados y comparación del porcentaje de sobrevivencia.....	51
Figura 9. Resultados y comparación para formación de callos obtenidos en hoja. ...	52
Figura 10. Resultados y comparación para explante sin respuesta en hoja.	58
Figura 11. Resultados y comparación para explante sin respuesta en raíz.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Recolección de las plantas de papa en campo.....	84
Anexo 2	Planta cosechada de la variedad waycha con los tres órganos utilizados .	84
Anexo 3	Limpieza y desinfección de raíces, hojas y tubérculos de papa.....	85
Anexo 4	Insumos utilizados en la investigación.....	85
Anexo 5	Lavado de materiales	86
Anexo 6	Preparación de soluciones madre	86
Anexo 7	Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo	86
Anexo 8	Pesado de myo- inositol	86
Anexo 9	Pesaje en la balanza analítica para el medio de cultivo.....	87
Anexo 10	Se pipeteo la auxina 2,4 d	87
Anexo 11	Área de preparación de medios de cultivo.....	87
Anexo 12	Se realizó el sellado de los vasos y se llevó a la autoclave	87
Anexo 13	Vasitos cocteleros con 15 ml de medio de cultivo.....	87
Anexo 14	Esterilización de los materiales bajo los rayos uv.	88
Anexo 15	Desinfección de los cortes de tubérculo, raíz y hoja.	88
Anexo 16	Introducción de cortes de papa al medio de cultivo.	88
Anexo 17	Rotulado de las muestras multiplicadas en la sala de crecimiento.	89
Anexo 18	Registro de las variables de respuestas en los tres cortes	89
Anexo 19	Evaluación del crecimiento y desarrollo en tubérculo, raíz y hoja.	89

Anexo 20	Formación de callos en raíz.....	90
Anexo 21	Formación de callos en tubérculo	90
Anexo 22	Formación de callos en hoja.....	91
Anexo 23	Formación de raíces. desarrollo de raíces.....	91
Anexo 24	Análisis de los callos a partir de raíces, tubérculos y hojas.	92
Anexo 25	Morfología de los cultivos de células en suspensión	92
Anexo 26	Protocolo experimental de desinfección de las variedades.....	93
Anexo 27	Protocolo experimental de Introducción de las variedades	95

1. INTRODUCCIÓN

La papa es una de las principales fuentes productivas de la región Andina y es la base de la alimentación y la economía de la familia agricultora, el cultivo se constituye como la especie vegetal más cultivada en la zona andina destinada al auto consumo del tubérculo fresco y deshidratado en chuño y tunta (Ballejos, 2010).

La papa al ser una especie cuya principal vía de propagación es vegetativa, implica la transmisión de agentes patógenos como hongos y bacterias y de igual forma los virus que se presentan en la planta propagada o donadora; así mismo la principal forma de transmisión de estos agentes patógenos o virulentos es mediante planta madre que al ser propagada vía vegetativa transmite los microorganismos a los clones que a su vez contaminan la parcela infectando futuras plantas del mismo cultivo. (Fundación PROINPA, 2015).

La semilla de papa en muchos casos contiene agentes patógenos como bacterias y hongos, pero también organismos virulentos que son aún más difíciles de limpiar. Para que el material vegetal de futura semilla esté libre de estos organismos se acostumbra a realizar la limpieza viral del material vegetal empleando para ello la técnica de cultivo de meristemas *in vitro* (Castro, 2003); Sin embargo la embriogénesis somática (el cual implica el cultivo de callos *in vitro*) es considerada como el método de propagación más eficiente de propagación debido a los altos coeficientes de multiplicación; Los callos presentan poca presencia de virus debido a que la multiplicación celular ocurre a una mayor velocidad en comparación a la replicación viral (Murillo, 2014).

En los últimos años la principal técnica empleada para la limpieza de virus en papa es el cultivo de meristemas, pero también se han obtenido buenos resultados utilizando el cultivo de callos, este método tiene la ventaja de ser uno de los que produce mayor número de plantas y el más utilizado en la producción a gran escala. (Guzmán *et al.* 2010).

Los mismos autores argumentan que la hormona más recomendada para inducir a la formación de Callos es la 2,4D, sin embargo, la concentración a aplicar varía de especie a especie según el poder regenerativo del tejido vegetal. La dosis de la hormona 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) adecuada para aplicar y poder obtener callos a menor costo en el cultivo de papa andina aún no ha sido probada en papas comerciales bolivianas donde a mayor o menor concentración de la hormona obtengan distintos resultados dado el efecto herbicida del ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Los clones de variedades de papa que circulan en nuestro medio aún no han sido evaluados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de tres concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos de papa (*Solanum tuberosum* sp.) de las variedades waycha paceña e imilla negra en ambiente atemperado

2.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis del porcentaje de contaminación, oxidación y sobrevivencia de explantes de papa en la formación de callos
- Evaluar el efecto del ácido 2,4 diclorofenoxiacético en sus tres concentraciones y en los diferentes explantes de raíz, tubérculo y hoja.

2.3 Planteamiento del problema

Actualmente la mayoría de los productores tropieza con el problema de semilla de mala calidad en papa, al contener agentes patógenos como bacterias y hongos, sin embargo, los virus siguen siendo uno de los problemas más frecuentes del cultivo de patata y la semilla contaminada requiere procesos especializados para su limpieza.

Para que el material vegetal quede libre de la mayoría de virus se emplea la técnica de cultivo de meristemas in vitro, es la técnica más empleada cuando se trata de virus; sin embargo, según investigaciones como Mori *et al.* (1977) argumentan que en papa como en otros cultivos, existen virus que afectan también a la región meristemática.

Por su parte Ortega (2003) cita a Sheffield, (1942) y Laghans *et al.* (1977), quienes informan que “aunque los meristemas apicales son a menudo libres de virus, esto no puede ser contemplado como un fenómeno de ocurrencia universal. Existe suficiente evidencia para sugerir que algunos virus actualmente invaden la región meristemática de los ápices en crecimiento”.

Estas presencias de virus en los meristemos de plantas hacen que la eficiencia de la técnica de limpieza mediante cultivo de meristemos in vitro reduzca. Ante esta situación plantean que es necesario utilizar de alternativa la técnica de cultivo de callos para la limpieza general del material vegetal por ser más efectiva y obtener mejores resultados.

2.4 Justificación

La papa es uno de los alimentos básicos más consumidos y populares de la humanidad; sin embargo, una de las desventajas de este cultivo en nuestro medio es la calidad de la semilla, en la mayoría de casos la semilla está infectada con microorganismos patógenos muchas veces provenientes de la planta donadora de la cual se obtuvieron los clones, otras que contrajeron estos contaminantes en la naturaleza por insectos vectores que al final contaminan el suelo de la parcela, suelo que infectará al nuevo cultivo incluso de tratarse de semilla pre-básica sana, siendo difícil obtener plantas libres de hongos bacterias y principalmente virus.

Los métodos para limpieza viral basados en cultivo de meristemos han quedado insuficientes ante los virus que atacan al tejido meristemático, por tanto, se requiere estudiar la técnica opcional que consiste en el cultivo in vitro de callos, evaluar la tasa de prendimiento y las dosis adecuadas de hormona promotora de callos a objeto de reducir la cantidad utilizada de la hormona, maximizar la cantidad de plantines obtenidos, limpieza de virus del meristemo y todo a menor costo de producción, de esta manera promover mayor cantidad de programas orientados a la limpieza de material vegetal de papa utilizando variedades comerciales del altiplano y por ende tener mayor accesibilidad y disponibilidad de la misma.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Origen de la papa

La teoría de Candolle afirma que el origen de una especie cultivada es aquel sitio donde existe mayor densidad y variabilidad genética. La papa (*Solanum tuberosum*), es originaria de Sudamérica de la región andina ubicada entre Bolivia y Perú, donde existe una amplia diversidad de especies silvestres y cultivadas, lo cual constituye una fuente genética para futuras generaciones. (Canqui & Morales, 2009).

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo originario de los Andes. Actualmente existen múltiples variedades que se cultivan en todo el mundo desde el nivel del mar hasta altitudes que llegan a los 4000 m.s.n.m. Por ser un cultivo muy importante a nivel mundial, las Naciones Unidas declararon el 2008 como Año Internacional de la Papa, así se promovió proyectos encaminados a fortalecer la importancia como alimento de los países en desarrollo (Muñoz, 2010).

3.2 El cultivo de papa

La papa, (*Solanum tuberosum*) pertenece a la familia de las solanáceas, es originario de América del Sur, en la región andina entre Perú y Bolivia. Un centro secundario de origen se ubica en la isla de Chiloé, en el sur de Chile (Tapia y Frías ,2007).

La Papa es uno de los cultivos de mayor importancia y principal fuente de ingresos económicos para muchas familias campesinas de la zona del altiplano y valles de Bolivia. Más de 200 mil familias están dedicadas a la producción y otras 40 mil personas en la intermediación, venta y provisión de insumos derivados de la papa (Crespo 2003). Según INE citado por CIPCA (2023) en la campaña agrícola 2020 – 2021, Bolivia alcanzó la producción de papa de 1.272.649 Tn en una superficie total de 191.321 hectáreas, alcanzando el rendimiento promedio de 6.65 Tn/ha, siendo que en la Campaña agrícola 2019 – 2020 el total producido alcanzó los 1.317.923 Tn y un rendimiento de 7.2 Tn/ha.

3.3 Clasificación taxonómica de la papa

Según Rojas (2017), la papa tiene la siguiente clasificación taxonómica en el sistema APG IV:

- Dominio:** Eukarya
- Reino:** Plantae
- División:** Angiospermas
- Clado:** Eudicotiledoneas
- Clado:** Superasteridas
- Clado:** Asteridas
- Clado:** Lamidas
- Orden:** Solanales
- Familia:** Solanaceae
- Género:** *Solanum*
- Especie:** *Solanum tuberosum* L.
- Nombre Común:** Papa, patata

3.4 Descripción morfológica de la papa

Tapia y Frías (2007), mencionan a la papa (*Solanum tuberosum* L), como una planta herbácea; de habito: erecto, semirrecto y postrado; su reproducción es tanto sexual (semilla verdadera) como agámica o asexual (tubérculos). En el primer caso, es una planta anual, y como agámica, es considerada perenne potencial debido a su capacidad de reproducirse vegetativamente por medio de tubérculos.

Pardavé (2004), describe a la planta de papa de la siguiente forma:

3.4.1 Raíz

La planta de papa se desarrolla a partir de una semilla o de un tubérculo, las plantas provenientes de semilla, forman una delicada raíz principal con ramificaciones

laterales. La planta originada de un tubérculo es un clon, no tiene raíz principal, forma raíces adventicias, primero en la base de cada brote y luego encima de los nudos, en la parte subterránea de cada tallo, ocasionalmente en los nudos los estolones emergen en grupos de 3 a 4 raíces adventicias.

3.4.2 Tallos

El sistema de tallos de la papa, consta de tallos aéreos, estolones y tubérculos, la planta proveniente de semilla, tiene un solo tallo principal, mientras las que provienen de tubérculos pueden producir varios tallos principales. Las yemas que se forman en el tallo principal y a la altura de las axilas de las hojas, pueden desarrollan para llegar a formar tallos laterales secundarios, estolones e inflorescencia.

3.4.3 Hojas

Las hojas son alternas compuesta imparipinada, formadas por raquis, foliolos, peciolo cada raquis lleva varios pares de foliolos laterales primarios y un foliolo terminal, están provistas de pelos de diversos tipos que se encuentran también presentes en las demás partes aéreas de la planta.

3.4.4 Inflorescencia

Está dividida generalmente en dos ramas principales, cada una de las cuales se subdividen en otras ramas, de esta manera se forma una inflorescencia llamada cimosa. Las flores son hermafroditas, el cáliz consta de cinco sépalos que se unen parcialmente en la base, la corola tiene cinco pétalos fusionados en la base para formar un tubo corto, el androceo consta de cinco estambres y el gineceo tiene un solo pistilo.

3.4.5 Fruto y semilla

El fruto es una baya bilocular de 15 a 30 mm de diámetro, color verde, verde

amarillento o verde azulado. Cada fruto contiene aproximadamente 200 semillas. El tubérculo de papa es un tallo subterráneo ensanchado. En la superficie posee yemas axilares en grupos de 3 a 5 y protegidas por hojas escamosas (ojos). Una yema presenta una rama lateral del tallo subterráneo.

3.4.6 Brotes

Se originan de las yemas de los tubérculos y son de color blanco o coloreados, el extremo basal del brote forma la parte subterránea del tallo, después de la siembra esta parte produce rápidamente raíces y luego estolones, el extremo apical da origen al tallo y hoja.

3.4.7 Estolones

Son tallos laterales y crecen horizontalmente a partir de las yemas, estos se alargan con varios entrenudos y terminan en una hinchazón que es el futuro tubérculo. Sin embargo, no todos llegan a formar tubérculos, un estolón no cubierto 6 en el suelo puede desarrollarse en un tallo vertical con follaje normal (Pardave, 2004).

3.4.8 Tubérculo

El tubérculo es un sistema morfológico ramificado; los ojos de los tubérculos tienen una disposición rotada alterna desde el extremo proximal del tubérculo (donde va inserto el estolón) hasta el extremo distal, donde los ojos son más abundantes. La yema apical del extremo distal es la que primero se desarrolla y domina el crecimiento de todas las otras. A este fenómeno se le ha denominado “dominancia apical”.

3.5 Descripción de las variedades

3.5.1 Características agronómicas de la variedad waycha Paceña

La Variedad Waycha Paceña (*Solanum tuberosum*), presenta forma de tubérculo

redondo, ojos profundos, piel rosada con manchas blancas, pulpa de color blanco, desarrollo erecto, semitardío, follaje color verde claro con estrías café y flores rosadas. Así mismo entre sus características agronómicas presenta una rusticidad moderada, el tiempo de maduréz va entre 100 a 140 días, el tiempo de almacenamiento está entre 4 y 5 meses (SEPA, 2015).

Es muy productivo, con una rusticidad moderada y es una variedad muy aceptada en el mercado local. (Quispe, 2003).

3.5.2 Características morfológicas

La Variedad Waycha Paceña se caracteriza porque tiene un hábito de crecimiento semi-erecto, tallo de color verde con poca pigmentación, color de floración es lila con rojo morado, fruto bayo globosa de color verde, tubérculo redondo con ojos profundos, la piel es roja con áreas amarillas alrededor de los ojos, color de la pulpa crema, madurez tardía de 150–180 días (Marino, 2010).

3.5.3 Características agronómicas de la variedad Imilla negra

La variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum subsp. andigena*) tiene un ciclo vegetativo tardío de 150 a 180 días, su rendimiento promedio es 6,5 toneladas/ha y su tiempo de almacenamiento rodea los 6 meses. Se comporta mejor en suelos puruma (vírgenes) (suelos en los cuales no se cultivaron por mucho tiempo); las zonas de producción se encuentran ubicadas entre 3.800 a 4.100 m de altitud. (Iriarte *et al.* 2009).

3.5.4 Características morfológicas

La especie es *Solanum tuberosum spp. Andígena*, tiene flores de color celeste con violeta, tiene escasas flores y crecimiento erecto; tallo verde con pocas manchas. El tubérculo es comprimido con ojos profundos, su color de piel es morado con áreas de color amarillo, pulpa blanca de color blanco crema con áreas color violeta, calidad

culinaria buena con tiempo de cocción de 38 minutos, también destaca su bajo contenido de glicoalcaloides (no amarga) (Iriarte *et al.* 2009).

3.6 Biotecnología vegetal

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

CIATEJ (2020), menciona que la Biotecnología Vegetal”, es el conjunto de técnicas utilizadas para mejorar las variedades de plantas en función de características de interés agrícola y de ornamentación. Esta comprende conocimientos de diversas áreas de la ciencia como bioquímica, agronomía, biología celular y genética. Además, declaran que con su aplicación se pueden obtener nuevos productos y modificar las características de otros, el aumento en su productividad, volumen y resistencia a condiciones adversas como las generadas por bacterias, virus, hongos, sequía, salinidad, frío y calor.

La biotecnología es la aplicación de organismos vivientes para el desarrollo de nuevos productos y la Biotecnología de Plantas o vegetal es la adición de rasgos selectos a plantas, para el desarrollo de nuevas variedades y que tiene como base principal el cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro*, una de las más importantes aplicaciones para la producción masiva de plantas de interés económico o biológico (Salgado, 2014).

3.7 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica en la que se desarrollan fragmentos de tejidos de una planta (explantes) *in vitro* en un medio artificial en condiciones asépticas. Implica cultivar explantes (como la punta del brote, la punta de la raíz, el callo, la semilla, el embrión, el grano de polen, el óvulo o incluso una sola célula)

aislados de la planta madre en un medio nutritivo estéril que conduce a la multiplicación celular y la regeneración de la planta (Hasnain *et al.* 2022).

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

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

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

3.7.1 Ventajas del cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es el único medio conocido para erradicar virus, viroides, micoplasmas y otros patógenos a partir de material vegetal infectado, propagación clonal intensiva de plantas libres de enfermedades en cortos periodos de tiempo, además que se obtiene y mantiene el cultivo libre de plagas y enfermedades por ser una técnica que requiere de mucha metodología aséptica, evita la erosión genética y reduce costos de producción por labores agronómicas en el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasmas en el campo (Perea & Tirado, 2011).

3.7.2 Desventajas del cultivo de tejidos vegetales:

Perea & Tirado (2011), mencionan que requiere de personal especializado: biólogos, fisiólogos, Fito mejoradores, bioquímicos, requiere infraestructura y equipamiento especiales que en todos los casos son costosos, en adición la adquisición de productos químicos es costoso y difícil, especialmente en países en vías de desarrollo donde no abundan muchos laboratorios realizando investigación, también mencionar que es difícil instalar laboratorios *in vitro* donde no exista servicio eléctrico o que presenten interrupciones periódicas que pueden perjudicar el crecimiento de los cultivos y finalmente existe una escasa literatura relacionada al cultivo *in vitro* en nuestro medio.

3.8 Tipos de contaminantes en el cultivo *in vitro*

Las plantas en su condición de crecimiento natural tienen asociadas una fauna y flora microbiana con la cual interactúan sin verse afectado su desarrollo; por el contrario. Algunos microbios, dentro de los que se encuentran ciertas bacterias, actúan como agentes endófitos benéficos asociados al sistema vascular de la planta. Sin embargo, en condiciones de cultivo *in vitro*, estos microbios se convierten en contaminantes o agentes facilitadores de contaminación para los explantes (Suárez, 2020).

Hernández y Gonzáles (2010), sostienen que los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras denominados "vitropatógenos", aunque también existen otros como los virus, viroides y microartrópodos (ácaros y trips). Al mismo tiempo explican que el término vitropatógeno ha sido usado para aquellos organismos que no son necesariamente patógenos para las plantas en el campo, pero sí son perjudiciales para células, tejidos u órganos cultivados *in vitro*, mientras que el término patógeno ha sido confinado para describir a un organismo que causa enfermedad a las plantas cultivadas en el campo.

3.8.1. Bacterias

Son las más comunes entre los microbios contaminantes de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Algunos de los géneros de bacterias vitropatógenas con mayor incidencia son *Acinbacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Xantomona* (Agrios,2005).

Los síntomas más comunes de la contaminación bacterial en los tejidos vegetales son la muerte completa del explante, crecimiento desuniforme, necrosis localizadas, bajas tasas de multiplicación en brotes axilares y baja capacidad de enraizamiento.

Generalmente, la contaminación con bacteria puede identificarse por la presencia de manchas de aspecto acuoso y coloración variada en el tejido vegetal, turbidez en medios líquidos y por la presencia de colonias que crecen en forma circular sobre medios semisólidos (Suárez, 2020).

3.8.2. Hongos

Los hongos son microorganismos que generalmente actúan como contaminantes externos de los explantes, aunque algunos se encuentran asociados con el sistema vascular (Suárez, 2020).

Los géneros más comunes de hongos que actúan como contaminantes de cultivos *in vitro* son: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Saccharomyces*, este último conocido como levaduras. Sus contaminaciones se caracterizan por el crecimiento micelial que rápidamente cubre el explante resultando en la muerte rápida de los tejidos, aunque la presencia de levaduras puede confundirse con contaminaciones de tipo bacterial (Carlite *et al*, 2021).

3.8.3. Oxidación

Causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el

oxígeno del frasco, produciendo una coloración rojiza, amarillenta o café. Indica, que los compuestos fenólicos actúan como inhibidores del crecimiento emitidos por el propio explante, capaces de causar el envejecimiento y muerte del mismo. Se han documentado incluso diferencias en los grados de oxidación entre los cultivares de una misma especie (Poma, 2014).

3.8.4. Rickettsias y fitoplasmas

Las Rickettsias y fitoplasmas son tipos particulares de bacterias que pueden causar enfermedades en organismos vegetales. Las rickettsias se caracterizan por ser inmóviles, mientras que los fitoplasmas carecen de la pared celular. Ambos pueden actuar como patógenos externos o sistémicos, y son generalmente inoculados en la planta por insectos vectores (Agrios, 2005). Los síntomas de contaminación por Rickettsias y fitoplasmas en tejidos vegetales *in vitro* son amarillamiento de las hojas, reducción del tamaño de los órganos y flacidez de los tejidos.

3.8.5. Virus y viroides

Los virus son nucleoproteínas fitopatógenas, mientras que los viroides son pequeñas cadenas de ARN sin proteínas asociadas que suelen causar enfermedades en las plantas. Ambos se desplazan dentro de las plantas a través de los conductos vasculares y necesitan de una célula hospedera para llevar a cabo sus funciones básicas (Suarez y Jaraba , 2004).

Las contaminaciones ocasionadas por estos microorganismos no son eliminadas con la desinfección superficial de los explantes, y los síntomas más comunes de estas son hojas amarillentas, presencia de mosaicos en la lámina foliar, crecimiento lento y baja capacidad de enraizamiento (Suárez, 2020).

3.8.6. Vitrificación

Gallo (2019), afirma que es un fenómeno llamado también hiperhidricidad que consiste en el aumento del potencial hídrico de las células que causa un enverdecimiento de los tejidos y los torna quebradizos. En algunos casos se hace referencia a esta como una enfermedad fisiológica.

3.9 Factores que intervienen en la micropropagación

El estado fisiológico de las plantas donadoras y la época del año son aspectos de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuanto más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. La época del año es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormancia que presentan ciertos explantes (yemas) (Echenique *et al.*, 2004).

La atmósfera gaseosa es un factor determinante en los procesos morfogénicos y está condicionada por el tipo y tamaño de los frascos seleccionados, así como por el sistema de cobertura de los mismos (Radice, 2004).

El ambiente *in vitro* se caracteriza por alta humedad relativa, temperatura constante, bajo nivel de densidad de flujo de fotones fotosintéticos, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar, sales y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, acumulación de sustancias tóxicas y ausencia de microorganismos. Esto causa bajos niveles de transpiración, absorción de nutrientes, CO₂, así como un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que resulta en un pobre crecimiento celular (Barbón, 2003).

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* como para la proliferación de callos o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Radice, 2004).

La capacidad de regeneración de un explante depende en gran medida del genotipo, incluso dentro de la misma especie, lo que refleja diferencias en el poder de activación de las rutas embriogénicas (Parrot, 1993).

Es conocido que la luz y la temperatura han sido consideradas como los factores físicos más importantes en la micropropagación. La luz es uno de los factores que determina el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar la luz en los cultivos *in vitro* (Pelacho *et al.*, 2002).

El fotoperiodo puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento donde cambios en la intensidad luminosa pueden causar organogénesis y cambios morfológicos específicos debido a la longitud de onda de la iluminación (Pérez, 2006).

3.10 Callogénesis

Marulanda *et al.* (2021), indican que el uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una herramienta eficiente para propagar genotipos élite mediante la organogénesis directa; además, las plantas obtenidas están libres de enfermedades. Los primeros estudios con esta técnica en heliconias fueron quienes a través de yemas laterales lograron la regeneración de manera indirecta *in vitro* de *H. psittacorum* y encontraron que las plantas obtenidas produjeron más vástagos que las propagadas de forma convencional.

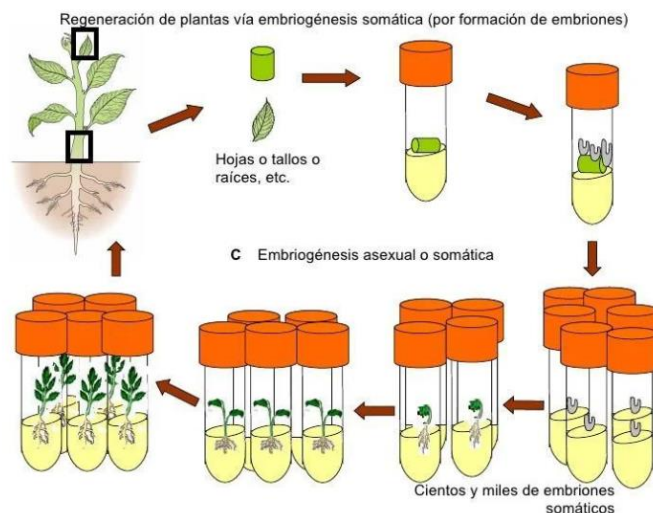
El callo es una masa de tejido compuesto por células indiferenciadas que se forman en explantes después de algunas semanas en un medio de crecimiento con las hormonas apropiadas. Para estimular la inducción y el desarrollo de los callos, se emplean hormonas de crecimiento como 2,4-D, NAA, kinetina, etc. La organogénesis permitirá la regeneración efectiva de nuevas plantas a partir de callos (Hasnain *et al.* 2022).

Vincenty (2019), indica que se denomina tejido calloso a una masa amorfa generada

por células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación. En condiciones naturales este tejido aparece como un mecanismo de cicatrización cuando se presentan heridas o en agallas inducidas por organismos fitopatógenos. La aparición natural de tejido calloso se da como consecuencia de un cambio en los niveles endógenos de fitohormonas, principalmente auxinas y citocininas.

A través, de la biotecnología las plantas pueden ser producidas por medio del cultivo de callos a través de dos procesos: la organogénesis indirecta y embriogénesis indirecta. La embriogénesis indirecta es la formación de un embrión vegetal a partir de tejidos de callo derivados de explantes, mientras que la organogénesis indirecta es la formación de órganos vegetales *in vitro* como raíces, tallos y otros, que también tienen que pasar por una etapa intermedia llamada callo. Así, bajo ciertas condiciones nutritivas y hormonales, partes como órganos y tejidos (explantes) son capaces de diferenciar sus células y reiniciar su crecimiento por división celular, en condiciones *in vitro*. Gracias a estas técnicas de micropropagación vegetal podemos obtener una planta completa a partir de una parte de ella. (Vincenty, 2019).

Figura 1:
Callogénesis



Fuente: (Cruz, 2023)

Los callos se pueden multiplicar como tejido no organizado durante un periodo ilimitado a través de subcultivos periódicos en medio fresco o inducirlos a diferenciar estructuras organizadas (raíces, brotes, embriones) mediante la manipulación del medio de cultivo (Bhojwani & Dantu, 2013).

3.10.1 Diferenciación de embriones somáticos.

En esta etapa se forman los embriones somáticos a partir de los callos embriogénicos desarrollados en la fase anterior. Una vía simple para promover la diferenciación de embriones es la transferencia de callos inducidos en medios con 2,4-D y citoquininas a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento. (McKerrie y Brown, 2008).

3.11 Medio de cultivo

El medio Murashige & Skoog (1962), es considerado como el medio basal más utilizado en la generación de plantas puesto que es apto para el desarrollo de varias especies, sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo (Aguirre, 2010).

Espinosa (2013), argumenta que se da el nombre de medio de cultivo al sustrato artificial de composición compleja, utilizando para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. El medio de cultivo permite que dé forma artificial y bajo condiciones estériles pueda vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen.

La combinación sólida o líquida de nutrientes y agua es el medio de cultivo, generalmente contiene sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. Generalmente se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento. Ocasionalmente con otras sustancias y gelificando generalmente con agar. Así mismo se pueden encontrar variantes de acuerdo a la etapa de propagación (Caillante, 2017).

Alcántara *et al.* (2019), sostienen que los reguladores de crecimiento pueden ser clasificados según: su estructura molecular, su actividad a nivel vegetal, sus efectos inhibitorios o estimulantes y otras clasificaciones. Las fitohormonas se clasifican en familias, por ejemplo, las auxinas, que abarcan varios compuestos con estructura y actividad similar. Por otra parte, reguladores como el etileno son sustancias específicas y no se conocen otras que cumplan una actividad similar. Ciertas funciones de las fitohormonas pueden ser observadas a nivel fenotípico. Estos autores elaboraron una tabla clasificando los reguladores de crecimiento en: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido, etileno, ácido salicílico, poliaminas, ácido jasmonico, brasinoesterioides y estrigolactonas.

3.11.1 Composición del medio de cultivo

3.11.1.1 Sales inorgánicas o minerales.

Macronutrientes: 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, fósforo 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,

Micronutrientes: Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos. (Álvarez, *et al.*, 2007).

3.11.1.2 Compuestos orgánicos.

Según Menezes *et al.* (2016), todo medio está básicamente compuesto de macronutrientes, micronutrientes, pero también compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbono.

3.11.1.3 Fuentes de carbono.

Mendoza (2007), indica que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3%; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivo de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

3.11.1.4 Reguladores de crecimiento.

Según Alcántara *et al.* (2019), los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son, en general, mucho más potentes que los análogos naturales. Es necesario considerar aspectos críticos como oportunidad de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad, condición de la planta, etc., ya que cada planta requerirá de unas condiciones específicas de crecimiento que pueden afectarse por la concentración de ellos en el medio. Los reguladores vegetales son productos sintéticos que se han convertido en las primeras herramientas capaces de controlar el crecimiento y actividad bioquímica de las plantas por lo que su uso ha aumentado en los últimos años.

- Auxinas.

Las auxinas sintéticas más activas tales como el ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido α -naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias. A bajas concentraciones predomina la formación de raíces adventicias y a altas concentraciones se da la formación de callo en lugar de raíces. Tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos; estimulan el alargamiento y división celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias; también promueven el enraizamiento. Las auxinas que más se usan en cultivo de tejidos son: ANA, AIA y 2-4-D (Rodríguez, 2012).

Gutiérrez (2009), indica que ha demostrado que la acción de las auxinas sobre el alargamiento celular está basada en una serie de modificaciones que se producen previas a este proceso, tales como: incremento del contenido osmótico de la célula, aumento en la permeabilidad celular al incrementarse la plasticidad de la pared y aumento en la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas específicas, lo cual origina un incremento de la plasticidad y de la extensión celular.

Las concentraciones a usar de las auxinas varían de especie a especie, pero generalmente se utilizan de 0.1 a 10 mg/l. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente 2,4-D > ANA > AIB > AIA (López y Chaparro, 2007).

- Citocininas.

Jordán y Casaretto (2006), argumentan que las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes. Se trata de derivados de la base adenina que en su posición N6 muestra varias substituciones, no teniendo (la adenina sola), efecto hormonal alguno. El reconocimiento de las cualidades de las citocininas se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50, siendo este un artefacto producto de la degradación del ADN en espermátidas de arenque sometidas a autoclavado (temperatura y presión). Actualmente las citocininas pueden clasificarse en naturales (generadas por plantas) y artificiales (Sintetizadas mediante procesos químicos).

Es probable que las citocininas se sinteticen en las puntas de las raíces y se desplacen por la xilema hacia las hojas, donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento. Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes, cuando la relación es intermedia se desarrollan tejidos de callos no diferenciados, también provocan la

elongación de algunas hojas y la elongación de segmentos de tallos etiolados, es la respuesta se deben en gran parte a la expansión celular (Gutiérrez, 2009).

- Giberelinas

Las giberelinas, también conocidas como ácidos giberélicos, tuvieron su primera aparición en años cercanos a la década de 1930. Dentro de esta investigación se pudo observar la asociación de un hongo que anteriormente era conocido como *Gibberella fugikuroi* como agente etiológico de la enfermedad “bakanae” las plántulas de arroz. Además, informan que, con el paso del tiempo, algunos científicos lograron aislar y caracterizar diferentes tipos de giberelinas a partir de la filtración y purificación de los metabolitos que eran capaces de producir estos hongos, logrando 117 principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal diferenciar 3 tipos de giberelinas en la década de 1950. (Cortés *et al.*, 2019).

Las giberelinas promueven la división celular al reducir la interface del ciclo celular e inducir las células en fase G1 a sintetizar ADN. También promueven la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa, provocando la disminución del potencial hídrico, lo cual permite el ingreso de agua en la célula y produce su expansión (Perea, 2009).

3.11.1.5 Vitaminas.

Pelacho *et al.*, (2007), mencionan que las vitaminas son compuestos orgánicos que a bajas concentraciones desempeñan en el metabolismo celular funciones catalíticas y reguladoras, las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas concentraciones. Las vitaminas más empleadas son: tiamina, ácido nicotínico, myoinositol, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y la vitamina E.

Así mismo Roca y Mroginski (1993), indican que los medios de cultivo contienen

comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina.

3.11.1.6 Agentes solidificantes

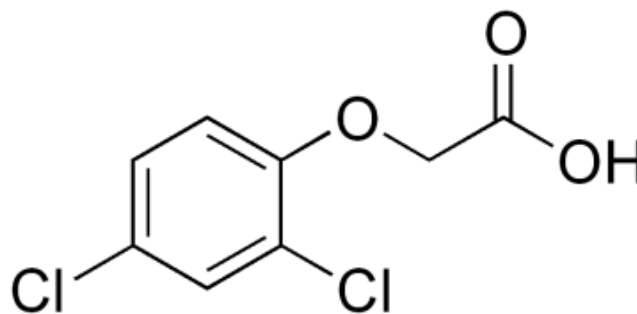
Roca y Mroginski (1993), mencionan que en los medios semisólidos comúnmente se adiciona agar (0.6% a 1%). La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos (nutrimentos, azúcar y hormonas) como del agente gelificante. Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos.

3.11.2 Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Rivero *et al.* (2008), indican que el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético es una potente auxina que se usa en el cultivo in vitro para la formación de callos y la inducción de embriones somáticos, conocido por su nombre común como 2,4-D se le clasifica dentro del grupo de los herbicidas fenoxi o fenoxiacéticos o clorofenólicos.

Figura 2:

Estructura química del ácido 2,4D



Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

Fuente: (Glpbio, 2024)

Fórmula química: C₈H₆Cl₂O₃

Prieto (1992), indica que el 2,4 D fue introducido en el año 1954 como el primer herbicida sistémico y selectivo para el control de malezas de hoja ancha en cultivos de cereales, siendo ampliamente usado en la actualidad debido a su bajo costo y fácil acceso para el agricultor, a su vez se está demostrando actualmente que a pequeñas concentraciones promueven el enraizamiento. En la actualidad también se están realizando trabajos de enraizamiento con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

Bejarano (2007), menciona que el 2,4-D se le incluye dentro de los “herbicidas hormonales” porque actúa de modo parecido a la hormona natural auxina o ácido indol-3-acético (AIA). Las plantas de manera natural producen hormonas que son sustancias químicas que actúan de manera precisa y en cantidades muy pequeñas y su concentración es regulada por la propia planta; en el caso de la auxina es una hormona que regula el sano crecimiento y desarrollo vegetal, pero en su forma sintética y a una concentración mucho mayor provoca la muerte de la planta ya que no encuentra un mecanismo de control interno.

El mismo autor menciona también que el 2,4-D es un herbicida sistémico debido a que se absorbe por las hojas o la raíz y se transporta por la savia a todo el cuerpo alcanzando los tejidos internos y partes no rociadas. Se acumula en las regiones de crecimiento e induce malformaciones que matan a la planta. Es considerado uno de los primeros herbicidas “selectivos” pues mata más a las plantas de hoja ancha y causa poco daño a los de hoja angosta; se ha usado para controlar malezas de hoja ancha, anuales y perennes, en su post-emergencia, en cultivos de cereales, caña de azúcar, pastizales, áreas industriales y en céspedes, jardines domésticos y campos de golf.

3.12 Etapas de la micropropagación de plantas

Fase O (Preparativa): Esta etapa inicial comprende la selección de la planta madre y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en el desarrollo posterior de los cultivos in vitro. La misma tiene

una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Zayas, 2005).

Fase I Establecimiento o Iniciación de los cultivos: consiste en cultivar un pequeño segmento de plantas (explantes) sobre un medio sintético en condiciones controladas, con el propósito de regenerar las plantas enteras (Roca y Mroginski, 1993). Los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO₂), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y dicloruro de mercurio (HgCl₂). Además, se pueden añadir algunas gotas de Tween-20 (Zayas, 2005).

Fase II Multiplicación: Se considera la etapa más importante del proceso, la micropropagación de una especie o variedad definiéndose no solo el número de plantas y propágulos a obtener, sin embargo, su calidad genética por esta fase en la que reproducen variantes somaclonales (Maceo, 2007).

Fase III Enraizamiento: El enraizamiento *in vitro* es la etapa final del proceso de micropropagación que precede a una etapa de multiplicación (con subcultivos) periódicos en medio rico en hormonas estimulantes. Cuanta con 2 etapas: Etapa 1 en la cual se observan microtallos en estado de proliferación y etapa 2 de elongación. Estas etapas están influenciados por diversos factores tales como el oxígeno, temperatura, sacarosa, potencial estomático, pH y nutrientes minerales que dependen básicamente de las condiciones físicas de cultivo (Paz *et al.* 2016).

Fase VI aclimatización: Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen en condiciones de baja intensidad luminosa, alta humedad relativa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios de cultivos ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plantas que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo (Barranco *et al.*, 2002).

La aclimatación de plantas cultivadas "*in vitro*" es la última fase del proceso de

micropropagación y es considerada una etapa crítica donde se determina la sobrevivencia y establecimiento de plántulas (Lesar *et al.* 2012). Es una etapa crítica ya que implica cambios drásticos en la condición de cultivo para las plantas, la cual puede provocar estrés y muerte. Durante el cultivo “*in vitro*” las plantas presentan un crecimiento anormal con cambios de tipo morfológico, anatómico y fisiológico (Cañal *et al.* 2001).

3.13 Cultivo *in vitro* de papa

Muchas investigaciones han tenido como objeto de estudio las especies pertenecientes a la familia *Solanaceae* debido a su importancia económica. En particular, los estudios genéticos y genómicos se han enfocado principalmente en la papa y el tomate ya que producen órganos de interés comercial (el fruto en el caso del tomate y el tubérculo en la papa) (Rigano *et al.* 2013).

Granger (2016), menciona que hace más de tres décadas se han establecido cultivos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., en la mayoría de los casos con el objetivo último de mejorar características agronómicas. Las suspensiones celulares han sido utilizadas como un modelo para estudiar rutas metabólicas, variación, expresión génica, entre otros aspectos genéticos, bioquímicos y fisiológicos relevantes.

Sin embargo, hasta el momento no se han establecido bioprocesos a partir de cultivos de células en suspensión de papa por lo que se desconocen reportes de parámetros que serían fundamentales. Además, se ha reportado que la composición adecuada del medio de cultivo para lograr un establecimiento de callos y de crecimiento, depende del genotipo. Para establecer cultivos de células en suspensión de una nueva variedad de papa es necesario entonces encontrar la composición del medio que favorece el crecimiento del callo y la suspensión de este genotipo. (Shahab-ud-din *et al.*, 2011).

El cultivo *in vitro* en papa ha presentado gran variedad de estudios, en el que se emplea distintos explantes como: estolones, nudos, esquejes, anteras, hojas, tallos entre otros; con diferentes fines como inducción a embriogénesis, regeneración,

micropropagación, dichas técnicas aportan información para la conservación y mejoramiento genético de la planta (Hernández & Díaz, 2019).

Un equipo de investigadores de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá desarrolló tres nuevas variedades de papa de la subespecie *andígena*, entre las que se destaca la variedad Pastusa Suprema obtenida mediante técnicas convencionales de mejoramiento genético, por el cruce de un clon interespecífico (*Solanum stoloniferum* 230490 × *Solanum phureja* var. Yema de huevo) con *Solanum tuberosum* subsp. *andígena* var. Parda pastusa (López & Chaparro, 2007).

3.13.1 Callogénesis en papa y características

Granger (2016), menciona que en general hay muy pocos reportes de callogénesis en cultivares solanáceos de la subespecie *andígena*, probablemente debido a la baja eficiencia de regeneración de brotes en estos genotipos. Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales que se han desarrollado en papa se tiene a los cultivos a partir meristemas, brotes axilares desarrollados de puntas meristemáticas, puntas de ápices y también por embriogénesis somática. Los estudios condujeron a que la regeneración bajo condiciones *in vitro* está en relación con el genotipo de los explantes, al existir diferencias porcentuales en la formación de callos embriogénicos en las distintas variedades y cultivares de papa.

Al igual que en otras especies, se ha evidenciado que los requerimientos hormonales para el cultivo *in vitro* de *S. tuberosum* L. son dependientes del tipo de explante (Anjum & Ali, 2004). Se ha reportado la obtención de callos a partir de diferentes tejidos como raíces (Hawkins & Lips, 1997; Zacharius *et al.*, 1985 citado por Granger, 2016) y tallos. Hay un reporte de inducción de callos en la variedad Pastusa Suprema en el que se utilizan entrenudos como explantes (Jiménez *et al.*, 2009); sin embargo, no se conocen reportes previos de la evaluación del tipo de explante en la callogénesis de esta variedad.

En la evaluación del efecto del tipo de explante se encontró que en general los nudos

de las raíces de la papa presentaron mayor organogénesis en comparación con los entrenudos, por lo cual en adelante se utilizaron los entrenudos como tejido de explante para la inducción de callos. El estado fisiológico del tejido meristemático de los nudos le confiere una mayor capacidad de respuesta regenerativa ante los estímulos hormonales porque este en la planta, tiene precisamente la función de formar nuevos tejidos (Granger, 2016).

Llanco (2013), menciona que, en el grado de formación de callos, existen diferencias considerables, según la aplicación de la concentración de regulador de crecimiento BAP. Llanco evaluó el grado de formación de callos en los diferentes tratamientos:

T1 (6% de sacarosa x sin BAP), T2 (6% de sacarosa x 2.5 mg/l BAP) y T5 (8% de sacarosa x sin BAP), no presentaron formación de callos. Mientras que los tratamientos T3 (6 % sacarosa x 5 mg/l BAP) y T6 (8% sacarosa x 2,5 mg/l BAP) presentan un rango de formación de callos de 1(escaso), se evidencia pequeñas formaciones de callos en algunas vitroplantas. El tratamiento T7 (8% sacarosa x 5mg/l BAP) muestra un rango de formación e callos de 2 considerada moderada, mientras que los tratamientos afectados severamente por la formación de masas de células desorganizadas fueron; T4 (6 % sacarosa x 10 mg/l BAP) y T8 (8% sacarosa x 10 mg/l BAP), encontrándose dentro del rango 3 abundante formación de callos.

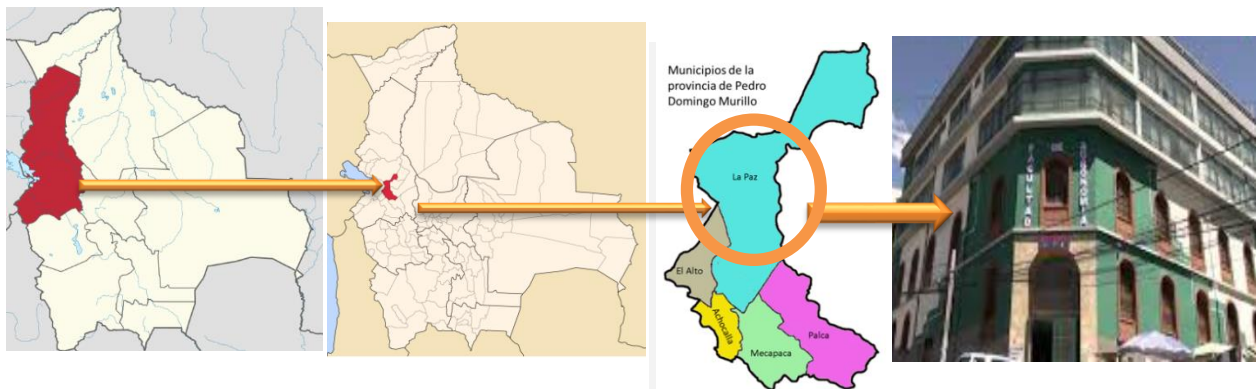
4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en los ambientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), geográficamente situada entre los paralelos 16°30'00,2" latitud Sur, y 68°08'26,2" longitud Oeste del Meridiano de Greenwich; a una altura aproximada de 3650 ms.n.m.

Figura 3.

Localización del área de investigación.



Nota: Elaborado en base a imágenes obtenidos en línea (Google, 2024).

El laboratorio de biotecnología vegetal de cultivos agrícolas cuenta con 2 áreas denominadas área sucia y área esterilizada. El área sucia es un área de lavado y un área de preparación y esterilización. El área esterilizada cuenta con salas de micropropagación de medios de cultivo, y la sala de crecimiento y conservación in vitro, con una iluminación entre 2000-4000 lux del fotoperiodo del área de crecimiento fue de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, para la etapa de introducción y multiplicación, controlado por un temporizador programable, manteniéndose a una humedad relativa entre 70-80% y temperatura de 18-20°.

4.2 MATERIALES

4.2.1 Material vegetal

Se utilizó plantas de papa de 4 y 5 meses de edad de dos variedades (imilla negra y waycha paceña) de *Solanum tuberosum*, provenientes de la Estación Experimental de KiphaKiphani perteneciente a la fundación PROINPA (promoción e investigación de cultivos andinos) localizado en el municipio de Viacha, en el departamento de, La Paz la ubicado geográficamente a: 16°40'27.19" Latitud Sur y 68°17'58.1" Longitud Oeste a una altitud de 3.873 ms.n.m. y distante a 41 km del centro de la ciudad de La Paz. A partir de estas plantas, se utilizaron hojas, raíz y tubérculos respectivamente.

4.2.2 Equipos e insumos de laboratorio

Autoclave horizontal, balanza analítica y de precisión, cámara de flujo laminar de aire, cámara de crecimiento, microondas, pH-metro, agitador magnético, refrigerador, termómetros de máximas y mínimas, destilador de agua, timer, pipetas graduadas, probetas, cajas Petri, vaso de precipitación, vasos de vidrio.

Hojas de bisturí N° 11, mangos para bisturí, pinzas largas, magnetita, tijeras, estilete, mechero de alcohol, papel aluminio, papel de madera, papel secante, toalla, parafilm, guardapolvos, barbijos, gorra quirúrgica, detergente, jabón desinfectante antibacterial, alcohol en gel, guantes de látex, cámara fotográfica, marcadores, planillas de registro.

En cuanto a los reactivos: Las sales minerales y vitaminas del medio basal MS Murashige y Skoog ,1962. La auxina de inducción a callos: ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Además de Hidróxido de sodio (NaOH al 1N), ácido clorhídrico (HCl al 1N), agua destilada esterilizada, agua destilada, alcohol etílico al 70 por ciento (v/v), hipoclorito de sodio (NaClO), myoinositol, Agar y sacarosa.

4.2.3 Material de gabinete

Planillas de registro, marcador, cámara fotográfica, equipo de computación, impresora, regla, programa informático infoStat.

4.3 METODOLOGÍA

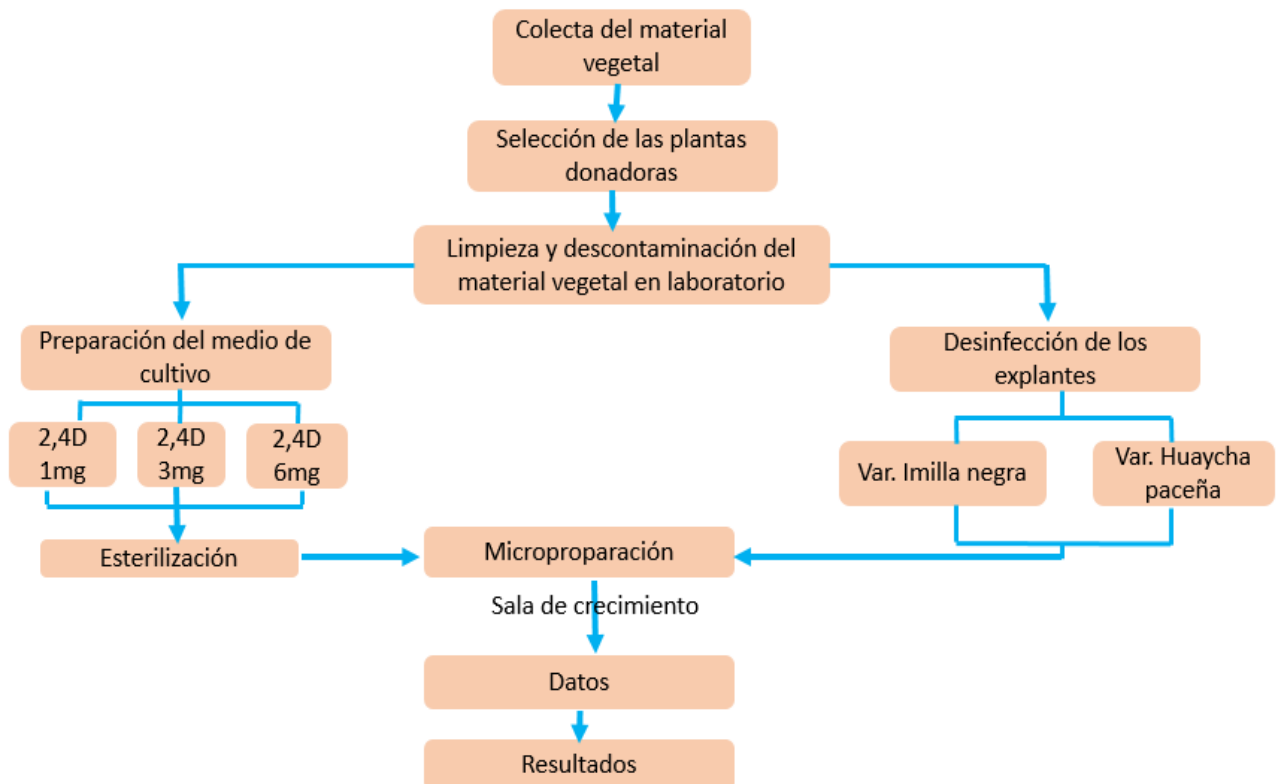
Se efectuaron ensayos preliminares, que incluyeron desde la realización de pruebas piloto, adecuación del laboratorio y los materiales (instrumental y vegetal).

4.3.1 Flujograma de la investigación

La figura 4 muestra los pasos principales que se llevaron a cabo para la realización de investigación.

Figura 4.

Diagrama de flujo de la investigación.



Nota: Elaborado en base a la metodología realizada dentro de laboratorio (2024).

4.3.2 Procedimientos experimentales de la investigación

4.3.2.1 Selección de las plantas

Se realizó una selección positiva de plantas del cultivo de papa (hojas, tallos, raíz y tubérculo) de la variedad imilla negra y waycha paceña, obtenidos en campo en un grupo de plantas de buen tamaño que no presentaron algún síntoma de enfermedad ni daños. Posteriormente se trasladó a laboratorio.

4.3.2.2 Preparación del medio de cultivo

En el laboratorio de biotecnología vegetal se usa un medio de cultivo estándar para los cultivos *in vitro*, la cual consta de: 30g/L de sacarosa, 100 mg/L de Myonositol, 4,5 g/L de medio base Murashige y Skoog (1962) y 6,5 g/L de agar agar; en un rango de 5,6 – 5,7 de pH.

Se preparó el medio de cultivos para cada una de las variedades. Cada uno de ellos fueron adicionados con una auxina de inducción a callos; al primer medio de cultivo se adicionó 1 ml/L de ácido 2,4D, el segundo con 3 ml/L de ácido 2,4D, el tercero con 6 ml/L de ácido 2,4D.

Se pesaron 20 mg de ácido 2,4D en la balanza de precisión, se diluyó en 20 ml de agua estéril en frascos de vidrio roturándolos con sus respectivos nombres y concentración 1mg/1ml.

En un vaso precipitado de 1000 ml se puso el magneto, dentro del vaso precipitado se llenó con agua esterilizada hasta 600 ml y se trasladó al agitador magnético, adicionando los reactivos en el siguiente orden, a medida que estos se vayan diluyendo completamente: sacarosa, medio base Murashige y Skoog (1962), myoinositol y el ácido 2,4D en su respectiva concentración. Se midió el pH estabilizando a un rango de 5,6- 5,7. Teniendo el pH optimo aforramos con agua esterilizada hasta los 1000 ml y finalmente se adicionó el agar hasta su dilución

completa.

Se lo llevó al microondas por un periodo de 15 minutos para la cocción del agar, luego se procedió de inmediato a distribuir a 15 ml de medio de cultivo por vaso, cubriéndose con parafilm, papel aluminio la parte de la boquilla de los tubos de ensayo y se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 120 °C, 1 atmósfera de presión por veinte minutos. Para concluir una vez esterilizados los tubos de ensayo se trasladaron a la cámara de flujo laminar para la introducción posterior de los explantes.

4.3.2.3 Esterilización de los materiales

El material utilizado (cajas Petri, pinzas, bisturí, etc.) fue lavado, secado y envuelto en papel madera, se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 120 °C y 1 atm de presión por veinte minutos. Luego los materiales fueron trasladados a la cámara de flujo laminar para su segunda esterilización a una radiación ultra violeta y aire estéril por 15 minutos.

4.3.2.4 Limpieza y descontaminación del material vegetal

Primeramente, se lavó toda la planta con agua corriente eliminando restos de tierra y suciedad. Para la desinfección en tubérculos se realizó la limpieza con la ayuda de detergente y una esponja, eliminando cuidadosamente los brotes e impurezas que estuvieran presentes en ellos realizando enjuagues con agua destilada; posteriormente se los seco y se envolvió entre papel sabana.

4.3.2.5 Desinfección de explantes

En cuanto a hojas, se emplearon secciones en promedio 1.5 x 2.0 cm, sometidos a desinfección externa mediante inmersión en una solución de etanol al 70% por 30 s y en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 10 m. Para eliminar los residuos de los agentes desinfectantes, se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril (ADE), con tiempos de 5 min. En la cámara de flujo laminar fueron

cortadas en dos partes de forma perpendicular a la nervadura principal.

Asimismo, bajo condiciones asépticas, se procedió a diseccionar las raíces y los tubérculos de las dos variedades de papa: los explantes de raíz tenían una longitud aproximada de 5 mm de largo y los tubérculos tenían una dimensión aproximada de 8 a 10 mm por lado, se desinfectó los explantes mediante inmersión en solución de etanol al 70% por 30 s y en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 10 min.

4.3.2.6 Introducción de los explantes

Los brotes diseccionados se llevaron a cajas Petri, donde se realizaron cortes con bisturí y pinzas, descartando los extremos basales que presentan necrosis en los tejidos, por efecto de los agentes desinfectantes. Finalmente se cultivó a razón de un explante por vaso, donde la mitad del explante se enterró en el medio de cultivo preparado.

Cada explante fue sembrado en un vaso preparado con 15 ml de medio básico MS luego, con los respectivos registros de la variedad y fecha de la actividad, transfiriéndolos a sala de crecimiento o incubación bajo ambiente controlado (temperatura, humedad relativa, fotoperiodo) respectivamente.

4.4 Análisis estadístico

4.4.1 Etapa de introducción

4.4.1.1 Diseño experimental

Se utilizó el Diseño Experimental Completamente al azar (DCA) con arreglo bifactorial con los factores de estudio A factor correspondiente a la variedad (Waycha paceña e Imilla negra) y B factor correspondiente a las diferentes concentraciones (1, 3, 6 ml/L) con 10 repeticiones respectivamente de ácido 2,4 diclorofenoxiacético.

4.4.1.2 Modelo lineal aditivo

El modelo aditivo lineal estadístico utilizado para el diseño es el siguiente:

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

Donde:

Y_{ijk} = Una observación cualquiera.

μ = Media General.

α_i = Efecto del i-ésimo factor A (variedades de papas nativas).

β_j = Efecto del j-ésimo factor B (concentración de fitohormonas).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre i-j (efecto de la interacción variedades de papa nativas*concentración de fitohormonas).

ϵ_{ijk} =Error Experimental.

4.4.1.3 Factores de estudio para la etapa de introducción

Factor A = Variedad de papa nativa.

A1 = Waycha paceña

A2 = Imilla negra

Factor B = Concentraciones de fitohormona.

B1 = 1 ml/L ácido 2,4 D

B2 = 3 ml/L ácido 2,4 D

B3 = 6 ml/L ácido 2,4 D

Tabla 1.*Distribución de los factores de estudio para raíz, hoja y tubérculo*

Distribución		Tratamientos	Combinación	Descripción	Repeticiones	Unidad experimental
Factor A	Factor B					
A1	B1	T1	A1 x B1	Var. waycha paceña x 1 ml/L 2,4D	10	10
	B2	T2	A1 x B2	Var. waycha paceña x 3 ml/L 2,4D	10	10
	B3	T3	A1 x B3	Var. waycha paceña x 6 ml/L 2,4D	10	10
A2	B1	T4	A2 x B1	Var. Imilla negra x 1 ml/L 2,4D	10	10
	B2	T5	A2 x B2	Var. Imilla negra x 3ml/L 2,4D	10	10
	B3	T6	A2 x B3	Var. Imilla negra x 6 ml/L 2,4D	10	10
Total de unidades experimentales						60

Nota: En la distribución de cada órgano rendía 60 unidades (los tres órganos dan 180 unidades experimentales).

4.4.1.4 Croquis del diseño experimental en la etapa de introducción

La siguiente tabla presenta el croquis experimental y la distribución de las unidades de estudio, con un diseño experimental completamente al azar (DCA).

Figura 5.

Croquis del diseño experimental de la investigación.

		TRATAMIENTOS					
R E P E T I C I O N E S	R1	T2	T4	T6	T1	T3	T5
	R2	T3	T5	T4	T1	T2	T6
	R3	T4	T2	T5	T3	T6	T1
	R4	T5	T2	T1	T4	T3	T6
	R5	T4	T5	T2	T6	T1	T3
	R6	T2	T1	T3	T5	T6	T4
	R7	T3	T2	T6	T4	T1	T5
	R8	T1	T3	T5	T6	T4	T2
	R9	T5	T6	T2	T1	T3	T4
	R10	T6	T3	T4	T2	T5	T1

Nota: Elaborado en base al orden puesto en laboratorio, (2024).

4.4.2 Variables de respuesta en la etapa de introducción

4.4.2.1 Porcentaje de contaminados

Es la introducción accidental de microorganismos como la presencia de bacterias,

hongos o algún agente contaminante externo, la relación define número de explantes contaminados entre número de vitroplantas totales por cien. Por tanto, el dato expresa el número de explantes contaminados en porcentajes.

4.4.2.2 Porcentaje de oxidación

Es la alteración que se produce al entrar en contacto con el oxígeno del aire. En el tubérculo ocurre porque cuando se rompen sus tejidos se libera una enzima llamada polifenoloxidasas (PFO) que tiene la capacidad de oxidar. Se evaluó el número de explantes que presentaron cambio de color (café, marrón o rojiza) en el medio de cultivo y el corte (raíz y tubérculo); esta variable fue evaluada por cuantificación y observación directa.

4.4.2.3 Porcentaje de supervivencia

Expresa en número de callos que lograron sobrevivir en porcentaje. Se realizó el porcentaje de callos que lograron expresar su totipotencia favorablemente (los que sobrevivieron), en relación al número de plántulas desarrolladas entre el número de callos totales por cien.

4.4.2.4 Formación de callos

Se observó las explantes en los cuales hubo formación de callo, cada 15 días después de la introducción durante tres meses. Los datos obtenidos en laboratorio se transformaron de discontinuo a continuo con la fórmula: $\sqrt{x} + 1$.

4.4.2.5 Explantes sin respuesta

Se realizó el conteo de las explantes que no lograron desarrollar callo alguno, la evaluación se realizó a los 40 y 70 días después de la introducción. Los datos obtenidos se transformaron de discontinuo a continuo con la fórmula: $\sqrt{x} + 1$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis del porcentaje de contaminación, oxidación y sobrevivencia de explantes de papa en la formación de callos

5.1.1 Porcentaje de contaminación

Se identificó el número total de explantes contaminados (presencia de hongos, bacterias o agentes contaminantes externos) este valor se expresó en porcentaje.

MUESTRA DE HOJA

Tabla 2.

Porcentaje de contaminación del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantes sin contaminación	Explantes contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
Waycha paceña	27	3	30	10
Imilla negra	29	1	30	3.3
Total	56	4	60	13.3

En la tabla 2, se evidencia que el porcentaje de explantes contaminados es de 13,3 % por tanto el restante 86,7 % son explantes no contaminados. En cuanto a los datos individuales, la variedad waycha paceña obtuvo una contaminación promedio es de 10% mientras que el cultivo in vitro en base a tejido de hojas de imilla negra solo 3.3%.

Tabla 3.

Porcentaje de contaminación del factor B: concentraciones de 2,4D.

Factor B concentraciones	Explantes sin contaminación	Explantes contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
Total	56	4	60	20

En la tabla 3, se observa el porcentaje de contaminación en explantes es del 20 % y el porcentaje de plantas sanas será del 80 %. (no contaminadas). La dosis de 1ml/L obtuvo 10% de contaminados mientras que las dosis 3 y 6 ml/L solo 5% cada uno. Por otro lado, Gallo (2019), indica que esto es debido a la introducción accidental de microorganismos como la presencia de bacterias y hongos, en su ensayo el porcentaje de vitroplantas contaminadas es de 10,3% para el tipo de corte y un 33,32% de contaminación para las concentraciones de (IAB), al respecto el valor obtenido en el presente trabajo fue del 13.3% de contaminación para la variedad y 20% de contaminación para las concentraciones.

MUESTRA DE RAÍZ

Tabla 4.

Porcentaje de contaminación del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantes sin contaminación	Explantes contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
Waycha paceña	27	3	30	10
Imilla negra	28	2	30	6.7
Total	55	5	60	16.7

En la tabla 4, se observa que el porcentaje de contaminación del factor A (variedad de papa nativa) en cultivo en base a raíz fue del 16.7%, donde existe un 83.3% de explantes no contaminadas, esto atribuible al estricto protocolo de desinfección del material vegetal e instrumental de laboratorio empleados. la variedad waycha obtuvo un porcentaje de contaminación de 10% mientras que la variedad Imilla negra solo 6.7%.

Tabla 5.*Porcentaje de contaminación del factor B: concentraciones de 2,4D en raíz*

Factor B concentraciones	Explantos sin contaminación	Explantos contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
Total	55	5	60	25

Como se puede observar en la tabla 5, el porcentaje de contaminación de cultivos en base a tejido de raíz botánica para el factor B (3 concentraciones de ácido 2,4D empleado) es de 25 %, donde hay el 75 % de explantes no están contaminadas, de un total de 60 explantes en estudio. Las dosis 1 y 6 ml/L obtuvieron 10% de contaminados mientras que la dosis 3 ml/L solo 5%.

La presencia de agentes contaminantes en la etapa de micropropagación según Gutiérrez (2009), ascienden a un 20% los agentes contaminantes identificados fueron de naturaleza fúngica. Donde Caillante (2017), obtuvo un porcentaje de contaminación del 15.5% para el tipo de explante y un 26,65% de contaminación para las concentraciones de (AG)3, al respecto el valor obtenido en el presente trabajo fue del 16.7% para la variedad y 25% de contaminación para las concentraciones.

MUESTRA DE TUBÉRCULO

Tabla 6.*Porcentaje de contaminación del factor A: Variedad de papa nativa.*

Factor A variedad	Explantos sin contaminación	Explantos contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
Waycha paceña	28	2	30	6.7
Imilla negra	27	3	30	10
Total	55	5	60	16.7

En la tabla 6, se evidencia que el porcentaje de explantes no contaminadas, es de 83,3 %, donde existe el 16,7 % de explantes contaminadas, en el factor A: variedad de papa (waycha pacaña e imilla negra), de una población total de 60 explantes en estudio. La población de explantes de variedad waycha obtuvo un porcentaje de contaminación de solo 6.7 % de contaminados mientras que la imilla negra 10%.

Tabla 7.

Porcentaje de contaminación del factor B: concentraciones de 2,4D

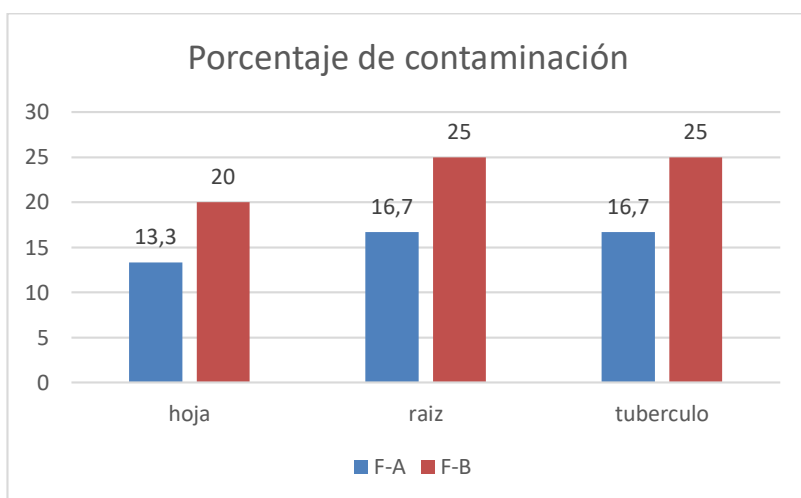
Factor B concentraciones	Explantes sin contaminación	Explantes contaminadas	Total	Porcentaje de contaminación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
Total	55	5	60	25

En la tabla 7, se observa el porcentaje de contaminación que es de 25 %, donde hay el 75 % de explantes no contaminadas. Para la evaluación de dosis se obtuvo que las dosis 1 y 6 ml/L obtuvieron un 10% de población contaminada, mientras que la población sometida a la dosis de 3 ml/l solo obtuvo un 5% de contaminados.

Menciona Monrroy (2009), son considerados como agentes contaminantes comunes en laboratorios de cultivos de tejidos y corrobora la presencia de contaminación fúngica en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro* de papa. Asimismo, Llanco (2013), obtuvo un porcentaje de contaminación del 20% en la variedad de papa Imilla negra.

Figura 6.

Resultados y comparación del porcentaje de contaminación.



Nota: La figura se elaboró con los resultados obtenidos en laboratorio.

En la figura 6 se observa que se presentó menor contaminación en los cortes de hoja tanto en el factor A como en el factor B con una contaminación del 13.3% y 20% respectivamente, en cuanto a raíz y tubérculo, ambos presentaron el mismo porcentaje de contaminación siendo del 16.7% y 25% en ambos cortes.

5.1.2 Porcentaje de oxidación

Para determinar esta variable de respuesta se cuantifico el número de explantes y medios de cultivo que presentaron una tonalidad marrón, café o rojiza, el cual indica la presencia de oxidación y fue medida por observación directa de los vasos.

MUESTRA DE HOJA

Tabla 8.

Porcentaje de oxidación del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantes sin oxidación	Explantes oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
Waycha paceña	30	0	30	0
Imilla negra	30	0	30	0
Total	60	0	60	0

Se puede observar en la tabla 8 que, el porcentaje de explantes oxidados, es de 0 %, lo que indica que ninguno de los 60 explantes se oxidaron, por tanto, el 100 % de los explantes en hoja no presentan oxidación, para el factor A variedad de papa nativa de cultivo en base a tejido de hoja.

Tabla 9.

Porcentaje de oxidación del factor B: concentraciones de 2,4D

Factor B concentraciones	Explantes sin oxidación	Explantes oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
3 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
6 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
Total	60	0	60	0

En la tabla 9, se observa un porcentaje de oxidación de 0 %, donde el 100 % de los explantes no se oxidaron, para el factor B, de 3 concentraciones de 2,4D en hoja, de un total de 60 vitroplantas en estudio.

Caillante (2017), explica que en su ensayo el porcentaje de explantes oxidados es de 0% para el tipo de explantes y un 0% en el porcentaje de oxidación para las concentraciones de (AG)3, al respecto los valores obtenidas en el presente trabajo fue 0% de oxidación para variedad y 0% de oxidación para las concentraciones.

MUESTRA DE RAÍZ

Tabla 10.

Porcentaje de oxidación del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantes sin oxidación	Explantes oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
Waycha paceña	29	1	30	3
Imilla negra	27	3	30	10
Total	56	4	60	13

En la tabla 10, se evidencia que el porcentaje de explantes oxidados, que es de 13 %, donde el 87 % de los explantes no presenta oxidación, para el factor A variedad de papa nativa (waycha paceña e Imilla negra) la variedad waycha obtuvo un porcentaje de oxidación de 3% mientras que la variedad Imilla negra 10%.

Tabla 11.

Porcentaje de oxidación del factor B: concentraciones de 2,4D

Factor B concentraciones	Explantes sin oxidación	Explantes oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
Total	56	4	60	20

La tabla 11 nos muestra que el porcentaje de oxidación es del 20 %, por tanto, se obtuvo el 80 % de los explantes sin oxidación, Las dosis 1 ml/L obtuvo 10% de oxidados mientras que las dosis 3 y 6 ml/L solo 5% cada uno.

Gallo (2019), explica que en su ensayo el porcentaje de explantes oxidados es de 0% para el tipo de corte y un 0% en el porcentaje de oxidación para las concentraciones de (AIB), al respecto los valores obtenidas en el presente trabajo fue 13% de oxidación para variedad y 20% de oxidación para las concentraciones, esto puede ser debido a que el tipo de explante es diferente.

El mismo autor también indica que la oxidación es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco, produciendo una coloración rojiza, amarillenta o café, depende del tipo de material que se emplee. Los compuestos fenólicos actúan como inhibidores del crecimiento emitidos por el propio explante, capaces de causar el envejecimiento y muerte del mismo.

MUESTRA DE TUBÉRCULO

Tabla 12.

Porcentaje de oxidación del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantos sin oxidación	Explantos oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
Waycha paceña	27	3	30	10
Imilla negra	28	2	30	7
Total	55	5	60	17

En la tabla 12, se observa que el porcentaje de explantes oxidados, que es de 17 %, donde el 87 % de explantes no presenta oxidación, el tamaño de la población fue de un total de 60 explantes en estudio de los cuales la variedad waycha obtuvo un 10 % de oxidados mientras que la imilla negra un 7 % de población oxidada.

Tabla 13.

Porcentaje de oxidación del factor B: concentraciones de 2,4D

Factor B concentraciones	Explantos sin oxidación	Explantos oxidadas	Total	Porcentaje de oxidación (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
3 ml/L ácido 2,4 D	16	4	20	20
6 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
Total	55	5	60	25

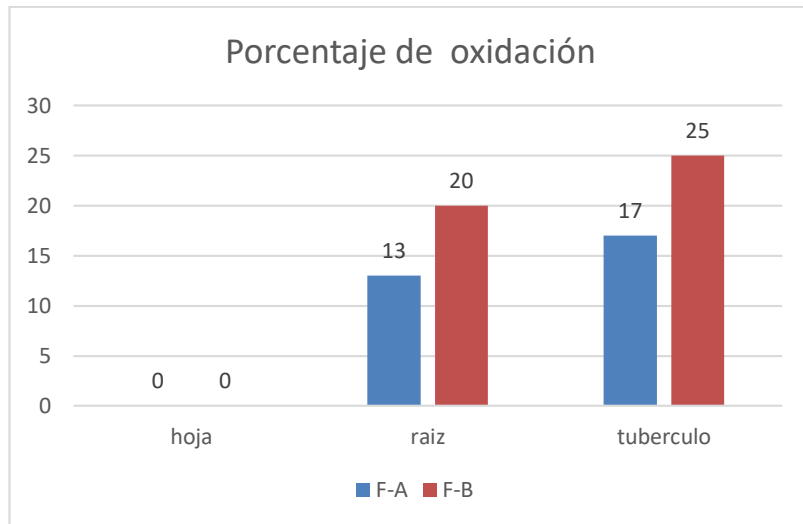
La tabla 13 evidencia un porcentaje de oxidación de 25 %, en el cual se observa que un 75 % de los explantes no se oxidaron. Las dosis de 3 ml/L obtuvo un 20% de oxidados; la dosis de 6 ml/L rindió un 0% de oxidados siendo el más bajo; mientras que los cultivos sometidos a dosis de 1 ml/L obtuvieron 5% de explantes oxidados.

Llanco (2013), menciona que la oxidación se da principalmente por la desinfección superficial de los explantes, con altas concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) o por la prolongada exposición al compuesto químico, el mismo obtuvo en su ensayo

un porcentaje de contaminación del 10% en la variedad de papa Imilla negra.

Figura 7:

Resultados y comparación del porcentaje de oxidación.



Nota: La figura se realizó con los datos en porcentaje tomados en laboratorio.

Como se puede observar en la figura 7 los explantes de hoja obtuvo un 0% de oxidación, seguido por raíz con un 13% de oxidación en el factor A y un 20% de oxidación en el factor. Finalmente, el corte que obtuvo mayor oxidación es en el tubérculo tanto en el factor A como para el factor B, donde se obtuvo un 17% y 25% de oxidación respectivamente.

5.1.3 Porcentaje de sobrevivencia

Se identificó el número total de explantes que se desarrollaron, (observando su crecimiento), este valor se expresó en porcentaje.

MUESTRA DE HOJA

Tabla 14.

Porcentaje de supervivencia del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantos vivos	Explantos muertos	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
waycha paceña	26	4	30	13.3
imilla negra	27	3	30	10
Total	53	7	60	23.3

En la tabla 14, se aprecia que el porcentaje de explantes en hoja para el factor A (variedades de papa nativa), es del 76.7 %, donde el 23.3 % de explantes con callo presentan mortandad. En el caso de variedad huaycha el porcentaje de sobrevivencia fue del 13.3 % mientras que los explantes de variedad imilla negra 10%.

Tabla 15.

Porcentaje de sobrevivencia del factor B: concentraciones de 2,4D

Factor B concentraciones	Explantos vivos	Explantos muertos	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
3 ml/L ácido 2,4 D	18	2	20	10
6 ml/L ácido 2,4 D	16	4	20	20
Total	53	7	60	35

El porcentaje de sobrevivencia en cultivo de hoja se observa en la tabla 15 donde existe un 65% de sobrevivencia, y el otro 35 % es de explantes muertos. Las dosis de 1, 3 y 6 lm/L obtuvieron 5,10 y 20 % de explantes sobrevivientes respectivamente.

Caillante (2017), explica que se logró que el porcentaje de sobrevivencia es de 75% para el tipo de explantes y un 66.7% en el porcentaje de sobrevivencia para las concentraciones de (AG)3, al respecto los datos obtenidos en el presente trabajo fue 76.7% de sobrevivencia para la variedad y 65% de sobrevivencia para las

concentraciones.

MUESTRA DE RAÍZ

Tabla 16.

Porcentaje de sobrevivencia del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantos vivos	Explantos muertos	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
waycha paceña	30	0	30	0
Imilla negra	28	2	30	6.7
Total	58	2	60	6.7

En la tabla 16, nos muestra que el porcentaje de sobrevivencia en raíz que es de 93.3 %, donde existe un 6.7 % de explantes muertos en la variedad Imilla negra, en el factor A (variedad de papa nativa). la variedad waycha obtuvo un 0 % de muertos y la variedad Imilla negra 6.7% de explantes muertos. La variedad waycha obtuvo un 0 % de muertos y la variedad Imilla negra 6.7% de explantes muertos

Tabla 17.

Porcentaje de sobrevivencia del factor B: concentraciones de 2,4D.

Factor B concentraciones	Explantos vivos	Explantos muertos	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
Total	58	2	60	10

En la tabla 17, se observa el porcentaje de mortandad en raíz que es de 10 % donde el 90 %, de los explantes presentan supervivencia. Las dosis 3 y 6 ml/L obtuvieron 5% de mortalidad cada uno, mientras que la dosis 1 ml/L obtuvo 0% de explantes muertos.

Asimismo, Gallo (2019), indica que se logró que el porcentaje de sobrevivencia es de 89.59% para el tipo de corte y un 75.01% en el porcentaje de sobrevivencia para las

concentraciones de (AIB), al respecto los valores obtenidos en el presente trabajo fue 93.3% de sobrevivencia para la variedad y 90% de sobrevivencia para las concentraciones.

MUESTRA DE TUBÉRCULO

Tabla 18.

Porcentaje de sobrevivencia del factor A: Variedad de papa nativa.

Factor A variedad	Explantos vivos	Explantos muertos	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
waycha paceña	28	2	30	6.7
imilla negra	28	2	30	6.7
Total	56	4	60	13.4

En la tabla 18, se evidencia el porcentaje de mortalidad en cultivo de tejidos en base a tubérculo es del 13.4 %, dando un 87 % de explantes vivos. Ambas variedades (waycha e imilla) obtuvieron 6.7 % de explantes muertos.

Tabla 19.

Porcentaje de supervivencia del factor B: concentraciones de 2,4D

Factor B concentraciones	Explantos vivos	Explantos muertas	Total	Porcentaje de Mortalidad (%)
1 ml/L ácido 2,4 D	20	0	20	0
3 ml/L ácido 2,4 D	19	1	20	5
6 ml/L ácido 2,4 D	17	3	20	15
Total	56	4	60	20

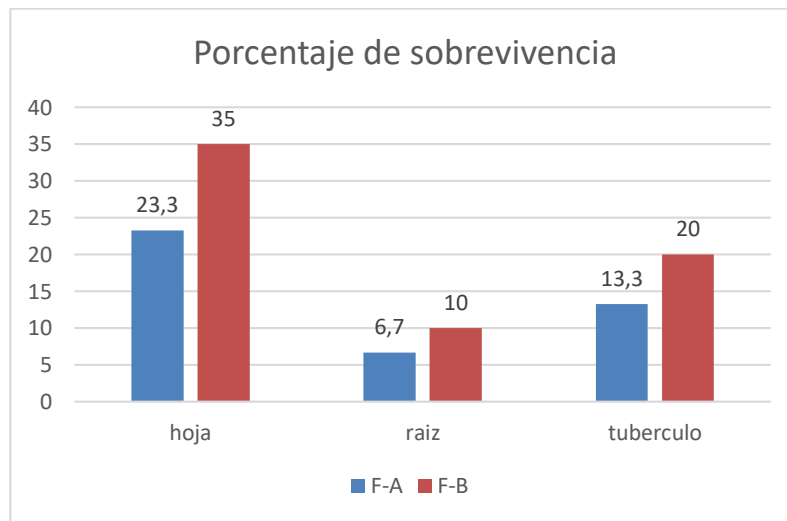
La tabla 19 nos muestra el porcentaje de sobrevivencia en tubérculo con distintas dosis, que es de 80 %, dando un 20 % de explantes muertos. Las dosis 1, 3 y 6 ml/L obtuvieron 0; 5 y 15% de explantes muertos respectivamente.

Al respecto Gutiérrez (2009), indica una de las desventajas para iniciar el cultivo in

vitro, sin duda es el porcentaje de sobrevivencia, ya que después del establecimiento dependerá del manejo adecuado de los explantes, del medio de cultivo y del tipo de órgano a emplear, en este caso es recomendable utilizar brotes jóvenes de tubérculos de papa. Llanco (2013), indica que se logró que el porcentaje de sobrevivencia es de 70%.

Figura 8:

Resultados y comparación del porcentaje de sobrevivencia.



Nota: La figura se realizó con los datos en porcentaje tomados en laboratorio.

La figura 8 nos muestra que existe mayor mortandad en los callos de hoja teniendo un 23.3% en el factor A y un 35% en el factor B, seguido de los callos en tubérculo, donde existe un 13.35 de mortandad para el factor A y un 20% en el factor B, finalmente y por tanto el que tuvo mayor sobrevivencia son los callos en raíz con tan solo un 6.7% de mortandad en el factor A y un 10% en el factor B.

5.2 Evaluacion del efecto del ácido 2,4D en sus tres concentraciones, en diferentes explantes de raíz, tubérculo y hoja.

5.2.1 Formación de callos obtenidos por explantes

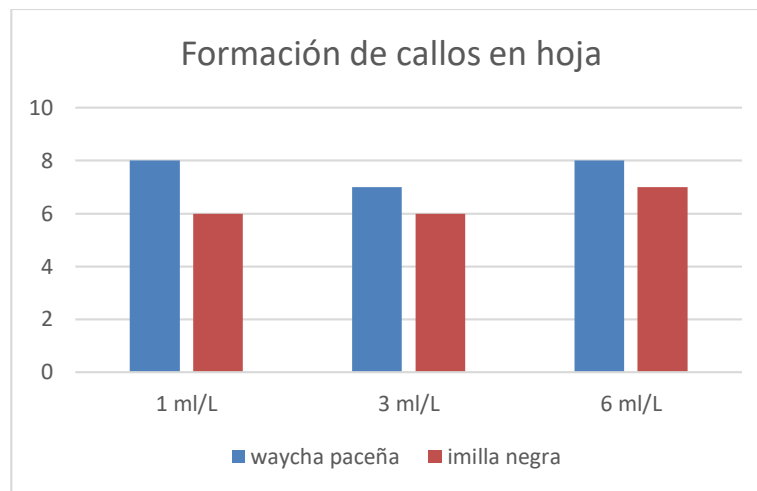
MUESTRA DE HOJA

Una vez realizado el análisis de varianza para la formación de callos en hoja, se obtuvo un coeficiente de variabilidad, fue de 8.11% lo que permite otorgar la confiabilidad a los datos obtenidos.

Se observada que todos los tratamientos y la interacción son no significativas (NS), lo que indica que, en el grupo de tratamientos evaluados, las seis son similares.

Figura 9.

Resultados y comparación para formación de callos obtenidos en hoja.



Nota: La figura se elaboró con los resultados obtenidos en laboratorio.

Como se observa en la figura 9, a una concentración de 1 ml/L se tiene 8 y 6 callos para las variedades waycha paceña e imilla negra respectivamente, con 3 ml/L se tiene 7 y 6 callos, mientras que para la dosis 6 ml/L la var. Waycha tiene 8 callos y la var. Imilla negra 7 callos formados.

Por otro lado, Lee Y.I. y Lee N. (2003), indican que el 2,4-D fue esencial en su ensayo para que pueda darse la formación de callo. Por su parte, Espinosa *et al.* (2012), explican que los resultados de su investigación, demostraron que el empleo de explantes de hojas, pecíolos y tallos en el cultivo *in vitro* de Morera permitió altos valores de formación de callos, y que el 2,4-D en el medio de cultivo resultó

imprescindible. Lo que concuerda con el presente experimento ya que también demuestra que es fundamental el uso de esta auxina para la formación de callos.

MUESTRA DE RAÍZ

Los resultados obtenidos para la variable formación de callos en raíz de dos variedades de papa nativa con diferentes concentraciones de 2,4 D se presentan en la tabla 2, descritos a continuación.

Tabla 20.

Análisis de varianza para formación de callos obtenidos en raíz.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
F-A	0.02	1	0.02	1.31	0,2576(NS)
F-B	0.08	2	0.04	3.03	<0,0500 (*)
F-A * F-B	0.06	2	0.03	2.05	0.1392(NS)
Error	0.74	54	0.01		
Total	0.90	59			

CV = 10.0%

NOTA: CV=Coeficiente de variación; **=altamente significativos; *= significativo; NS=No significativo.

El Coeficiente de Variación es igual a 10.0 %, esto indica que los datos son confiables y el manejo del experimento ha sido bueno.

Como se observa en la tabla 20, existen diferencias significativas entre los niveles de concentración de 2,4D (factor B) siendo la dosis 6 ml/L la más óptima con obtención de 75 % de callos. En tanto para la interacción variedad de papa nativa por concentración de 2,4D es no significativa.

Los datos obtenidos en laboratorio (sin la transformación de datos para el ANVA) fue que de 60 explantes 40 formaron callos. Es decir 66, 67% formaron callo.

Tabla 21.

Prueba de Duncan para la comparación de medias del factor B diferentes concentraciones de 2,4 D.

Facto B	Conteo	Medias	Agrupación
Concentración de 2,4 D	simple	transformado	de medias
6 ml/L acido 2,4 D	15 de 20	1.22	A
1 ml/L acido 2,4 D	14 de 20	1.17	AB
3 ml/L acido 2,4 D	13 de 20	1.13	B

Nota: Medias con una letra común son similares.

En la tabla 21, se puede observar que la concentración de 2,4-D tiene influencia en la obtención del número de callos. Al aplicar una concentración de 6 [ml/l] de 2,4-D se obtuvo 15 callos de 20 explantes (75% obtuvo callos) y al reducir la concentración en 1 [ml/l] de 2,4-D el promedio disminuye a 14 callos (70 %), sin embargo, ambas concentraciones reportan obtención de callos. La dosis estadísticamente diferente por resultados más bajos es 3 ml/L cuyo promedio de callos obtenidos es de 13 explantes de un total de 20 (65 %).

Según Espinosa *et al.* (2012), la composición básica del medio de cultivo suplementado con el regulador de crecimiento (2,4-D) favorecieron la proliferación celular en segmentos y probablemente, esta respuesta se presentó por el efecto sinérgico de la presencia de reguladores endógenos en las condiciones físicas de cultivo, que promovieron modificaciones del metabolismo celular y por consiguiente se indujo la respuesta morfogénica de división en las células (George, 2008).

MUESTRA DE TUBÉRCULO

En el análisis de varianza que se presenta en la Tabla 9, se describen los resultados de las fuentes de variabilidad de la variable formación de callo en tubérculo y son descritos a continuación.

Tabla 22.*Análisis de varianza para formación de callos obtenidos en tubérculo.*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
F-A	0.05	1	0.05	2.32	0,1333(NS)
F-B	0.36	2	0.18	9.15	0,0004 (**)
F-A * F-B	0.18	2	0.09	4.50	0.0156 (*)
Error	1.06	54	0.02		
Total	1.65	59			

CV = 12.96%

NOTA: CV=Coeficiente de variación; **=altamente significativos; *= significativo; NS=No significativo.

El Análisis de Varianza, para la variable de respuesta formación de callos en tubérculo (tabla 22), indica un coeficiente de variación de 12.96 % indicando buen manejo de las unidades experimentales. El factor A, (Variedades waycha e imilla) resultaron ser no significativas en la formación de callos.

En cuanto al factor-B (Dosis de 2,4 D empleadas) se observa que existen diferencias altamente significativas (**), por lo cual se realiza la siguiente comparación Duncan.

Tabla 23.*Prueba de Duncan para la comparación de medias del factor B diferentes concentraciones de 2,4 D.*

Facto B	Conteo	Medias	Agrupación
Concentración de 2,4 D	simple		de medias
6 ml/L ácido 2,4 D	9 de 20	1.19	A
3 ml/L ácido 2,4 D	3 de 20	1.06	B
1 ml/L ácido 2,4 D	0 de 20	1.00	B

Nota: Medias con una letra común son similares.

Observando la Tabla 23 (Prueba Duncan) para el factor B (dosis de 2,4D empleadas) existe diferencia significativa siendo la dosis 6 ml/L de 2,4D la que mejor producción de callos obtuvo, 9 callos de 20 explantes es decir 45 % de los explantes formaron callos. Mientras que la dosis de 1 ml/L produjo 0 callos es decir 0 % de obtención de callos. En cuanto al tratamiento de 3 ml/ L es un valor intermedio de 3 callos por cada 20 explantes; 15 % de los explantes formaron callos.

En cuanto a la interacción de factores, FA x FB, resultó que las diferencias son significativas (*) indicando que los factores de estudio actúan dependientemente uno del otro para el desarrollo de callos en el tubérculo.

Tabla 24.

*Análisis de varianza de efectos simples para Interacción variedad*concentración en relación a la formación de callos en tuberculo.*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Variedad (1 ml/L)	1	0.000	0.0000	0.000	1.000(NS)
Variedad (3 ml/L)	1	0.00858	0.0086	0.4355	0.5121 (NS)
Variedad (6 ml/L)	1	0.21447	0.2145	10.8871	0.00172 (**)

En la tabla 24, de análisis de interacción variedad por concentración, con respecto a la formación de callos en tubérculo, se pueden apreciar diferencias significativas, en respuesta a la variedad y la concentración de 6 mg/L y efectos no significativos para las concentraciones 1 y 3 mg/L.

Tabla 25.

*Análisis de varianza de efectos simples para Interacción concentración * variedad en relación a la formación de callos en tuberculo.*

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Concentración (Waycha paceña)	2	0.04575	0.0229	1.1613	0,3208(NS)
Concentración (Imilla negra)	2	0.49184	0.2459	12.4839	0.000349 (**)

En la tabla 25, de análisis de interacción concentración por variedad, con respecto a la formación de callos en tubérculo, se pueden apreciar diferencias altamente significativas, en respuesta de la concentración (var. Imilla negra) y efecto no significativo para la concentración (var. Waycha Paceña).

En los análisis de varianza de efectos simples muestran diferencias en la interacción, donde el promedio más bajo es de 0 callos y se obtiene a una concentración de 1 ml/L en ambas variedades, mientras que con la dosis de 3 ml/L en la variedad waycha paceña se obtuvieron 2 callos y en la var. imilla negra se obtuvo 1 callo. En cuanto a las interacciones de var. waycha con 6 ml/L da un rendimiento de 2 callos, sin embargo, la mejor interacción resulto ser 6ml/L en la variedad imilla negra cuyo número de callos es de 9 callos obtenidos.

La formación de callos está dada, por el tipo de explantes a usarse. La morfogénesis tiene un fundamento genotípico y la respuesta diferencial del material vegetal de partida va a estar condicionada y relacionada por esto. Cada especie presenta respuestas diferentes bajo las mismas condiciones de cultivo (Martin, Chong y Pérez, 2015).

Según Sadino (2015). Las auxinas promueven tanto la división como el crecimiento celular. Por consiguiente, se pudo evidenciar en la presente investigación que, la variación de concentración de la auxina 2,4-D afectó en el aumento de número de

células indiferenciadas (callos).

5.2.2 Explante sin respuesta

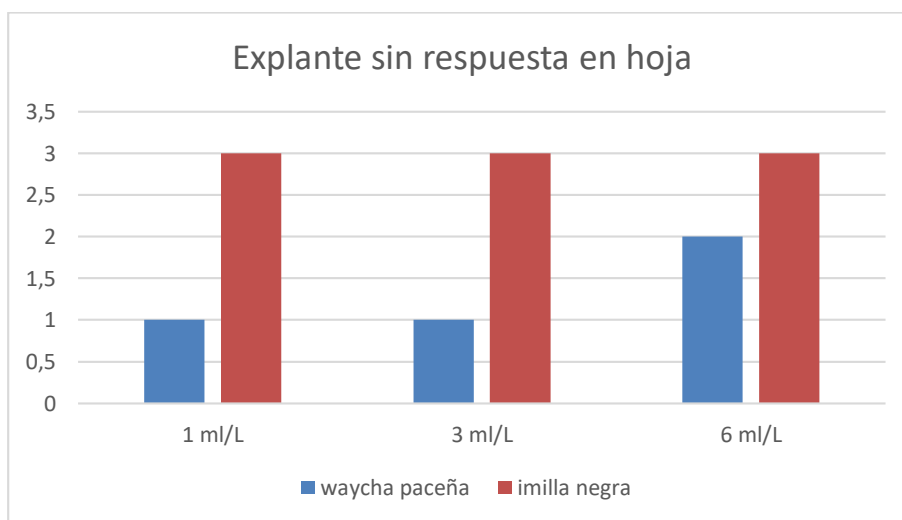
MUESTRA DE HOJA

En la variable explante sin respuesta se realizó el respectivo Análisis de Varianza (ANVA), para hoja en las diferentes fuentes de variabilidad, donde el Coeficiente de Variabilidad fue de 16.10%, el cual indica un buen manejo de las unidades experimentales y salió no significativo (NS) en todos los factores y la interacción.

Los explantes sin respuesta son estadísticamente iguales para todas las dosis aplicadas sobre hoja. Es decir, ninguna cantidad de dosis interfiere en aumentar la inhibición de crecimiento de callo por su efecto herbicida, de igual manera la variedad o la interacción entre ambos factores.

Figura 10.

Resultados y comparación para explante sin respuesta en hoja.



Nota: La figura se elaboró con los resultados obtenidos en laboratorio.

Como se observa en la figura 10 que, en hoja, para las variedades waycha paceña e imilla negra a una concentración de 1 y 3 ml/L se tiene 1 de 20 y 3 de 20 explantes sin respuesta respectivamente, mientras que para la dosis 6 ml/L la var. Waycha tiene 2

explantes sin respuesta y la var. Imilla negra 3 explantes que no tienen respuesta.

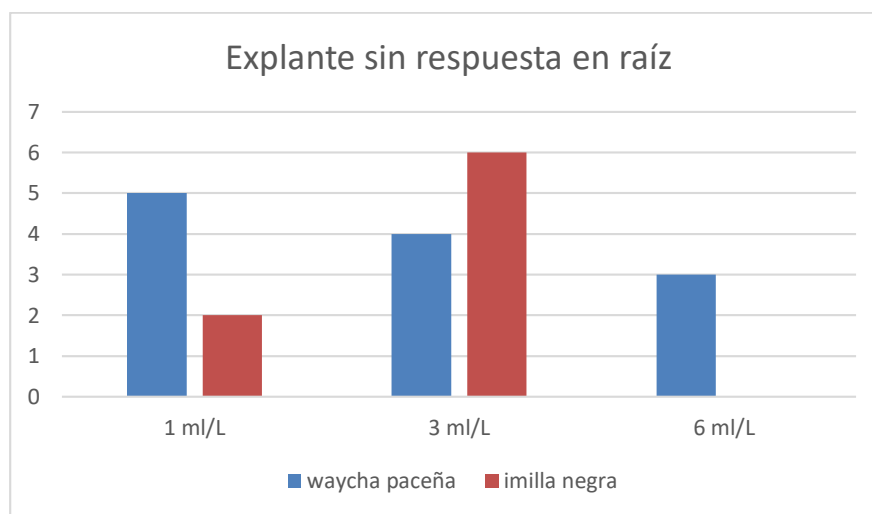
Se puede atribuir el resultado en hoja que debido a que estuvo en un ambiente controlado, con mismas condiciones de horas luz y temperatura, ayudó a que haya un mejor manejo y no afecten el experimento.

MUESTRA DE RAÍZ

Se realizó el respectivo análisis de varianza para raíz en la variable explantes sin respuesta en el cual dio un coeficiente de variabilidad fue de 10.80 (en el rango aceptable) indicando un buen manejo de las unidades experimentales y se observó que no existen diferencias significativas (NS) en el factor A y factor B de igual manera en las interacciones resultantes.

Figura 11.

Resultados y comparación para explante sin respuesta en raíz.



Nota: La figura se elaboró con los resultados obtenidos en laboratorio.

Como se observa en la figura 11, a una concentración de 1 ml/L se tiene 5 y 2 vitroplantas sin respuesta para las variedades waycha paceña e imilla negra respectivamente, con 3 ml/L se tiene 4 de y 6 de explantes sin respuesta respectivamente, mientras que para la dosis 6 ml/L la var. Waycha tiene 3 explantes sin respuesta y la var. Imilla negra tiene 0 explantes que no tienen respuesta.

Cabe mencionar que en este corte (raíz) se obtuvieron crecimiento de raíces en lugar de callos los cuales se contaron en la variable explantes sin respuesta. Las variedades y las dosis aplicadas no influyen en la formación de explantes sin respuesta al utilizar cultivo de raíz.

En cuanto al resultado en raíz se puede atribuir que debido a que estuvo en un ambiente controlado, con mismas condiciones de horas luz y temperatura, que ayudo a que exista un mejor manejo y no afecten el experimento en condiciones homogéneas.

MUESTRA DE TUBÉRCULO

En el análisis de varianza de la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para tubérculo en la variable explantes sin respuesta y son descritos a continuación:

Tabla 26.

Análisis de varianza para explantes sin respuesta.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
F-A	0.0011	1	0.0011	0.14	0,7113(NS)
F-B	0.06	2	0.03	3.74	0.0302 (*)
F-A * F-B	0.02	2	0.01	0.97	0.3860(NS)
Error	0.44	54	0.01		
Total	0.52	59			

CV = 7.39%

NOTA: CV=Coeficiente de variación; **=altamente significativos; *= significativo; NS=No significativo.

Como se observa el análisis de varianza en la Tabla 26, evidenciamos que el coeficiente de variabilidad fue del 7.39% indicando confiabilidad en la toma de datos y los resultados en el presente trabajo de investigación.

En el Análisis de Varianza, para la variable “explantes sin respuesta” en el explante de tubérculo, se observan diferencias significativas entre los niveles de concentración de 2,4D (factor B), indicándonos que los diferentes promedios son estadísticamente

distintos consecuentemente se procedió a realizar la prueba de medias Duncan.

Tabla 27.

Prueba de Duncan para la comparación de medias del factor B diferentes concentraciones de 2,4 D.

Facto B Concentración de 2,4 D	Medias	Agrupación de medias
1 ml/L acido 2,4 D	1.26	A
3 ml/L acido 2,4 D	1.22	AB
6 ml/L acido 2,4 D	1.18	B

Nota: Medias con una letra común son similares.

Como se puede observar, en la tabla 27, la concentración de 2,4-D influye en la formación de callos y da lugar a explantes sin respuesta, sin embargo, como dato adicional en algunos explantes se produjo la formación de raíces.

La dosis 1 ml/L produjo significativamente mayor porcentaje de plantas sin respuesta estando clasificado como categoría A por el comparador Duncan. Resulta que al aumentar la concentración a 3 ml/L el promedio de explantes sin respuesta disminuye a 1,22 de valor estadístico; finalmente la dosis con el promedio más bajo por tanto la mejor fue de 6 ml/L que produce muy pocos explantes sin respuesta. Variable que puede aprovecharse para utilizarse en callos de formación lenta (a objeto de propagación y al mismo tiempo conservación)

Con respecto a la presencia de raíces existentes se menciona que; cuando la cantidad de citocinas es baja en proporción con las auxinas, es posible el desarrollo de raíces en un explante; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes (Gómez, 1999).

En la actualidad se están realizando trabajos de callogénesis y enraizamiento con 2,4

diclorofenoxiacético (2,4-D), siendo ampliamente usado debido a su bajo costo y fácil acceso para el agricultor, a su vez se está demostrando actualmente que a pequeñas concentraciones promueven el enraizamiento (Prieto, 1992).

6. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación determinaron que existe un efecto variable en la introducción *in vitro* de las variedades de papa y las diferentes dosis. Entonces una vez realizadas todas las evaluaciones se concluye que:

- El efecto del ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la formación de callos fue la siguiente: en cultivo de hojas tanto el factor A (variedades waycha e imilla), el factor B (Dosis 1,3 y 6 ml/L) y la interacción son similares indicando que no influyeron en la obtención de callos mientras que en el cultivo de raíz el factor B es significativo siendo la dosis 6 ml/L la más óptima con obtención de 75 % de callos, con una alta producción de callos en ambas variedades.
- En el explante en base a tubérculo, el tratamiento de 6 ml/L de 2,4 D resultó el mejor, debido a que con esta dosis se obtuvo 9 callos de un total de 20 explantes mientras que la dosis 1 ml/l no formó callos y es la dosis menos recomendada.
- En el efecto del ácido 2,4 diclorofenoxiacético en la variable vitroplantas sin respuesta, en cultivo de hojas, las dosis aplicadas no influyen en la formación de explantes sin respuesta al utilizar cultivo de hojas, así mismo en el cultivo de raíz, por otro lado, en el cultivo en base a tubérculo, la dosis de 1ml/L fue la que produjo mayores explantes sin respuesta.
- En cuanto a los efectos producidos, la contaminación en las vitroplantas de hojas la variedad Imilla negra obtuvo el menor porcentaje de contaminación con un 96.7% de plantas libres de contaminación, en cuanto a el factor B las dosis 3 y 6 ml/L se tuvieron la menor cantidad de vitroplantas contaminadas con el 95% libre de contaminación en ambas dosis.
- Para el explante de raíz la variedad Imilla negra obtuvo el menor porcentaje de

contaminación con un 93.3% sin contaminación y en el factor B, la dosis de 3 ml/L tuvo los mejores resultados con un 95% no contaminadas.

- En el explante de tubérculo la variedad waycha obtuvo menor porcentaje de contaminación con un 93.3% de vitroplantas libre de contaminación y en el factor B las dosis de 3 ml/L con un 95% sin contaminación.
- En cuanto a la variable de respuesta, porcentaje de oxidación; en hojas tanto la papa waycha como imilla negra obtuvieron 0% de explantes oxidados, así mismo en todas las dosis.
- Para el explante de raíz la variedad waycha obtuvo un porcentaje de oxidación de 3% mientras que la variedad Imilla negra 10%. Las dosis 1 ml/L obtuvo 10% de oxidados mientras que las dosis 3 y 6 ml/L solo 5% cada uno.
- En el explante en base a tubérculo la variedad waycha obtuvo un 10 % de oxidados mientras que la imilla negra 7 %. Las dosis de 3 ml/L obtuvo un 20% de oxidados; la dosis de 6 ml/L rindió un 0% de oxidados siendo el más bajo; mientras que los cultivos sometidos a dosis de 1 ml/L obtuvieron 5% de explantes oxidados.
- Respecto a la variable porcentaje de sobrevivencia en cultivo de hojas en las vitroplantas de la variedad waycha, el porcentaje de supervivencia fue 86.7 %, mientras que las vitroplantas vivas de imilla negra fueron 90%. Las dosis de 1, 3 y 6 ml/L obtuvieron 95,90 y 80 % de supervivencia respectivamente.
- En el cultivo en base a raíz, la variedad waycha obtuvo un 100 % de supervivencia y la variedad Imilla negra 93.3% de sobrevivencia en el factor B las dosis 3 y 6 ml/L en ambas dosis se obtuvieron 95% de supervivencia, mientras que la dosis 1 ml/L obtuvo el 100% de explantes vivos.

- En tubérculo ambas variedades (waycha e imilla) obtuvieron 93 % de explantes vivos en cuanto al factor B las dosis 1, 3 y 6 ml/L obtuvieron 100; 95 y 85% de supervivencia.

7. RECOMENDACIONES

Una vez analizados los resultados y analizando el presente trabajo junto a otros estudios de investigación se recomienda:

- Realizar trabajos de investigación con diferentes condiciones de luz como en oscuridad para que los callos en tubérculo se desarrollen con mayor facilidad o se obtengan una mayor cantidad de callos en una de estas condiciones.
- Utilizar nuevas concentraciones de 2,4- D para determinar la dosis en la cual esta auxina tenga un efecto herbicida.
- Proponer investigaciones en otras variedades de papas cultivadas nativas y silvestres para evaluar su comportamiento ante el 2,4 D en condiciones *in vitro*.
- Evaluar la formación de callos en papa probando otro tipo de auxinas o complementando con el 2,4D con el BAP, Zip.
- Realizar pruebas en diferentes órganos de papa como peciolos, tallo aéreo, pétalos y anteras.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. Editor Elsevier Academic Press. New York. Recuperado el 15 de abril de 2024, 690 p. Disponible en línea: https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780120445653/0120445654_FM.pdf
- Aguirre, Gino; Baudoin, Jean Pierre; Leigue, Lilibeth (editores). (2010). Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia. 240 p.
- Alcántara-Cortés, J; Acero, J; Alcántara, David, & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nueva*, 17 (32), 109-129. Recuperado el 17 de abril de 2024, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tlng=es.
- Álvarez, A. (2007) Micropropagación de plantas. Mexico, D.F. Editorial Trillas.107p.
- Anjum, M; Hakoomat, A. (2004). Efecto del medio de cultivo en la iniciación de brotes de callos de diferente origen en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Biotecnología*, 3: 194-199. (Traducido del inglés). Sitio web. Consultado el 11 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2004.194.199>
- Ballejos, J. (2010). Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA). La Paz, Bolivia.

- Barba, A; Luna, B; Romero J. (2001). Micropropagación de plantas. Ed Trillas.México. Primera edición. 15-58 p.
- Barbón, R. (2003). Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4): 211-221. Artículo en línea. Consultado el 08 agosto de 2023. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/264/635>
- Barranco, L.; Gómez-Kosky, R.; Reyes, M.; & Chong, B. (2002). Embriogénesis somática en Musa AAAB, cv. FHIA-18 empleando medios de cultivo líquidos. *Biotecnología Vegetal*, 2(2). Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara.p.8-15. Consultado el 10 de diciembre de 2023. Disponible en línea <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/145>
- Bejarano, F. (2007). *2,4-D*, Respuestas a preguntas frecuentes. Razones para su prohibición mundial. Editorial Rapam.Texcoco, Mexico. 8 p. En línea. Consultado el 7 de noviembre de 2023. Disponible en: https://www.academia.edu/11429928/2_4_D_Razones_para_su_prohibici%C3%B3n_mundial_M%C3%A9xico_RAPAM_2007
- Bhojwani, S.; Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Editorial Springer India. New Delhi, India. 39-50 p.
- Caillante, R. (2017). Establecimiento de medios de cultivo y tipo de explante en *vitro* plantas de papa variedad waycha (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de producción de semilla. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de ingeniero agrónomo. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 62 p.

- Canqui, H.; Morales, E. (2009). Conocimiento local en el cultivo de la papa. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. Live Graphics. En línea. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/read/36372236/conocimiento-local-cultivo-de-la-papa>
- Cañal, M; Rodríguez, R; Fernández, B. Sánchez-Tames, R; Majada, J. (2001). Fisiología del cultivo “in vitro”. Biotecnología vegetal 1. p :3-9.
- Carlite, M.; Watkinson, S. (2021). The Fungi. Segunda edición. Londres, Reino Unido. Editorial Academic Press, Ámsterdam. 565 p.
- Castro, L. (2003). Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. En Línea, sitio web. Consultado el 20 de diciembre de 2023. Disponible en: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo19.pdf>.
- Cassells, A. (1991). Problems in Tissue Culture Contaminants. New York, EEUU. 65 p.
- CIATEJ. (2020). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Consultado el 15 de Julio de 2023. En línea sitio web. Disponible en: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>
- CIPCA. (2023). La papa en Bolivia, situación actual y alternativas. (en línea, sitio web). Consultado 4 nov 2023. Disponible en: <https://cipca.org.bo/analisis-y-opinion/articulos-de-opinion/la-papa-en-bolivia-situacion-actual-y-alternativas>
- Cortes, J; Godoy, A; Alcántara, C; Melida, S. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. En línea sitio web.

Consultado el 16 de agosto de 2022. Disponible en: www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf

- Crespo, F. (2003). Características del sub sector papero en Bolivia. La Paz – Bolivia. 61 p.
- Crozier, A. (1981). Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. New York, Estados Unidos de Norteamérica. Editor H.W. Woolhouse. pp. 9: 33-149.
- Cruz, L. (2023). Pasos a seguir para realizar un cultivo in vitro. (En línea, sitio web). Consultado el 2 de enero de 2024. Disponible en: https://issuu.com/lupita-cruz96/docs/revista_de_cultivo_in_vitro/s/12411408#google_vignette
- Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L; Levitus, G. (2004). Biotecnología y Mejora Vegetal II. Establecimiento de cultivo de tejidos. Buenos Aires, Argentina. Editorial INTA. pp 27-33. Disponible en línea: <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalll.pdf>
- Egúsqüiza, B. (2000). La papa: Producción, transformación y comercialización. Lima, Perú. Editor: Internacional Potato Center. 192 p.
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Masapanta, C., & Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. Pastos y forrajes 35 (4):407-415.
- Espinosa, R. (2013). Biotecnología Agrícola. Introducción a la biotecnología vegetal. Primera edición. Oruro – Bolivia. Editorial Universitaria. 68 p.
- Fundación PROINPA; Cooperación Italiana. (2009). Catalogo etnobotánico de papas nativas del Altiplano Norte de La Paz-Bolivia. Proyecto Escoma

2534/RC/BOL. Cooperación Italiana y Programa de la cooperación técnica alemana. La Paz, Bolivia. 146 p.

- Fundación PROINPA. (2015). Informe Compendio 2011-2014. Cochabamba, Bolivia. 142 p. Disponible en línea: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.proinpa.org/publico/compendio/files/res/downloads/book.pdf>
- Gabriel, J; Pereira, R; Gandarillas, A. (2011). Catálogo de nuevas Variedades de Papa en Bolivia: La Papa un Cultivo Milenario de los Andes. Cochabamba-Bolivia. Fundación PROINPA. p 9.
- Gallo, J. (2019). Optimización de medios de cultivo en la fase de multiplicación in vitro de papa (*Solanum tuberosum* sp.) de la variedad waycha paceña. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia.
- Gandarillas, A; Ortuño, N. (2009). Compendio de enfermedades, insectos, nematodos y factores abióticos que afectan el cultivo de papa en Bolivia. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 182 p.
- Gardener, S; Jones, G. (2022). Un nuevo agente solidificante para medios de cultivo que se licúa al enfriarse. En línea sitio web. Rescatado el 14 de abril de 2024. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro>
- George, E. (2008). Plant Tissue Culture Procedure – Background. En E. F. George, M. A. Hall y G. De Klerk (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture. 3 ed. The Netherlands: Springer.
- GLPBIO. (2024). 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) En línea, sitio web. Consultado el 3 de mayo de 2024. Disponible en: <https://www.glpbio.com/sp/2-4-d-2-4-dichlorophenoxyacetic-acid.html>

- Gómez, K. (1999). Cultivo *in vitro*. En curso de Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de las plantas y en la producción de semillas. Módulo 1. p.102.
- Gómez, R. (1998). Embriogénesis somática. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez Ponce, Santa Clara, Cuba. (Ed). pp. 57-77
- González, M. (2004). Micropropagación de cafeto (*Coffea canephora* P. var. Robusta) mediante la embriogénesis somática con el empleo de metabolitos de origen bacteriano. Tesis para optar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 97p.
- González, M; Morejón, R; Portilla, M. (2007). Establecimiento de las concentraciones óptimas de hormonas para el cultivo *in vitro* de especies de *Coffea arabica* L. XII Congreso Científico del INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrarias). Programas y Resúmenes
- Granger, L. (2016). Evaluación del potencial del cultivo de células en suspensión de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andígena) como plataforma de producción de proteínas recombinantes. Tesis de postgrado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Biotecnología. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 63 p.
- Gutierrez, D. (2009). Comportamiento Morfológico y Conservación *in vitro* de diez genotipos comerciales de papa (*solanum* sp.) Tesis de grado para optar al título de Ing. Agrónomo. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. p 11-12.

- Guzmán, M; Román, V; Franco, L; Rodriguez, P. (2010). Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Revista Agronomía Colombiana* N° 28. Vol 2. Pp 225-234.
- Hasnain, A; Naqvi, A; Ayesha, S; Khalid, F; Ellahi, M; Iqbal, S; Hassan, Z; Abbas, A; Adamski, R; Markowska, D; Baazeem, A; Mustafa, G; Moustafa, M; Hasan E; Abdelhamid, A. (2022). Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. *Frontiers in plant science*. N° 13. Consultado el 15 abril de 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395>
- Hawkins, H; y Lips, S. (1997). Cell Suspension Cultures of *Solanum tuberosum* L. as a Model System for N and Salinity Response Effect of Salinity on NO₃ - Uptake and PM-ATPase Activity zrc. *Journal of Plant Physiology*, 150, 103–109. doi:10.1016/S0176-1617(97)80188-5
- Hernández, Y; González, M. (2010). EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA Y OXIDACIÓN FENÓLICA EN EL ESTABLECIMIENTO In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*, 31 (4). Recuperado en 17 de abril de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&tlng=es.
- Hernández, A; Díaz, H. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en "papa amarilla" *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa* vol. 26(1), 277-286.
- Huamán, Z. (1986). Botánica sistemática y morfología de la Papa. *Boletín de Información Técnica* 6. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa. 22 p.

- IBTEN, Espinosa, F. (1994). Introducción a la Biotecnología. Memorias Biotecnología de cultivos de tejidos in vitro. Universidad Mayor de San Andrés. Centro de Estudiantes de Agronomía.
- Iriarte, V; Condori, B; Parapo, B; Acuña, D. (2009). Catálogo etnobotánico de Papas Nativas del Altiplano Norte de La Paz – Bolivia. La Paz, Bolivia. Ediciones Poligraf. 142 p. Disponible en línea: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://www.bivica.org/files/papas-nativas-catalogo.pdf
- Jacinto, M. (2018). Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (*Rosa sp.*) variedad freedom en condiciones in vitro. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de ingeniero agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. pp 17, 18-19.
- Jiménez, J; Chaparro, A; Blanco, J. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. Bogotá, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. XI. (num. 2), 66–74. Disponible en línea: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77613172008.pdf>
- Jordán. M; Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Cinocininas. La Serena, Chile. Universidad de La Serena. Diponible en línea. Rescatado el 15 de abril de 2024. Disponible en: Chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf
- Lara, M. (2008). La papa Aporte de los Andes a la alimentación mundial. Oruro, Bolivia. CEPA. (Centro de Ecología y Pueblos Andinos). 223 p.

- Lee, Y; Lee, N. (2003). Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In vitro cellular & Developmental Biology-Plant* (39) 5:p 475-479.
- Lesar, H; Hlebec, B; Ceranic, N; Kastelec, D; Luthar, Z. (2012). Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under in vitro conditions. *Acta agriculturae Slovenica*, p 75 – 99.
- Llanco, M. (2013). Efecto de la concentración de sacarosa y del regulador de crecimiento BAP en la multiplicación y tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*). Tesis de grado para optar el título de licenciado en Ingeniería Agronómica. La Paz, Bolivia.
- López, A; Chaparro, A. (2007). Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp . *andigena* var. Pastusa Suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana* Vol 25. (número 1). pp 16–25.
- Maceo, Yariuska (2007). Establecimiento y multiplicación in vitro de la *Curcuma longa*. Trabajo de Diploma. Centro de estudios de Biotecnología Vegetal. Granma, Cuba. Universidad de Granma. pp. 9-10.
- Marino, E. (2010). Efecto de biofertilizantes caseros y elaborados, aplicados al cultivo de la papa (*Solanum Tuberosum* L.) en la comunidad de Cañacota Cochabamba. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero agrónomo. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 75 p.
- Martin, R; Chong, B; Pérez, N. (2015). Organogénesis in vitro en el género *Digitalis*. Villa Clara, Cuba. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 15 (número 4):195 - 206.

- Martin, R; Mok, M. Mok, D. (1993). Cytolocalization of zeatin. Oxylosyl transferase in *Phaseolus*. Estados Unidos de Norteamérica. Proc. Natl Acad. Sci. pp 90: 953-957.
- Marulanda, Ángel; Isaza, M; Londoño, L. (2021). Propagación in vitro de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón a partir de meristemos florales. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Acta Agronómica. Pp 60:132-139.
- Menezes (de), L; Machado, M; Ballesta, P; Mora, F; Milaneze, M; Claudete A. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo in vitro del híbrido *Laeliocattleya* (*Orchidaceae*). Idesia. Arica, Chile. Vol. 34. Numero 1, pp: 47-54.

En Línea, rescatado el 13 de abril de 2024. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016000100006>

- Mendoza, V. (2007). Biotecnología Vegetal y su aplicación en la agricultura. Primera edición. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. p 35.
- Mckersie, B; Brown, D. (2008). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Cambridge, Reino Unido. Seed Science Research vol. 6. Pp 109-126.
- MDRyT, M. d. (2008). *Lanzamiento del año internacional de la papa en Bolivia (Memoria)*. La Paz, Bolivia. 76 p.
- Montes, S; Martinez, M; Rojas R; Santana, N; Cuba, M. (1995). Obtención de embiones somaticos a partir de Suspensiones Celulares de *Coffea canephora* Var. Robusta. La Habana, Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cultivos Tropicales. 16(3): 77-81.

- Monrroy Q. (2009). Efecto de la Variación de Medios y Concentraciones de Sacarosa en la Multiplicación y Microbulbificación In Vitro, de Dos Ecotipos de Ajo (*Allium sativum* L.) Para la Obtención de Semilla de Alta Calidad. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de san Andrés. La Paz, Bolivia. 149 p.
- Muñoz, A. (2010). Manual de cultivo de papa. Quito, Ecuador. Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Papa. (Manual no. 5).
- Murillo, R. (2014). Introducción a la Biotecnología Agrícola. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 101 p.
- Ochoa, C. (2001). Las papas de Sudamérica: Bolivia “Travaux” de l Institut Francais de Etudes Andinas. (ISSN 0768-428X). Primera edición traducida al español. Tomo 127. 407 p.
- Orellana, P. (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez, JN (ed.). Propagación y mejora genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 151-178.
- Pardavé, C. (2004). Cultivo y comercialización del cultivo de papa. Lima, Perú. Palomino. 133 p.
- Parrot, W. (1993). Cell culture techniques: cell-culture, *in vitro* selection and somaclonal variation. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Montpellier, Francia. Reunión INIBAP 1992, San José, Costa Rica Proceeding. p.183-191.
- Paz, M; Ríos, D; Becerra, J; Sanchez, M. (2016). Caracterización fisiológica del enraizamiento in vitro de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus*. Concepción, Chile. En línea. Rescatado el 16 de abril de 2024. Disponible en:

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-66432016000200421#:~:text=El%20enraizamiento%20in%20vitro%20es,un%20medio%20rico%20en%20auxinas.

- Pelacho, A; Martin, L; Cueva, R; Sanfalire, J; Alins, G. (2002). Cultivo in vitro (en línea, sitio web). Consultado el 8 de diciembre de 2023. Tissues of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Scientia Agricola. pp 58:759. Disponible en: <https://www.etsea.edl.es/in vitro/luz>
- Perea, M. (2009). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Editorial. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 95.
- Perea, M; Tirado, A. (2011). Cultivos de tejido vegetales in vitro (manual de prácticas de laboratorio). Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
- Pérez, J; Gómez, R. (1998) Field performance (*Sacharum spp hybrids*) Mutantst. En: Somaclonal and induced mutation in crop improvement. SM Jain D.S. Brar B.S. Ahloowalia (Eds.) Dordrecht: Flower Academic Publishers. p. 425- 448.
- Pérez, J. (2006). Embriogénesis somática en frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* A. Gray cv. TB1). Villa Clara, Cuba. En: Tesis de Maestría. Instituto de biotecnología de plantas de Villa Clara. pp. 15-18.
- Poma, M. (2014). Efecto de dos medios de cultivo en la Introducción de ápices vegetativos de tres morfotipos de Arracacha (*Arracacia Xanthorrhiza Bancroft.*) en condiciones de in vitro. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar el título de ingeniero agrónomo. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 89 p.
- Prieto, R. (1992). Estudio de algunos factores que influyen en la propagación por estaquillas de *Cupressus guadalupensis* S. Wats. Tesis de Maestría.

División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 99 p.

- PROINPA. (1998). Promoción e Investigación de Productos Andinos “PROINPA”. Programa de Investigación de la Papa, Informe Compendio del Programa de Investigación de la papa. Documento de Trabajo 9/95. Cochabamba - Bolivia.
- Quispe, M. (2003). Caracterización Preliminar del banco de germoplasma de papas nativas del Altiplano Norte en la Estación Experimental de Belén. Tesis de grado. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. p.31 -36.
- Radice, S. (2004). Morfogénesis in vitro. Herramientas Básicas de la Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Editores: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. Biotecnología y Mejora Vegetal. Editorial: INTA, Buenos Aires, Argentina. p. 27-33.
- Rico, L; Ortega, A. (2017). Paradojas de la ciencia: el polémico ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Ciudad de Mexico. Revista Ciencia y Desarrollo. Vol. 43 (número 291). p. 106-111.
- Rigano, M; Guzman, G; Walmsley, A; Frusciante, L; Barone, A. (2013). Production of Pharmaceutical Proteins in Solanaceae Food Crops. Estados Unidos de Norteamérica. International Journal of Molecular Sciences. Volumen 14. Consultado el 2 de noviembre de 2023. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3588013/>
- Rivero, N; Agramonte, D; Barbón, R; Camacho, W; Collado, R; Jimenez, F; Pérez, M; Gutierrez, O. (2008). Embriogénesis somática en *Anthurium andraeanum* Lind. variedad Lambada. Santa Clara, Cuba. Revista RaXimhai. Volumen 4. (número 1). p. 135-149.

- Roca, W; Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. Editorial CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). No. 151. p. 60-70. Disponible en línea: http://ciatlibrary.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf
- Rodríguez, M. (2012). Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Puno, Perú. Editado por: Universidad Nacional del Altiplano Puno. Impreso Centro papelerero de norte s.a.
- Romano, A; Vreugdenhil, D; Jamar, D; Plas; De Roo, G; Witholt, B; Mooibroek, H. (2003). Evidence of médium chain length polyhydroxyoctanoate accumulation in transgenic potato lines expressing the *Pseudomonas oleovorans* Pha-C1 polymerase in the cytoplasm *Biochemical Engineering Journal*. 16, 135-143. Disponible en: <https://eurekamag.com/research/004/154/004154417.php>
- Rojas, F. (2017). Botánica sistemática clasificación filogenética molecular: Sistema APG IV (2016). La Paz, Bolivia. 120 p.
- Rosell, C. (1990). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación "FAO".
- Sadino, M. (2015). Estrategias de Cultivo e Inducción in vitro de Células de *Aristotelia chilensis* (MAQUI) para la Obtención de Antocianinas. Tesis de licenciatura en Ingeniería Civil. Santiago, Chile. Universidad de Chile. P.13-33.
- Salgado, R. (2014). La Propagación de Plantas in vitro un Éxito Biotecnológico. (En línea, sitio web). Consultado el 2 de octubre de 2023. Disponible en:

<https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-plantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>

- (SEPA, 2015). Especie HUaycha. (En línea, sitio web). Consultado el 15 de abril de 2024. Disponible en: <https://sepa.com.bo/web/productos-y-servicios/semilla-de-papa/164-especie-huaycha>
- Shahab-ud-din, Sultan, I. N., Kakar, M. A., Yousafzai, A., Sattar, F. A., Ahmmad, F. Arif, B. (2011). The Effects of Different Concentrations and Combinations of Growth Regulators on the Callus Formation of Potato (*Solanum tuberosum*) Explants. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(5), 499–503
- Suarez, J; Jaraba, J. (2004). Viroides: El otro tipo de patogenos. Lima, Peru. patogenos, el otro tipo de patógenos. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica Volumen 7(número 2)*. pp. 33 - 41.
- Suárez, E. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Montería Colombia. En C. d. vegetales. 118 p.
- Tapia, M; Frías, A. (2007). Guía de campo de los Cultivos Andinos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). y Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú (ANPE). Lima, Perú. 209 p.
- Ticona, O. (2023). La papa en Bolivia, situación actual y alternativas. CIPCA: En línea, sitio web. Consultado el 10 de nov de 2023. Disponible en: <https://cipca.org.bo/analisis-y-opinion/articulos-de-opinion/la-papa-en-bolivia-situacion-actual-y-alternativas>

- Trejo, G; Maldonado, U; Jiménez, A; Blanqueto, M; Salcedo, G; Martínez, P; y De Jesús, A. (2002). Reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz (*Oriza sativa* L. var. *Japónica*). Revista Agrociencia. Volumen 36. pp. 441- 449.
- Turhan, H. (2004). Callus induction and growth in transgenic potato genotypes. African Journal of Biotechnology, 3(8), 375–378.
- Vicenty, K. (2019). Inducción a callogenesis para la micropropagación de Phalaenopsis (Orchidaceae). Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de ingeniero agrónomo. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 101 p.
- Weaver, R. (1996). Reguladores del crecimiento de las plantas en La Agricultura. México. Reimpresión. Trillas. p. 622.
- Zayas, D; Pérez, Yilian; Borges, M. (2005). Efecto de diferentes formulaciones de vitamina en la multiplicación *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.). Granma, Cuba. Trabajo de diploma. Universidad de Granma. pp. 9 - 11.
- Zacharius, R; Kalan, E; Kimoto, W. (1985). Biotransformation of potato stress metabolites rishitin, lubimin, and 15-dihydro lubimin by potato and soybean cell cultures. Plant Cell Reports, 4, 1–3.

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de las plantas de papa en campo, la variedad waycha paceña (izquierda) y la variedad imilla negra (derecha).



Anexo 2. Planta cosechada de la variedad waycha con los tres órganos utilizados



Anexo 3. Limpieza y desinfección de raíces, hojas y tubérculos de papa para el colocado en cajas Petri



Anexo 4. Insumos utilizados en la investigación.



Anexo 5. Lavado de materiales para la preparación del cultivo



Anexo 6. Preparación de soluciones madre



Anexo 7. Soluciones madre para la preparación del medio de cultivo



Anexo 8. Pesado de myo- inositol



Anexo 9. Pesaje en la balanza analítica para el medio de cultivo.



Anexo 10. Pipeteado de la auxina 2,4



Anexo 11. Área de preparación de medios de cultivo.



Anexo 12. Sellado de los vasos y Autoclavado.



Anexo 13. Vasitos cocteleros con 15 ml de medio de cultivo



Anexo 14. Esterilización de los materiales para la introducción bajo los rayos UV.



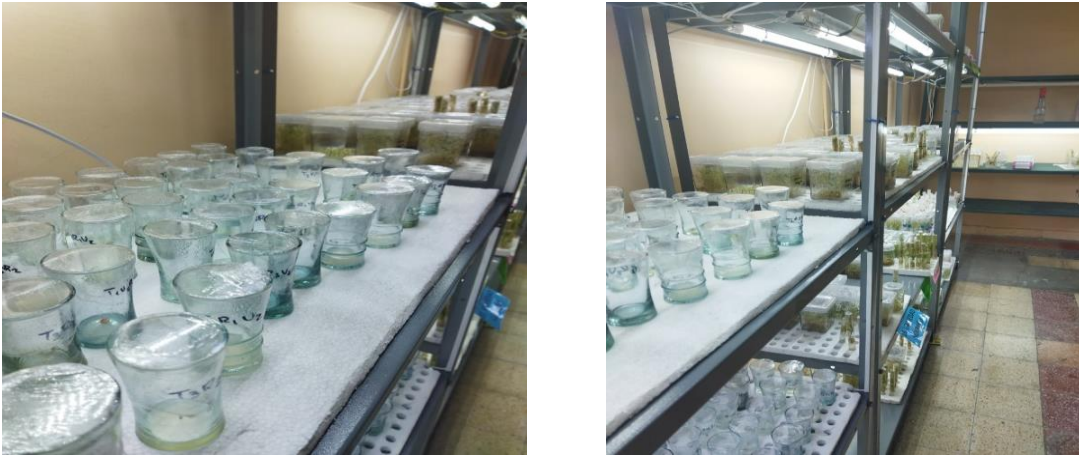
Anexo 15. Desinfección de los cortes de tubérculo, raíz y hoja (respectivamente en la fotografía), con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 3% en tubérculo, raíz y hoja.



Anexo 16. Introducción y multiplicación de cortes de papa (tubérculo, raíz y hoja) al medio de cultivo.



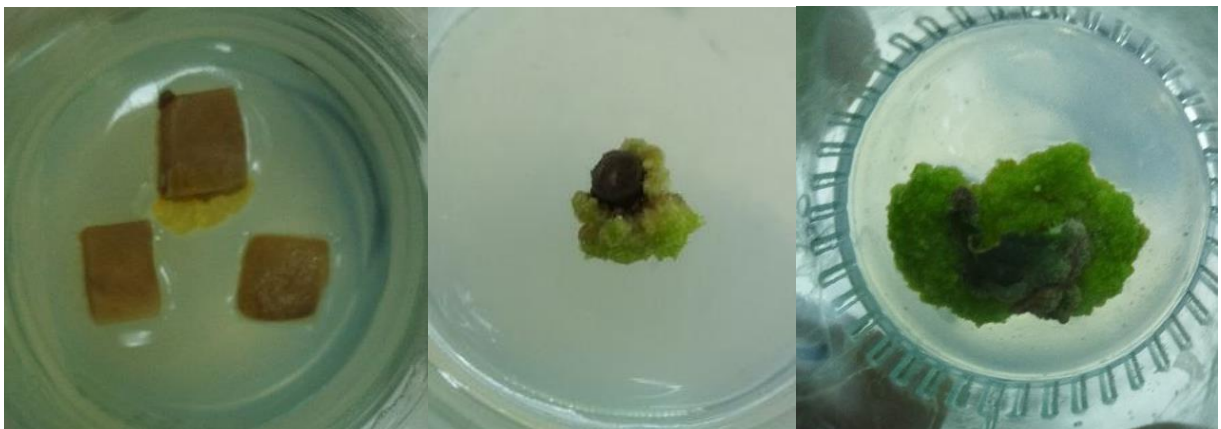
Anexo 17. Rotulado de las muestras multiplicadas en la sala de crecimiento.



Anexo 18. Registro de las variables de respuestas en los tres cortes



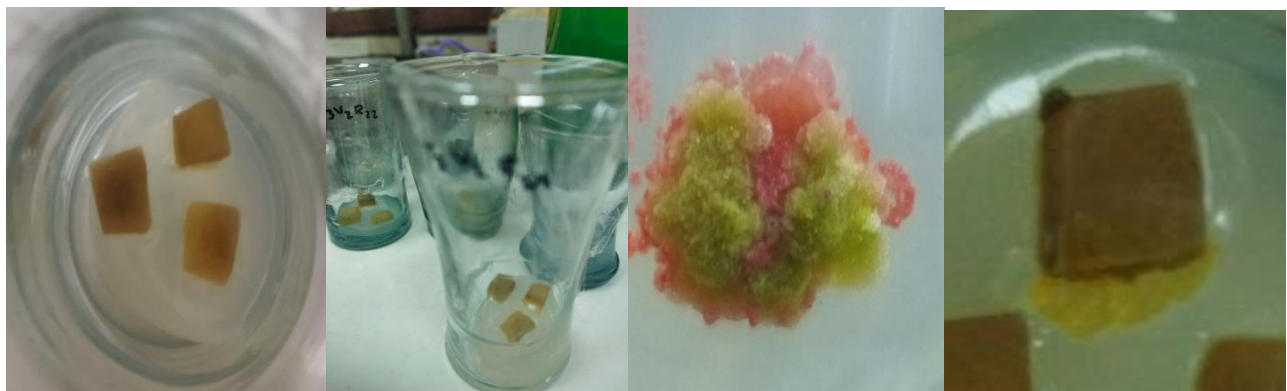
Anexo 19. Evaluación del crecimiento y desarrollo de las explantes tanto en tubérculo, raíz y hoja como se puede observar en la fotografía respectivamente.

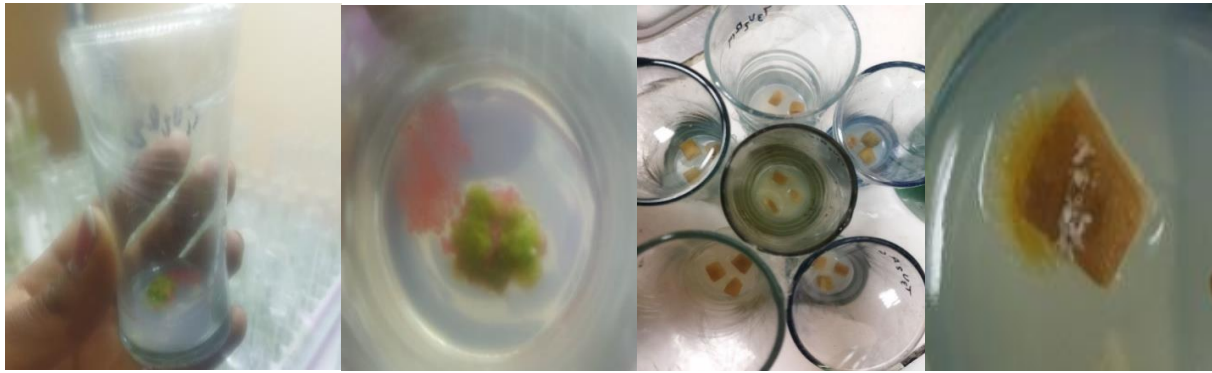


Anexo 20. Formación de callos en raíz donde en las últimas tres fotografías se puede observar la oxidación de los explantes.

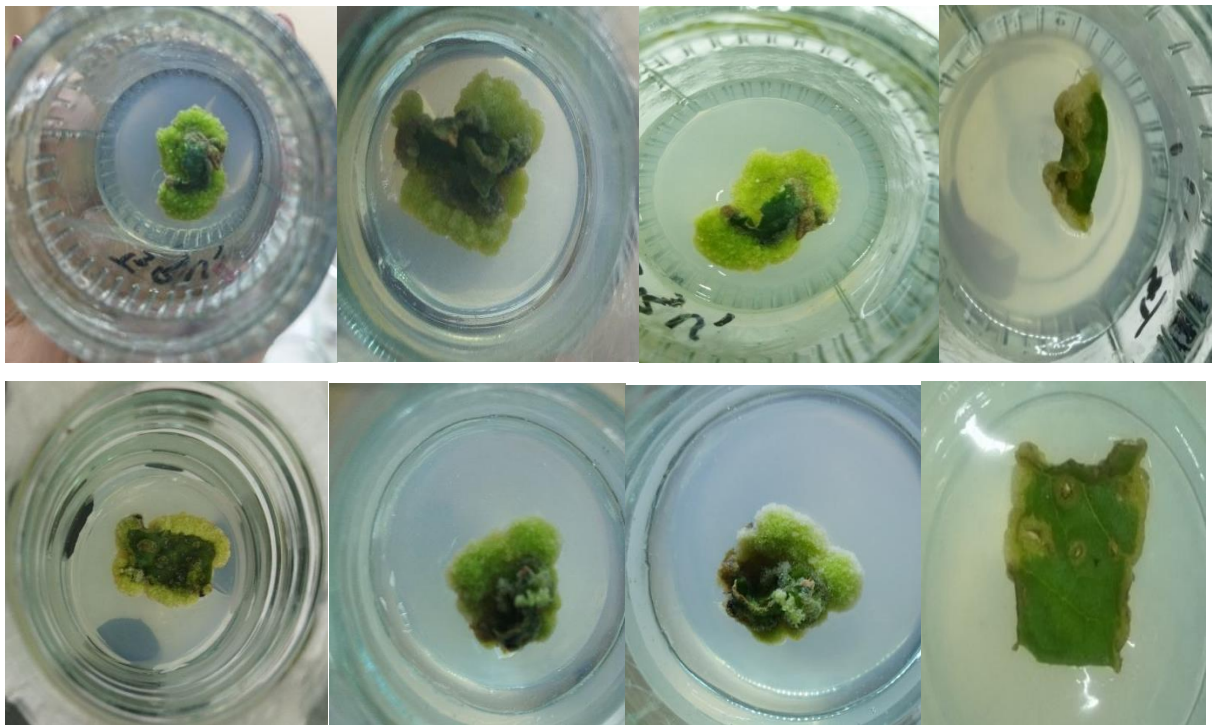


Anexo 21. Formación de callos en tubérculo donde se puede observar la oxidación en algunos explantes.





Anexo 22. Formación de callos en hoja



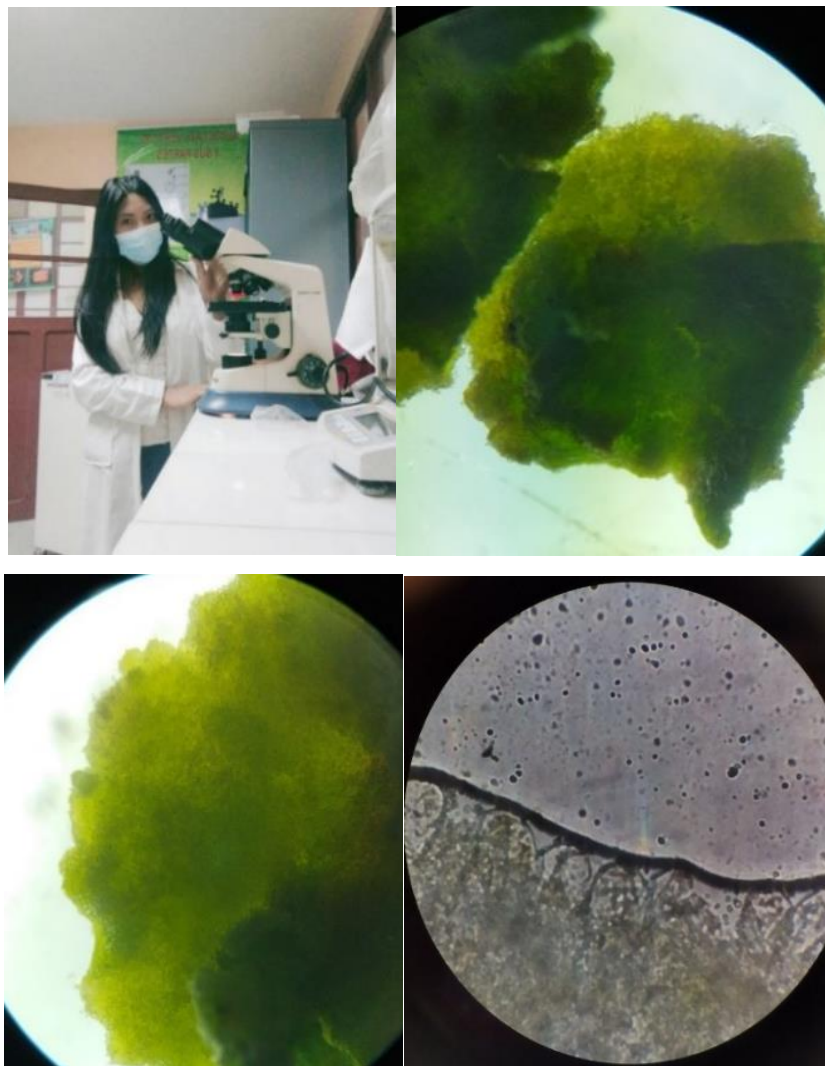
Anexo 23. Formación de raíces en muestras de raíz y tubérculo



Anexo 24. Análisis de los callos formados a partir de raíces, tubérculos y hojas.



Anexo 25. Morfología de los cultivos de células en suspensión de *Solanum tuberosum*.



Anexo 26. Protocolo experimental de desinfección de las variedades Waycha paceña e Imilla negra.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Título: EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA FORMACIÓN DE CALLOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* sp) DE LAS VARIEDADES WAYCHA PACEÑA E IMILLA NEGRA EN AMBIENTE ATEMPERADO.

Unidad/Programa: Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Proyecto: Cultivo *in vitro* de dos variedades de papa (waycha paceña e Imilla negra).

Código: 004-04-24-BIO/CÍA

Nombre del Responsable: Doris Fanny Mollisaca Mamani

Lugar de Ejecución: La Paz - Bolivia, Laboratorio de biotecnología Vegetal, Facultad de agronomía - UMSA.

Fecha de Inicio: 15/06/2022

Fecha de Conclusión: 10/02/2024

Código de Registro del Experimento: 2VARPAP-2024BIOTEC/ING

Tipo de investigación:

Básica	(X)
Adaptativa	()
Aplicada	()

Palabras Claves: *in vitro*, esterilización, desinfección, explante.

Justificación: Con la presente investigación, se busca una buena desinfección y eficacia de los explantes de variedades de papa, utilizando diferentes tiempos de inmersión en NaClO, a si mismo se podrá realizar futuros trabajos con los datos obtenidos.

Objetivo General: Desarrollar un protocolo de desinfección para las dos variedades de papa (waycha paceña e imilla negra).

Objetivo Específico:

- Hallar el tiempo indicado para la desinfección eficaz.
- Verificar el grado de contaminación y supervivencia de los explantes sometidos en el NaClO.

Tratamiento

- Tiempos de exposición en el desinfectante.

Tipo de Metodología

El material vegetal fue obtenido de la Estación Experimental de KiphaKiphani perteneciente a la fundación PROINPA (promoción e investigación de cultivos andinos) localizado en el municipio de Viacha, en el departamento de, La Paz. Se recolectó dos variedades de papa: waycha paceña e imilla negra, debido a que estas papas son de interés económico, genético y social.

Etapa I Descontaminación del material vegetal del medio externo al laboratorio.

- Realizar la selección de las plantas sanas y libres de patógenos,
- lavar con agua corriente las raíces y hojas para eliminar residuos.
- Limpieza y desinfección del área de trabajo con alcohol al 70% e NaClO al 3%.
- Limpieza de los tubérculos con agua y detergente granular y líquido.
- Realizar tres enjuagues posteriores al lavado del tubérculo
- Secar los tubérculos y envolverlos en papel madera o sabana

Etapa II Desinfección del material vegetal previo a la introducción a diferentes tiempos del hipocloruro de sodio.

- Los explantes se someten a desinfección externa mediante inmersión en un frasco de vidrio contenida de alcohol al 70% por treinta segundos.
- Para ambas variedades waycha paceña e imilla negra, la concentración al 3% de NaClO durante 10 minutos.
- Hipoclorito de sodio al 3 % agitando durante 10 min
- Realizando 3 enjuagues de 5/10 min con agua destilada

Anexo 27 *Protocolo experimental de Introducción de las variedades Waycha paceña e Imilla negra.*

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Título: EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO EN LA FORMACIÓN DE CALLOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* sp) DE LAS VARIEDADES WAYCHA PACEÑA E IMILLA NEGRA EN AMBIENTE ATEMPERADO

Unidad/Programa: Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Proyecto: Cultivo *in vitro* de dos variedades de papa (Waycha paceña e Imilla negra) empleando tres diferentes dosis de fitohormona 2,4 D.

Código: 004-04-24-BIO/CIA

Nombre del Responsable: Doris Fanny Mollisaca Mamani

Lugar de Ejecución: La Paz - Bolivia, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía - UMSA.

Fecha de Inicio: 15/06/2022

Fecha de Conclusión: 10/02/2024

Código de Registro del Experimento: 2VARPAP-2024BIOTEC/ING

Tipo de investigación:

Básica	(X)
Adaptativa	()
Aplicada	()

Palabras Claves: *in vitro*, desinfección, explante.

Justificación: Con la presente investigación acerca de la introducción de los explantes de las variedades nativas de papa, utilizando diferentes concentraciones de la fitohormona 2,4 D (Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético) se busca tener eficacia y optimización en el desarrollo de callos (tejido de células indiferenciadas) de los explantes de cuyo tejido proviene de diferentes órganos vegetales y dos variedades nativas de papa.

Objetivo General: Desarrollar un protocolo de introducción para las dos variedades de papas nativas (Waycha paceña e Imilla negra).

Objetivo Específico:

- Determinar las concentraciones de fitohormona adecuada para el desarrollo de callos en los explantes de las variedades nativas.

Tratamientos

- Medio de cultivo estándar con ácido 2,4 D 1 ml/L
- Medio de cultivo estándar con ácido 2,4 D 3 ml/L
- Medio de cultivo estándar con ácido 2,4 D 6 ml/L

Tipo de Metodología

Los explantes de papa se someten a desinfección. Posterior a ello se introduce a los medios de cultivos establecidos anteriormente para cada variedad.

En el laboratorio de biotecnología vegetal se usa un medio de cultivo estándar para los cultivos *in vitro*, el cual consta de: 30gr/L de sacarosa, 100 mg/L de Myonositol, 4,5 gr/L de medio base Murashige y Skoog (1962) y 6,5 gr/L de agar agar; en un rango de 5,6 – 5,7 de pH.

Para las dos variedades de papa se prepara tres tipos de medios de cultivos. Adicionados con una diferente dosis de la fitohormona inductora de callos para cada medio de cultivo:

- Variedad Waycha: se introdujo 30 explantes en medio de cultivo con 1 ml/L de 2,4 D. Otros 30 en medio de cultivo cuyo contenido de 2,4 D era de 3ml/L y finalmente 30 explantes en medio de cultivo con una concentración de 2,4 D. eran 6 ml/L de fitohormona
- Para la variedad Imilla Negra: se introdujo 30 explantes en medio de cultivo con 1 ml/L de 2,4 D. Otros 30 en medio de cultivo cuyo contenido de 2,4 D era de 3ml/L y finalmente 30 explantes en medio de cultivo con una concentración de 6 ml/L de fitohormona 2,4 D.
- Los explantes probados en primera instancia fue tejido de hoja. Posteriormente también se realizó el mismo procedimiento para raíz y finalmente para tubérculo.

Etapa III Introducción del material vegetal a los medios de cultivo con fitohormonas

Para la introducción de los explantes a los vasos con el medio de cultivo, lo que se procedió en la sala de multiplicación del laboratorio fue:

- Primeramente es necesario tener toda el área y el material a emplear en condiciones asépticas, por tanto acomodamos dentro la cámara de flujo laminar: alcohol al 70% en un frasco de vidrio; se procedió a desinfectar el material a utilizar (hojas bisturí, bisturí, pinzas) y también el material a esterilizar mediante radiación UV, como ser: (mechero, parafilm, gorra, guantes, barbijo quirúrgico y guardapolvo) esterilizándolo en la cámara de flujo laminar; con rayos ultravioletas y aire de filtración por 15 minutos.
- Una vez esterilizados los materiales e insumos dentro de la cámara de flujo laminar, se continua colocandose la indumentaria adecuada para trabajar dentro la cámara de flujo laminar (gorro quirúrgico, guardapolvo, guantes quirúrgicos y barbijo).
- Descubrimos las pinzas y lo sumergimos en el alcohol, así también la caja Petri, flameándolas en todomomento previo a su utilización.
- Se descubre el frasco de vidrio que contiene los cortes de papa, lo sacamos sobre la caja Petri, realizando cortes con bisturí y pinzas flameadas, obteniendo explantes de longitudes entre 8 a 10 mm. descartamos los extremos apicales y basales que presenten necrosis en los tejidos.
- Finalmente, estos explantes fueron introducidos a razón de un explante por recipiente, La posición vertical cuando el explante tiene una base quedando 1/3 del encima del medio de cultivo.
- Una vez sembrados los explantes en el MC los recipientes (vasos de cristal) son sellados con parafilm, registrando el tratamiento, la variedad y fecha, se transfieren inmediatamente a sala de crecimiento del laboratorio, que cuenta con ambientes controlados para el desarrollo de las vitroplantas .