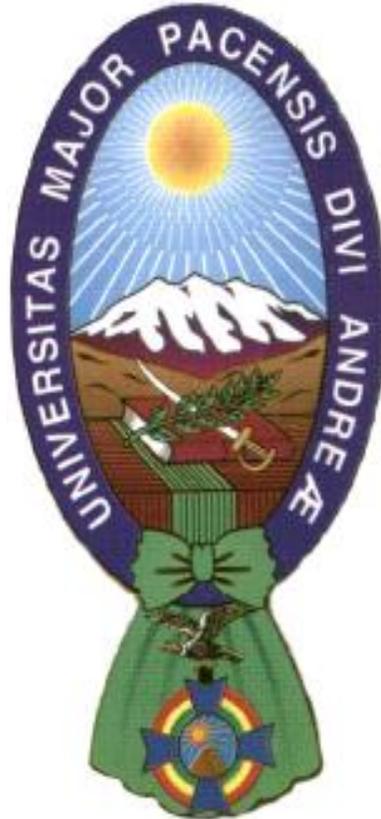


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



TESIS DE GRADO

PRODUCCIÓN DE SEMILLA ARTIFICIAL DE TRES VARIEDADES NATIVAS DE  
PAPA (*Solanum tuberosum* L.), PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLA PRE-BÁSICA

BORIS BERNARD PATTI PAÑUNI

La Paz – Bolivia

2013

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“PRODUCCIÓN DE SEMILLA ARTIFICIAL DE TRES VARIEDADES NATIVAS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.), PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLA PRE-BÁSICA”

Tesis de Grado presentado como requisito

parcial para optar el Título de Licenciado en

Ingeniería Agronómica

**BORIS BERNARD PATTI PAÑUNI**

**Asesor:**

Ing. Ph.D. Víctor Hugo Mendoza Condori.

\_\_\_\_\_

Ing. M.Sc. Jorge Guzmán Calla

\_\_\_\_\_

**Tribunal Examinador**

Ing. Ph.D. Alejandro Bonifacio Flores

\_\_\_\_\_

Ing. M.Sc. Eduardo Oviedo Farfán

\_\_\_\_\_

Ing. M.Sc. Moisés Quiroga Sossa

\_\_\_\_\_

**Aprobada**

**Presidente Tribunal Examinador:**

\_\_\_\_\_

2013

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos Fabiola y Cristian por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. **Thomas Chalmers**

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi director de tesis, Ing. Ph.D. Víctor Hugo Mendoza Condori por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

También me gustaría agradecer a mis docentes durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación, por sus consejos, su enseñanza y más que todo por su amistad.

De igual manera agradecer a mis profesores de Investigación y de Tesis de Grado, Ing. Agr. Margarita Calle Mamani y Lic. en Biología Blanca Gisell Mercado Zubieta por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador. Y por último a mi jefe de trabajo Ing. M.Sc. Erick Murillo, quien fue como un padre para mí, el cual me ha motivado durante mi formación profesional.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos: Muchas gracias y que Dios los bendiga.

## CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
CONTENIDO .....	iii
ÍNDICE GENERAL .....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMEN .....	xi
SUMMARY .....	xii

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.1 Justificación.....	2
1.2 Objetivos .....	4
1.2.1 Objetivo General .....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Semilla.....	4
2.2 Semilla pre-básica .....	6
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	8
2.4 Medio de cultivo .....	8
2.5 Cultivo de tejidos .....	10
2.6 Cultivo de meristemos .....	<b>1 ¡Error! Marcador no definido.</b>
2.7 Semilla artificial .....	13
2.7.1 Encapsulamiento .....	16
2.7.2 Desecado de semilla artificial .....	18
2.7.3 Usos de la semilla artificial .....	18
2.8 Propagación en invernadero de la semilla artificial .....	19
2.8.1 Condiciones para la propagación .....	20
2.9 Papa ( <i>Solanum tuberosum subsp. andigena</i> ) .....	<b>2 ¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>3. LOCALIZACIÓN</b> .....	<b>23</b>
3.1 Ubicación geográfica .....	23
3.1.1 Características climáticas .....	24
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 Materiales.....	24
4.1.1 Material vegetal .....	24
4.1.1.1 Características de la variedad Waych'a .....	24
4.1.1.2 Características de la variedad Imilla Negra .....	25
4.1.1.3 Características de la variedad Sani Negra .....	25
4.2 Metodología.....	26
4.2.1 Procedimiento experimental .....	26

4.2.1.1 Fase I .....	26
4.2.1.1.1 Preparación de la solución alginato de sodio .....	26
4.2.1.1.2 Preparación de la solución de cloruro de calcio .....	27
4.2.1.1.3 Estandarización de las semillas artificiales.....	27
4.2.1.1.4 Multiplicación del material vegetal.....	28
4.2.1.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> de papa.....	28
4.2.1.1.6 Aislamiento de meristemas .....	29
4.2.1.1.7 Encapsulación de meristemas axilares .....	29
4.2.1.1.8 Deseccación de semillas artificiales .....	30
4.2.1.2 Fase II .....	31
4.2.1.2.1 Supervivencia de semillas artificiales en invernadero .....	31
4.2.2 Diseño experimental.....	3 Error! Marcador no definido.
4.2.2.1 Factores de estudio.....	3 Error! Marcador no definido.
4.2.2.2 Modelo aditivo lineal.....	34
4.2.3 Variables de respuesta.....	34
4.2.3.1 Variables de respuesta para la Fase I .....	34
a) Porcentaje de supervivencia (% Sv.) .....	34
b) Porcentaje de contaminación (% Ct.).....	35
c) Altura del explante.....	35
d) Número de nudos.....	36
e) Número de raíces.....	36
4.2.3.2 Variable de respuesta de la Fase II.....	36
a) Porcentaje de supervivencia en invernadero .....	36
4.2.4 Análisis estadístico y transformación de datos .....	37
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>38</b>
5.1 Etapa de Laboratorio.....	38
5.1.1 Evaluación de diámetro de semilla artificial.....	38
5.1.1.1 Porcentaje de supervivencia .....	38
5.1.1.2 Porcentaje de contaminación .....	41
5.1.1.3 Altura del explante.....	44
5.1.1.4 Número de nudos.....	47
5.1.1.5 Número de raíces.....	50

5.1.2 Evaluación de tratamientos de desecado en semilla artificial	5jError! Marcador no definido.
5.1.2.1 Porcentaje de supervivencia .....	5jError! Marcador no definido.
5.1.2.2 Porcentaje de contaminación .....	56
5.1.2.3 Altura del explante.....	59
5.1.2.4 Número de nudos.....	62
5.1.2.5 Número de raíces.....	65
5.1.3 Comparación de variables de respuesta por tratamientos y variedades de papa	68
5.2 Etapa de invernadero .....	72
5.2.1 Porcentaje de supervivencia .....	72
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>7jError! Marcador no definido.</b>
<b>7. RECOMENDACIONES GENERALES .....</b>	<b>76</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>
ANEXO 1. Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para los medios utilizados en la práctica .....	84
ANEXO 2. Composición del medio de cultivo semi-solidó utilizado para la multiplicación de papa. Medio utilizado en el Estación Experimental de Toralapa.....	85
ANEXO 3. Composición del medio de cultivo líquido utilizado para la recuperación de meristemas.....	86
ANEXO 4. Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.....	87
ANEXO 5. Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.....	88
ANEXO 6. Datos experimentales en la evaluación de efectos para diámetros de semilla artificial.....	89
ANEXO 7. Datos experimentales transformados en la evaluación de efectos para diámetros de semilla artificial .....	89

ANEXO 8.	Datos experimentales en la evaluación de efectos para tiempos de desecado de semilla artificial .....	90
ANEXO 9.	Datos experimentales transformados en la evaluación de efectos para tiempos de desecado de semilla artificial .....	91
ANEXO 10.	Resultados del análisis de varianza y prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5 % para la evaluación de efectos derivados de diámetros de semilla artificial procesadas con el software estadístico InfoStat .....	92
ANEXO 11.	Resultados del análisis de varianza y prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5 % para la evaluación de efectos derivados de tratamientos de desecado de semilla artificial procesadas con el software estadístico InfoStat.....	98

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la evaluación de efectos derivados de diámetros de cápsula en la etapa de laboratorio .....	33
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la evaluación de tratamientos de desecado de semilla artificial en la etapa de laboratorio .....	33
<b>Cuadro 3.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia en cada variedad .....	39
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación en cada variedad .....	42
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianza para altura de planta en cada variedad .....	45
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza para el número de nudos en cada variedad .....	48
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza para el número de raíces en cada variedad .....	50
<b>Cuadro 8.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia en cada variedad .....	54
<b>Cuadro 9.</b> Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación en cada variedad .....	57
<b>Cuadro 10.</b> Análisis de varianza para altura de planta en cada variedad .....	59

<b>Cuadro 11.</b>	Análisis de varianza para el número de nudos en cada variedad .....	62
<b>Cuadro 12.</b>	Análisis de varianza para el número de raíces en cada variedad .....	65
<b>Cuadro 13.</b>	Comparación de diámetros de semilla artificial por variables de respuesta y variedades de papa .....	69
<b>Cuadro 14.</b>	Comparación de tratamientos de desecado de semilla artificial por variables de respuesta y variedades de papa .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Inducción de la embriogénesis somática (a-d); selección de embriones somáticos (e); inmersión de los embriones en alginato de sodio (f); acomplejamiento con nitrato de calcio (g); lavado (h); semilla sintética (i)	17
<b>Figura 2.</b> Aislamiento de meristemo axilar de papa (a) y tamaño ( $\geq 2\text{mm}$ ) (b)	29
<b>Figura 3.</b> Encapsulado de meristemos axilares de papa (a) y semillas artificiales (b)	30
<b>Figura 4.</b> Tratamientos de desecado de semilla artificial	31
<b>Figura 5.</b> Vitro plantas desarrolladas a partir de semilla artificial a los 20 días	35
<b>Figura 6.</b> Semillas artificiales contaminadas en la etapa de evaluación	35
<b>Figura 7.</b> Altura de vitro-planta registrada a los 20 días de desarrollo	36
<b>Figura 8.</b> Formación de raíces a partir de semillas artificiales evaluado a los 20 días	36
<b>Figura 9.</b> Comparación de medias del porcentaje de supervivencia por efecto de diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %)	39
<b>Figura 10.</b> Comparación de medias del porcentaje de contaminación por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %)	43

<b>Figura 11.</b>	Comparación de medias de altura de planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	45
<b>Figura 12.</b>	Comparación de medias del número de nudos por planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	48
<b>Figura 13.</b>	Comparación de medias del número de raíces por planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	51
<b>Figura 14.</b>	Comparación de medias de porcentaje de supervivencia por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	54
<b>Figura 15.</b>	Comparación de medias del porcentaje de contaminación por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	57
<b>Figura 16.</b>	Comparación de medias de altura de planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	60
<b>Figura 17.</b>	Comparación de medias del número de nudos por planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	63
<b>Figura 18.</b>	Comparación de medias del número de raíces por planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %) .....	66

## RESUMEN

La tecnología de la semilla artificial consiste en el encapsulamiento de un explante meristemático para su cultivo *in vitro* o en condiciones directamente *in vivo*. Esta tecnología aumenta la protección del material vegetal y facilita su manipulación, por lo que es utilizada, adicionalmente, para la conservación de germoplasma a largo plazo o crioconservación. El objetivo de esta investigación fue la evaluación de tres variedades nativas de papa, tres diámetros cápsula y 4 tiempos de desecado de las semillas artificiales, para la producción de semilla pre-básica de papa (*Solanum tuberosum* L.).

La investigación estuvo dividida en dos fases: la primera con las pruebas en laboratorio y la segunda con las pruebas en invernadero.

En laboratorio se determinó que el diámetro de semilla artificial con mejor desempeño en las variedades papa es; Waych`a con 6 mm, Imilla Negra y Sani Negra con 4 mm; de entre las tres la primera obtuvo buenos resultados obteniendo: un porcentaje de supervivencia = 93,33%, no registró contaminación, una altura de planta = 11,27 mm, un número de nudos por planta = 1,07 y un número de raíces por planta = 1,53

Por otra parte en la determinación del efecto de los tiempos de desecado en las semillas artificial se determinó que un tiempo de 2 horas es el mejor tratamiento para las tres variedades de papa; por otra parte la variedad Imilla Negra obtuvo buenos resultados con relación a las variables de respuesta obteniendo: un porcentaje de supervivencia = 72,5 %, no registró contaminación, una altura de planta = 3,3 mm, un número de nudos por planta = 0,1 y número de raíces por planta = 0,2.

En las pruebas de propagación de las semillas artificiales a condiciones de invernadero lamentablemente no se logró supervivencia alguna, pero se determinó que las características propias del explante (tamaño y calidad) así como el tratamiento de desecado, y la humedad del sustrato fueron factores que influyeron en el desarrollo de las meristemas axilares encapsulados.

## SUMMARY

The artificial seed technology involves the encapsulation of a meristematic explant for culture in vitro or conditions directly in vivo. This technology increases the protection of plant material and facilitates handling, so it is used, additionally for germplasm conservation long term or cryopreservation. The aim of this research was the evaluation of three native varieties of potato, three diameters capsule and 4 times of dried the artificial seeds for producing pre-basic seed potato (*Solanum tuberosum* L.).

The research was divided into two phases: the first with laboratory testing and the second in greenhouse tests.

In the laboratory it was found that the diameter of artificial seed varieties better in potato is; Waych`a with 6 mm, Imilla Black and Sani Black with 4 mm; of between the three it first scored well getting: a percentage of survival = 93.33 %, no reported contamination, plant height = 11.27 mm, number of nodes per plant = 1.07 and a number of roots per plant = 1.53

Moreover, in determining the effect of drying time on artificial seeds was determined that a time of 2 hours is the best treatment for the three potato varieties; on the other hand the variety Imilla Black obtaining well performed with relative to the response variables: a percentage of survival = 72.5%, no reported contamination, plant height = 3.3 mm, number of nodes per plant = 0.1 and number of roots per plant = 0.2.

In tests of propagation of the artificial seeds at conditions greenhouse unfortunately did not survive at all, but it was determined that the characteristics of the explant (size and quality) and the processing of drying and soil moisture were factors in the development of encapsulated axillary meristems.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tecnología de la semilla artificial, consiste básicamente en el encapsulado de un explante meristemático para su propagación, nace como respuesta a la urgencia de establecer métodos que reduzcan costos y tiempo en la etapa de aclimatación a condiciones *in vivo* de los materiales provenientes de laboratorio. La semilla artificial combina las ventajas de la reproducción asexual tales como: multiplicación de poblaciones idénticas y crecimiento acelerado, con las ventajas de la reproducción sexual o por semilla es de: fácil manipulación, capacidad de almacenaje, protección del explante, entre otras.

El cultivo de tejidos vegetales es actualmente una de las herramientas más desarrolladas de la biotecnología. Esta disciplina incluye un conjunto de técnicas de cultivo *in vitro*, donde se le proporciona a un explante (sección de hoja, raíz, brote, meristemo u otras) las condiciones ideales, tanto nutricionales como físicas, para que alcance un desarrollo óptimo y se pueda establecer la multiplicación clonal. Se parte de la necesidad de introducción de materiales a condiciones asépticas, y luego de la multiplicación de este material dentro del laboratorio, se termina un ciclo, con la aclimatación nuevamente a condiciones *ex vitro*.

Por las razones anteriormente citadas, este trabajo de investigación se planteó hacia la evaluación del encapsulado de meristemas axilares (tecnología de la semilla artificial), en una especie de importancia económica como la papa (*Solanum tuberosum* L.).

La papa es uno de los 10 alimentos más consumidos a nivel mundial y por su importancia ha sido objeto de numerosos estudios y mejoramiento a todos niveles, desde la mecanización hasta mejoras genéticas. Esta especie constituye un modelo ideal para las pruebas de la tecnología de semilla artificial, debido a que es tradicionalmente cultivada en condiciones *in vitro*. Otros aspectos que hacen ideal a la papa como modelo de investigación son: sus requerimientos nutricionales básicos y su rápido crecimiento.

Uno de los más importantes avances tecnológicos de la papa en Latinoamérica en las últimas décadas ha sido el desarrollo de métodos nuevos e innovadores para la multiplicación de semilla de papa de alta calidad.

## **1.1 Justificación**

Con el desarrollo de esta investigación se pretende aportar información básica, sobre la encapsulación de meristemos axilares de papa, técnica de propagación clonal, que tiene la finalidad de posibilitar la obtención y cultivo de plantas a gran escala.

Por otra parte esta técnica permite combinar el sistema de propagación vegetativa (multiplicación clonal) con la capacidad de almacenaje a largo plazo, por permitir una mayor manipulación, se la puede emplear para la conservación de germoplasma.

Una ventaja de esta técnica es el mayor control sobre la sanidad del material

propagado, lo que permite a su vez incorporar a las semillas artificiales elementos como: nutrientes, reguladores de crecimiento y fungicidas, con lo que se puede obtener propágulos de alta calidad.

La semilla pre-básica emplea la reproducción vegetativa que consume mucho tiempo, espacio y mano de obra. El empleo de la tecnología de la semilla artificial reduce considerablemente los costos, al reducir la mano de obra necesaria, el tiempo de aclimatación de las vitro-plantas a condiciones *ex vitro*, y el espacio que ocupa en invernadero.

Por ello las semillas artificiales son una buena opción, para la propagación masiva de vitro-plantas, ya que estas permitirían estandarizar los cultivos de determinadas plantas.

A nivel nacional la técnica de la semilla artificial es innovadora frente a los métodos convencionales de propagación vegetativa, principalmente en lo que concierne al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), ya que no se cuenta con antecedentes citados en la bibliografía consultada.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

- Producir semilla pre-básica de papa de tres variedades nativas a partir de semilla artificial.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de diámetros de cápsulas de alginato de sodio para una adecuada regeneración de vitro plantas de papa a partir de meristemas.
- Determinar el efecto de tratamientos de desecado de las cápsulas de alginato de sodio para una adecuada viabilidad de los meristemas de papa.
- Evaluar las fases fenológicas de las variedades de papa obtenidas a partir de semilla artificial durante el primer ciclo productivo.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Semilla**

Las plantas presentan dos sistemas de propagación: sexual y asexual. La reproducción sexual implica la unión o fusión de células sexuales masculinas y femeninas, denominadas conjuntamente gametos. Esta fusión lleva el desarrollo de un embrión y consecuentemente la formación de semillas, las cuales serán encargadas de provocar la germinación de una nueva planta. La reproducción sexual implica la creación de una población de plántulas con genotipos nuevos y diferentes, debido a los procesos

genéticos presentados en la formación de los gametos (recombinación, mutación, y otros) (López, 1995; Artola, 2002; Fontúrbel *et al.* 2007).

Por su parte, la reproducción asexual se da gracias a que cada célula contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y desarrollo de una planta completa, por lo que cualquier conjunto de células, puede bajo condiciones específicas, provocar el desarrollo de un nuevo individuo. El fenómeno de reproducción asexual se presenta en forma natural por medio de órganos vegetativos especializados tales como: tubérculos, rizomas, estolones, bulbos, entre otros. Sin embargo, el hombre en su afán de aumentar el rendimiento de los cultivos, ha venido utilizando, desde hace varias décadas, formas artificiales de reproducción asexual como son: propagación por estacas, injertos y acodos (Navarro, 2002).

En las últimas décadas, el cultivo de tejidos ha abierto toda una nueva gama de posibilidades de reproducción. Esta disciplina abarca una serie de técnicas de cultivo en condiciones asépticas, en donde se utilizan distintas partes de la planta (meristemas, trozos de hojas, raíces y células) a las que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de inducir un crecimiento óptimo. Cultivo de meristemas, embriogénesis somática, suspensiones celulares, cultivo de anteras, cultivo de micro-estacas, son varias de las metodologías ampliamente utilizadas en esta disciplina (Roca y Ramirez, 2000; Artola, 2002).

El éxito final de la propagación por medio de cultivo de tejidos, depende de la capacidad para manejar en el invernadero las plantas provenientes de laboratorio. Sin embargo, es evidente que existen diferencias entre el crecimiento de plantas en laboratorio y en invernadero. Para alcanzar el éxito, es necesario, un periodo de aclimatización a condiciones *in vivo* o donde se pueda alcanzar un alto grado de sobrevivencia, en un periodo de tiempo corto y con un costo reducido (Otazu, 2009).

El empleo de la semilla sintética busca alcanzar estos objetivos y obtener así un logro importante en la aclimatización de materiales vegetales provenientes de cultivo de tejidos.

## **2.2 Semilla pre-básica**

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

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

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

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

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

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

### 2.3 Cultivo *in vitro*

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los micro-organismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas (Cadmo, 1990).

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

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

### 2.4 Medio de cultivo

Para Hurtado y Merino (1994), usando las sustancias químicas necesarias y las

combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Según Hall y Villalobos (1996), las plantas necesitan tomar del suelo cantidades importantes de macro-nutrientes como las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre y micronutrientes como sales de hierro, magnesio, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. El medio de cultivo contiene estos elementos además de carbohidratos (usualmente sacarosa), para reemplazar el carbono, que la planta normalmente fija de la atmósfera por medio de la fotosíntesis.

El crecimiento de las plántulas *in vitro* depende de factores nutricionales y ambientales, los cuales interactúan para producir una plántula con características similares a las que crecen en el campo. Los factores nutricionales tienen como base el medio de Murashige y Skoog (1962), compuesto de sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos (Toledo; Espinoza y Golmirzaie, 1998).

En 1962, Murashige y Skoog propusieron un medio para la investigación del crecimiento óptimo de callos de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Este medio es netamente superior a los medios anteriormente usados para iniciar la organogénesis y, particularmente, para la formación de yemas. A partir de estos resultados, el medio

MS se ha empleado de una manera muy general para todos los tipos de cultivo *in vitro*. Además, puede afirmarse que ha sido la utilización del medio MS junto con el empleo de fito-hormonas apropiadas (citocininas y auxinas), lo que ha permitido el éxito de los trabajos sobre organogénesis en cultivo *in vitro*. El medio MS está caracterizado, principalmente, por un contenido elevado de nitrógeno del cual 1/3 del total está aportado en forma reducida (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y por una concentración igualmente elevada en potasio (Badillo *et al.*, 2009).

## 2.5 Cultivo de tejidos

A decir de Ramírez (1989), la técnica de cultivo de tejidos consiste en la siembra del explante o inóculo (después de esterilizado adecuadamente) en el medio de cultivo requerido, con el objetivo de lograr la proliferación *in vitro* de células, tejidos, órganos, meristemas, yemas, raíces, etc.

Toda micro-propagación y cultivo de tejidos empiezan por la excisión de una pequeña porción de la planta, su liberación o eliminación de microorganismos contaminantes y su plantación en un medio de cultivo. La parte de la planta que se usa para iniciar el proceso se llama explante o inóculo, siendo la unidad básica en la propagación por cultivo de tejidos y se compone con términos como estaca, acodo, púa, injerto o semilla (Barba *et al.*, 2001).

Mendoza (1994); citado por Villalba (2003), indica que el cultivo de tejidos y células

vegetales como una parte de la biotecnología que en la actualidad tiene una rápida evolución alcanzando nuevos conocimientos y técnicas.

Para Pohlman y Allen (2005), el cultivo de tejidos vegetales por lo general se inicia a partir de fragmentos de tejido multicelular, denominados explantes, que se obtienen de plantas vivas. Los explantes pueden provenir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre otros: tallos, hojas, raíces, peciolo hipocótilo, cotiledones, embriones o meristemas.

A decir de Alva *et al.* (2010), el establecimiento y crecimiento exitoso de un tejido vegetal *in vitro*, generalmente está determinado por la naturaleza del explante, por la composición del medio nutritivo, y varios factores ambientales (luz, temperatura, etc.).

## **2.6 Cultivo de meristemas**

Los meristemas apicales han sido los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas en una amplia gama de cultivos económicamente importantes, las plantas regeneradas usualmente retienen las características genéticas de los progenitores lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemáticas (Murashige, 1974). Por lo que el tejido embrionario está formado por células indiferenciadas capaces de originar mediante divisiones continuas, otros tejidos y órganos especializados, Wardlaw (1985); citado por Hurtado (1994), indican que en los meristemas se distinguen cinco regiones que pueden ser comunes para ápices de

todos los grupos: a) Región distal (meristemática), b) Región sub-distal (Primordios de hoja), c) Región inorgánica (tejidos internos), d) Región sub-apical (elongación de axis, diferenciación de tejidos vascular, elongación de los meristemas), e) Región de maduración (estabilización morfo-génica).

Los tejidos embrionarios o meristemas son agregados de células pequeñas de paredes muy delgadas, ocupadas casi totalmente por sus núcleos y con una gran capacidad para dividirse. De este tipo de células se originan y diferencian el resto de los tejidos que integran al vegetal (Achá *et al.*, 1999).

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

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

## 2.7 Semilla artificial

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

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

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

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

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

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

**Encapsulado de yemas.** El encapsulado puede llevarse a cabo en embriones y formar la **semilla artificial**, pero además pueden encapsularse yemas, lo cual tiene las ventajas siguientes: se elimina la fase de enraizamiento, aumenta el número de material de siembra, principalmente en aquellos cultivos donde la disponibilidad de semillas es limitada y especies en las que la producción de semillas botánicas es difícil, se mecaniza la fase de siembra, permite la incorporación de hormonas a la cápsula, productos fitosanitarios y microorganismos estimuladores del crecimiento, permite el

almacenamiento, la conservación, la manipulación y transporte del material, favorece el intercambio de germoplasma, entre otras (González *et al.*, 2004).

La tecnología de semilla sintética puede tener un impacto significativo en la producción de cultivos, tanto en los de propagación vegetativa como en los que se propagan por semilla. Para la propagación vegetativa de plantas, la semilla sintética permitiría la siembra directa de variedades clonadas y puede proveer un medio para el mantenimiento de germoplasma élite. De esta manera, la semilla sintética puede convertirse en una tecnología que posibilite el escalamiento extensivo requerido para la producción comercial de clones élite (Bornmann, 1993; citado por Lee, 2009).

Se define entonces, tecnología de la semilla sintética (TSS) como el revestimiento de cualquier material vegetal meristemático tal como: embriones somáticos, meristemas, brotes o micro-estacas. El revestimiento debe constar de dos partes: una lámina externa la cual fortalece y protege la semilla y una solución interna con nutrientes requeridos por el explante para su desarrollo (endospermo artificial). Por lo general esta solución interna contiene reguladores del crecimiento, pero también pueden ser incorporados otros componentes como: fungicidas, antibióticos y microorganismos (Gray y Purohit, 1991; Redenbaugh, 1990; Rodríguez, 2000; citados por Flores, 2010).

**Las semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora.** Es el sistema más usado. Tiene la ventaja de que los embriones no están

sujetos a la desecación que constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas (Levitus *et al.*, 2010).

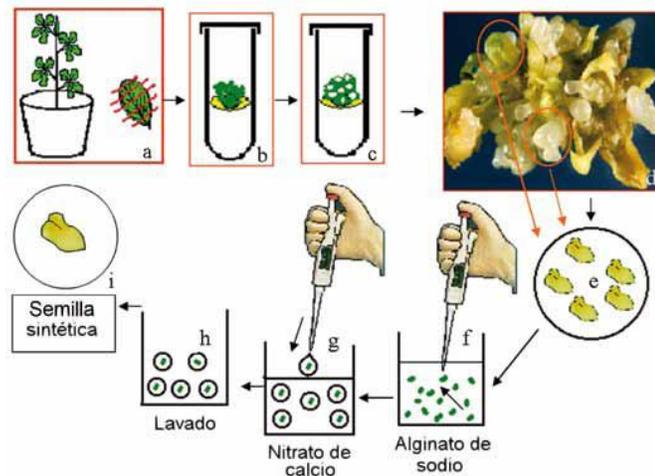
Las yemas axilares pueden ser establecidas en medios de cultivo, aisladas con una porción del tallo y mezcladas con solución de alginato de sodio. Esto se puede lograr en condiciones no estériles (semi-controladas de laboratorio), adicionándoles fungicidas para evitar la contaminación (Bapat, 1993; citado por Nieves *et al.*, 2010). Las yemas encapsuladas se llevan al suelo para lograr su brotación.

### **2.7.1 Encapsulamiento**

Los materiales usados para el encapsulamiento deben de cumplir con la función de protección física del material vegetal y además deben permitir la existencia de nutrientes, antibióticos, fungicidas y microorganismos. Redenbaugh y colaboradores a comienzos de los ochentas, y después de diversos estudios con compuestos prominentes, determinaron que los hidrogeles de alginato de calcio, llegaban a poseer las mejores características (Nieves *et al.*, 2000 y Artola, 2002).

El encapsulamiento con base en este compuesto químico, suministra una protección adecuada para el tejido vegetal, gracias a que posee una dureza idónea. La información que estos estudios generaron las bases para la búsqueda de nuevas alternativas que hacen el concepto de "semilla somática" cada vez más cercano (Artola, 2002).

El proceso es muy simple (**Fig. 1**) y consiste básicamente en sumergir los embriones somáticos en una solución de alginato de sodio 2% (p/v) y luego sumergirlo en un agente acomplejante [por ejemplo 100 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ]. Con esta técnica se genera una semilla sintética consistente de un embrión somático con una cubierta seminal y un endospermo artificial. Eventualmente estas cápsulas pueden ser recubiertas por sustancias tales como el polioxietilenglicol que sirven para mantener una adecuada hidratación de las cápsulas y embriones (Levitus *et al.*, 2010).



**Figura 1.-** Inducción de la embriogénesis somática (a-d); selección de embriones somáticos (e); inmersión de los embriones en alginato de sodio (f); acomplejamiento con nitrato de calcio (g); lavado (h); semilla sintética (i)

**Fuente:** Levitus *et al.*, 2010.

Generalmente la técnica de formación de semillas sintéticas consiste en tomar una gota de la disolución alginato de sodio conteniendo el material vegetal a encapsular, y agregarla a una solución de sal de calcio. La incubación de las cápsulas de 20 a 30 minutos, en esta última solución, es necesaria para inducir así una constitución ideal (Rivero, 2011).

### **2.7.2 Desecado de semilla artificial**

A decir de Hebe y Mroginski (2001); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes manifestaron que la desecación constituye la principal causa de los bajos valores de conversión de plantas. La ventaja de esta técnica es que se puede mantener la viabilidad hasta por un año aproximadamente en condiciones de laboratorio, lo que permitiría conservar e intercambiar germoplasma *in vitro*.

### **2.7.3 Usos de la semilla artificial**

La semilla sintética posee muchas aplicaciones al nivel de investigación, estudios sobre variación somaclonal, formación de la cubierta, y determinación del rol del endospermo, son algunas de estas (Rodríguez, 2000; citado por Navarro, 2002).

Esta investigación, profundiza y analiza la viabilidad de una propagación directamente a condiciones de invernadero.

Muchas especies son estériles y otras por su uso comercial son de propagación principalmente vegetativa, la implementación de la tecnología de la semilla sintética podría constituir la manera idónea de propagación para éstas. Además, el uso de las semillas artificial permitiría acortar el tiempo que pasa el material vegetal en laboratorio, debido a que la etapa de desarrollo y producción de raíces se llevaría a cabo en condiciones de invernadero.

## 2.8 Propagación en invernadero de la semilla artificial

La idea de la propagación de la semilla sintética en invernadero surge de la necesidad de acortar el tiempo que pasan los materiales vegetales en el laboratorio y durante el proceso de aclimatización. Esta reducción implica, además, la reducción de gastos efectuados para cada propágulo durante los periodos citados.

A decir de (Prosempa, 1998) la aclimatación en invernadero consiste en el trasplante de plántulas de las magentas directas al sustrato de las camas del invernadero por el lapso de tres semanas.

El periodo de aclimatización inicia propiamente en la etapa de trasplante, donde la planta es transferida del medio aséptico de cultivo *in vitro*, al ambiente de vida en invernadero y luego a su sitio final. Las plantas deben adquirir nuevamente su característica autótrofa, desarrollar raíces y brotes funcionales, aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos. Este periodo de aclimatización requiere de varias semanas y de condiciones ambientales esenciales, como por ejemplo, una elevada humedad relativa y la protección contra organismos nocivos y en ocasiones es necesario aplicar procedimientos particulares o especiales (Hartmann y Kester, 1999).

La propagación de materiales a invernadero por medio del uso de las semillas sintéticas reduce también, el periodo de tiempo que los materiales pasan en el laboratorio, debido

a que se elimina la etapa de pre-trasplante, es decir se favorece la iniciación de las raíces y el alargamiento del tallo (Hartmann y Kester, 1999).

### **2.8.1 Condiciones para la propagación**

Durante el proceso de germinación, la semilla requiere de ciertas condiciones ambientales: disponibilidad de agua, temperaturas adecuadas, provisión de oxígeno y presencia o ausencia de luz, para garantizar un adecuado desarrollo de la plántula (Hartmann y Kester, 1999). Para alcanzar un alto grado de sobrevivencia y un adecuado crecimiento de los materiales encapsulados (semilla artificial) estas condiciones ambientales también deben ser proporcionadas adecuadamente en el invernadero.

Las condiciones internas de la semilla son variables que también influyen directamente en el desarrollo de las plántulas a la hora de la germinación.

En ensayos de germinación *in vivo* o en invernadero de las semillas sintéticas, se observó que el vigor de estas plántulas es inferior al vigor de las plántulas de semillas naturales. En un principio se pensó que los carbohidratos, presentes en el endospermo artificial, no estaban disponibles para la germinación. Sin embargo, se observó que las reservas de almidón y sacarosa eran rápidamente consumidas luego de la germinación, por lo que se descartó tal posibilidad. Posteriormente se determinó que un incremento en el nivel de proteínas de reserva provocaba un aumento en el vigor de las plántulas,

dando luz así, a los factores que podrían mejorarse en la tecnología de la semilla sintética (Artola, 2002).

Finalmente, el tamaño y la calidad del explante, así como la capacidad para un desarrollo sincrónico, es decir, un desarrollo equivalente entre la raíz y la zona aérea, corresponden a factores propios del explante que son necesarios para obtener un alto porcentaje de sobrevivencia y un alto vigor en el crecimiento (Roca y Ramírez, 2000; Navarro, 2002).

## **2.9 Papa (*Solanum tuberosum subsp. andigena*)**

La papa ha recibido intensamente la influencia de los avances científicos y técnicos, y ha sido mejorada en aspectos como el rendimiento y la calidad, la mecanización del cultivo, la resistencia a enfermedades, la conservación y la industrialización. Es uno de los cultivos cuyo paquete tecnológico favorece mucho la producción de alimentos (Estrada, 2000).

Después del éxito de Morel, alrededor del año 1965, en la multiplicación de orquídeas *in vitro*, se incrementó el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativas para la propagación asexual de plantas de importancia económica. Esta premisa hizo que la papa llegara a establecerse como una de las especies tradicionales de multiplicación por medio de estas técnicas. La obtención de plantas libres de virus y con una alta pureza varietal, que asegura a los productores un incremento en el

rendimiento y una buena calidad del producto, fueron las razones más importantes para la implementación del cultivo *in vitro* en esta especie (Roca y Ramírez, 2000 y Navarro, 2002).

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

La papa junto con el trigo, arroz y maíz, es uno de los cuatro productos más importantes de la alimentación mundial. Bolivia es el país que consume más papa, en promedio cada habitante consume 80 kg de papa al año por habitante (Ugarte, 2001).

La papa es uno de los alimentos más populares del mundo, junto con el arroz y el trigo constituyen los alimentos más consumidos por el hombre. Este tubérculo posee diferentes bio-moléculas como constituyentes. A decir de (Sánchez, 2003) la papa, excepto en carbohidratos, es pobre en sustancias nutritivas. Contiene un 75 % de agua, 20 % de carbohidratos, un 2 % de proteínas y el resto son minerales como potasio, magnesio y fosforo.

Las pantas del Grupo Andigenum son vigorosas, de 40 a 120 cm de alto, de tallo ramificado, grueso y carnoso, con alas angostas o anchas, rectas u onduladas. Los

tubérculos varían enormemente en cuanto a forma, color y tamaño, pudiendo ser redondos perfectos o algo achatados o bien muy alargados, con la piel de colores puros uniformes blanco, amarillo, marrón, rojo, rosado, violeta, azul violáceo o negro o bien de dos colores con áreas bien definidas y con ojos superficiales, semi-profundos o profundos. Las hojas son compuestas, de 4 a 8 pares de folíolos laterales algo más pequeños que el folíolo terminal. Las flores son redondas o casi pentagonales, de 3 a 4 cm de diámetro, de color variable entre violeta claro a violeta oscuro, rosado pálido, morado, lila, azul o blanco. Los frutos son algo alargados, de 2 a 5 cm de diámetro y de color verde claro o verde oscuro algunas veces moteados con puntos blancos y otras veces con dos o tres jaspes verticales (Patiño *et al.*, 2008).

### **3. LOCALIZACION**

#### **3.1 Ubicación geográfica**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental de Toralapa, dependiente del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), el cual se encuentra ubicado a 71 km de la carretera antigua de Cochabamba a Santa Cruz, en el municipio de Tiraque, comunidad Cebada Jichani, departamento de Cochabamba. La estación se sitúa a una altura de 3317 metros sobre el nivel del mar. Geográficamente se ubica entre los paralelos 17°26'0" latitud Sur y 65°43'0" longitud Oeste.

### **3.1.1 Características climáticas**

Temperaturas medias en primavera y verano, moderadamente frías en invierno. Al ser una zona abierta, es bastante susceptible a heladas. Precipitación media de 520 mm distribuidos mayormente de octubre a marzo. Principales cultivos: papa, haba, arveja, maíz, trigo, cebada, y hortalizas (cebolla, etc.).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Material vegetal**

Se utilizaron tres variedades de papa. Las variedades Waych'a e Imilla Negra se las obtuvo del Banco de Germoplasma de Tubérculos y Raíces Andinas de la Estación Experimental de Toralapa, y la variedad Sani Negra se la adquirió del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN – Viacha), dependiente del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN).

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

#### **4.1.1.1 Características de la variedad Waych'a**

<b>Color de flor:</b>	Lila con rojo morado
<b>Forma del tubérculo:</b>	Redondo con ojos profundos

<b>Color de la piel:</b>	Rojo con áreas de color amarillo alrededor de los ojos
<b>Color de la pulpa:</b>	Crema
<b>Ciclo vegetativo:</b>	Semi-tardío (150 -160 días)
<b>Zonas de cultivo:</b>	Se adapta de los Andes al Sub - trópico
<b>Adaptación:</b>	Muy productiva

#### 4.1.1.2 Características de la variedad Imilla Negra

<b>Color de flor:</b>	Azul morado con jaspes violetas
<b>Formas del tubérculo:</b>	Redondos con ojos profundos
<b>Color de la piel:</b>	Negro
<b>Color de la pulpa:</b>	Blanco
<b>Ciclo vegetativo:</b>	Tardío 150-180 días
<b>Zona de cultivo:</b>	Provincia los Andes, Omasuyos, Loayza, Aroma y Murillo.
<b>Adaptación:</b>	Muy productiva

#### 4.1.1.3 Características de la variedad Sani Negra

<b>Color de flor:</b>	Azules morados y jaspes violetas
<b>Formas del tubérculo:</b>	Redondos con ojos semi-profundos
<b>Color de la piel:</b>	Morado
<b>Color de la pulpa:</b>	Crema

<b>Ciclo vegetativo:</b>	Tardía (150-180 días)
<b>Zona de cultivo:</b>	Provincia los Andes, Omasuyos, Loayza, Aroma y Murillo.
<b>Adaptación:</b>	Muy productiva

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Procedimiento experimental

Este trabajo de investigación, se dividió en dos fases:

- a) **Fase I.-** Esta etapa se desarrollo en laboratorio, se evaluó el diámetro de las cápsulas y el tiempo de desecado. El proceso se realizo en una cámara de flujo laminar horizontal en condiciones asépticas.
- b) **Fase II.-** Esta etapa se realizó en invernadero, con los resultados de las pruebas en laboratorio se llevó las semillas artificiales a condiciones semi controladas.

#### 4.2.1.1 Fase I

##### 4.2.1.1.1 Preparación de la solución alginato de sodio

Para el presente trabajo de investigación se preparó inicialmente una solución de medio de cultivo conteniendo las sales minerales propuestas por Murashige y Skoog, (1962) pero libre de calcio, al cual se le agregó alginato de sodio al 3% (p/v) y 12 % (p/v) de sacarosa (**Anexo 4**).

Para disolver el alginato de sodio, la solución de medio de cultivo se preparó con agua destilada previamente calentada y se añadió cuidadosamente el alginato bajo agitación

constante, cuidando todo el tiempo de que no llegue a formar grumos.

Con la ayuda de un agitador de vidrio se retiraron los grumos que se forman al disolver el alginato de sodio, una vez obtenida una solución homogénea y transparente, se ajustó el pH a 5.7 y se esterilizó en un autoclave vertical (EVAR) a 121 grados Celsius durante 20 minutos. La solución esterilizada se conservó a 5 grados Celsius.

#### **4.2.1.1.2 Preparación de la solución de cloruro de calcio**

La solución de cloruro de calcio necesaria para cumplir con el proceso de encapsulación, fue utilizada en una única concentración (100 mM) y 12 % (p/v) sacarosa (**Anexo 5**), al igual que el alginato, se le adicionaron sales minerales y con un agitador magnético se disolvió el calcio, se ajustó el pH, esterilizó y conservo.

#### **4.2.1.1.3 Estandarización de las semillas artificiales**

Para estandarizar el proceso de formación de las cápsulas de alginato se ocupó para todos las pruebas una misma micro-pipeta de capacidad de 1000 micro litros ( $\mu\text{L}$ ) con una punta que se cortó en el extremo a un diámetro de 4 milímetros.

Para la estandarización del proceso de encapsulación, se utilizó una micro-pipeta con el cual se reguló el volumen según el diámetro deseado de las cápsulas, 30 micro litros ( $\mu\text{L}$ ), 110 micro litros ( $\mu\text{L}$ ) y 270 micro litros ( $\mu\text{L}$ ) para obtener diámetros de cápsula de 4, 6 y 8 milímetros respectivamente.

#### **4.2.1.1.4 Multiplicación del material vegetal**

Antes de la multiplicación del material vegetal se preparó el medio de cultivo usado en toda la investigación cuya fórmula se basa en la de Murashige y Skoog (1962) (**Anexo 1**) complementado con 0.5 mg / L de GA3 y 2 mg / L de pantotenato de calcio, 3% (p/v) de sacarosa, 0.2% (p / v) de Phyta-Gel y un pH de 5.7 (**Anexo 2**).

La multiplicación de las tres variedades de papa fue a intervalos de 15 días como máximo empleando magentas y frascos de vidrio. El número de esquejes por contenedor fue de 25 vitro plantas.

La multiplicación de las vitro-plantas de papa se realizó en cámara de flujo laminar horizontal, para ello previamente se hizo una desinfección con alcohol al 70 % (v/v). Empleando bisturís y pinzas esterilizadas se cortaron esquejes con 1 o 2 nudos, inmediatamente fueron introducidos en los recipientes con medio de cultivo. Finalmente se sellaron con plasti-film y se etiquetó.

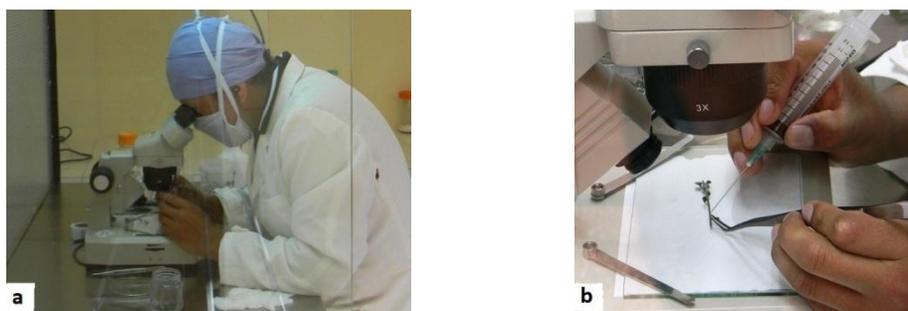
#### **4.2.1.1.5 Cultivo *in vitro* de papa**

Las condiciones físicas de la sala de crecimiento de laboratorio de biotecnología de la Estación Experimental Torolapa fueron las siguientes: la temperatura oscilaba entre los  $20 \pm 2$  grados Celsius, una intensidad lumínica de 2000 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, el mismo que se controló con un temporizador (Timer).

#### 4.2.1.1.6 Aislamiento de meristemas

Con la ayuda de un estereoscopio, jeringas de 10 ml y pinzas se aislaron meristemas axilares de papa a partir de vitro-plantas de aproximadamente 15 días. Por cada planta de papa se aislaron 2 a 3 meristemas axilares individuales, con preferencia la extracción se la realizó de la parte media de la planta.

Los meristemas axilares extraídos fueron colocados en un medio de cultivo estándar líquido (**Anexo 3**), para promover su recuperación durante 24 horas.



**Figura 2.** Aislamiento de meristemo axilar de papa (a) y tamaño ( $\geq 2$  mm) (b).

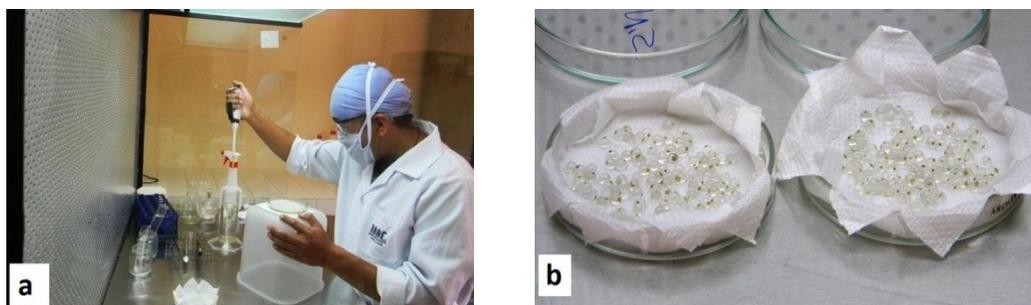
#### 4.2.1.1.7 Encapsulación de meristemas axilares

Una vez transcurrido un periodo de reposo de 24 horas desde el aislamiento de los meristemas axilares de papa, los mismos fueron sumergidos en la solución de alginato de sodio (**Anexo 4**).

Seguidamente con la ayuda de una micro-pipeta estéril se tomó una gota de la solución anterior regulando el volumen para obtener los diámetros de cápsula de  $\varnothing = 4, 6$  y  $8$  mm, también se controló que la gota contuviera un meristemo axilar de papa, y se dejó caer la gota en la solución de cloruro de calcio (**Anexo 5**).

Se incubaron las cápsulas por 5 a 10 minutos aproximadamente en la solución de cloruro de calcio, para que adquirieran una consistencia adecuada. Pasado este periodo, se eliminó toda la solución de cloruro de calcio y eliminó el exceso de humedad de las cápsulas colocándolas en una placa petri con papel secante estéril.

Para la evaluación y toma de datos, se elaboraron lotes de aproximadamente 40 cápsulas por variedad de papa, de las cuales se seleccionaron cuidadosamente 30 distribuidas de a 10 cápsulas por magenta para su evaluación en cámara de crecimiento.



**Figura 3.** Encapsulado de meristemos axilares de papa (a) y semillas artificiales (b).

#### 4.2.1.1.8 Desecado de semillas artificiales

De igual manera se procedió para la prueba de desecado en cámara de flujo laminar, con la diferencia de usar un diámetro de cápsula pre-seleccionado para cada variedad de papa. Los diámetros de semilla artificial óptimo de las variedades de papa resultantes de la prueba pasada fueron las siguientes: Waych`a ( $\varnothing = 6$  mm), Imilla Negra ( $\varnothing = 4$  mm) y Sani Negra ( $\varnothing = 4$  mm).

Las tres variedades fueron expuestas a 0 (testigo), 2, 4 y 6 horas de desecado de semilla artificial en cámara de flujo laminar. Para la evaluación y toma de datos, se elaboraron lotes de aproximadamente 60 semillas artificiales por variedad de papa, de las cuales se seleccionaron cuidadosamente 40 distribuidas de a 10 semillas artificiales por magenta para su evaluación en cámara de crecimiento.



**Figura 4.** Tratamientos de desecado de semilla artificial.

#### **4.2.1.2 Fase II**

##### **4.2.1.2.1 Supervivencia de semillas artificiales en invernadero**

Considerando las limitaciones físicas y de material como el sustrato en invernadero solo se pudo emplear tres camas de multiplicación, una cama por variedad de papa y la densidad de siembra usado fue (47 plantines / m<sup>2</sup>) dando un total de 160 semillas artificiales por variedad de papa.

En invernadero se dispuso de camas de multiplicación de semilla pre-básica de madera de dimensiones (3.4 m X 1 m X 0.3 m), el sustrato utilizado en las camas fue esterilizado con vapor de agua a 82 °C por 1 hora, adicionalmente se usó un fungicida emulsionable de amplio espectro denominado Maxin – XL (composición química:

fludioxonil – 250 g/l, metalaxil-M-100 g / l e ingredientes inertes 650 g / l) a una concentración de 2 ml / l (v/v) para desinfección dicho sustrato.

Para el trasplante de las semillas artificiales provenientes de laboratorio, previamente se sumergió las mismas por un tiempo de 5 minutos en un fungicida de amplio espectro denominado Ditane a una concentración de 2 g / l (p/v).

Las semillas artificiales tratadas con el fungicida se sembraron a una profundidad del doble de las mismas. En invernadero las camas de multiplicación tuvieron un riego periódico para mantener una humedad adecuada.

#### **4.2.2 Diseño experimental**

En el estudio se empleó un diseño completamente al azar (DCA), propuesto por (Rodríguez, 1991), con 3 repeticiones en la determinación del diámetro óptimo de semilla artificial y 4 repeticiones para la determinación del tiempo óptimo de desecado de semilla artificial.

##### **4.2.2.1 Factores de estudio**

**Factor A:** Variedades de papa

**a1** = Waych'a

**a2** = Imilla negra

**a3** = Sani negra

**Factor B:** Diámetro adecuado de las cápsulas de alginato de sodio

**b1** = 4 mm

**b2** = 6 mm

**b3** = 8 mm

**Cuadro 1.** Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la evaluación de efectos derivados de diámetros de cápsula en la etapa de laboratorio.

<b>Factor B:</b>	<b>Factor A : Variedades de papa</b>		
Diámetro cápsula	<b>Waych'a</b>	<b>Imilla Negra</b>	<b>Sani Negra</b>
b1 = 4 mm	$T_1 = a1*b1$	$T_1 = a2*b1$	$T_1 = a3*b1$
b2 = 6 mm	$T_2 = a1*b2$	$T_2 = a2*b2$	$T_2 = a3*b2$
b3 = 8 mm	$T_3 = a1*b3$	$T_3 = a2*b3$	$T_3 = a3*b3$

**Factor C:** Tiempo de desecación.

**c1** = 0 horas (Testigo)

**c2** = 2 horas

**c3** = 4 horas

**c4** = 6 horas

**Cuadro 2.** Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la evaluación de tratamientos de desecado de semilla artificial en la etapa de laboratorio.

<b>Factor C:</b>	<b>Factor A * Factor B = Xn</b>		
Tiempos de desecado	<b>Waych'a</b>	<b>Imilla Negra</b>	<b>Sani Negra</b>
c1 = 0 horas (Testigo)	$T_1 = X1*c1$	$T_1 = X2*c1$	$T_1 = X3*c1$
c2 = 2 horas	$T_2 = X1*c2$	$T_2 = X2*c2$	$T_2 = X3*c2$
c3 = 4 horas	$T_3 = X1*c3$	$T_3 = X2*c3$	$T_3 = X3*c3$
c4 = 6 horas	$T_4 = X1*c4$	$T_4 = X2*c4$	$T_4 = X3*c4$

#### 4.2.2.2 Modelo aditivo lineal

Debido a que el trabajo de investigación fue en laboratorio, las pruebas de diámetro y tiempo de desecado de semilla artificial de tres variedades de papa fueron procesadas bajo el modelo estadístico de un diseño completamente al azar, es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$	=	Una observación cualquiera
$\mu$	=	Media poblacional
$\alpha_i$	=	Efecto del $i$ -ésimo tratamiento
$\epsilon_{ij}$	=	Error experimental total

#### 4.2.3 Variables de respuesta

A continuación se describen las variables de respuesta evaluadas en la etapa de laboratorio o etapa *in vitro*:

##### 4.2.3.1 Variables de respuesta para la Fase I

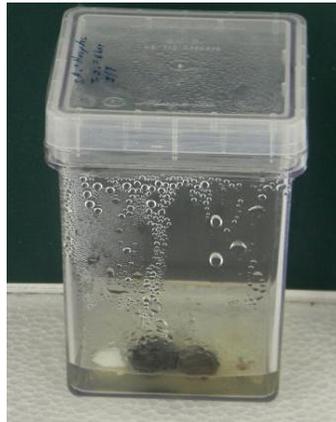
Los resultados obtenidos fueron evaluados en forma semanal durante tres semanas, en función a las siguientes variables de respuesta:

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



**Figura 5.** Vitro plantas desarrolladas a partir de semilla artificial a los 20 días.

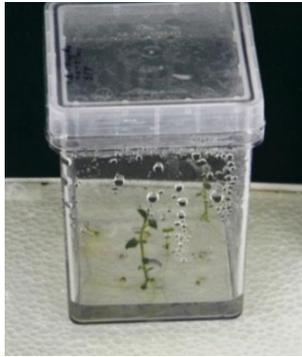
**b) Porcentaje de contaminación (% Ct.):** Se identificó el número total de vitro plantas contaminadas (presencia de hongos y /o bacterias) este valor se expresó en porcentaje.



**Figura 6.** Semillas artificiales contaminadas en la etapa de evaluación.

La razón por la cual se tiene esta variable es que la contaminación microbiana del endospermo sintético es uno de los principales problemas que enfrenta la tecnología de la semilla artificial (Quiala *et al.*, 2002).

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



**Figura 7.** Altura de vitro-planta registrada a los 20 días de desarrollo.

**d) Número de nudos:** Evaluado por conteo directo, indica el número de vitro plantas que se podrán desarrollar en la siguiente etapa de multiplicación.

**e) Número de raíces:** Evaluadas por observación directa de la viro-planta emergente de la semilla artificial, se cuantifico las raíces al finalizar del periodo de prueba de 20 días desde la siembra.



**Figura 8.** Formación de raíces a partir de semillas artificiales evaluado a los 20 días.

#### 4.2.3.2 Variable de respuesta de la Fase II

##### a) Porcentaje de supervivencia en invernadero

Se procedió a evaluar la sobrevivencia de las semillas artificiales en la propagación directamente a condiciones de invernadero o *in vivo*. La supervivencia de las semillas artificiales fue evaluada por un periodo de 30 días desde su siembra en las camas de

multiplicación de semillas pre-básica. Se identificó el número total de vitro-plantas que lograron desarrollarse a partir de la semilla artificial, (detectando su crecimiento) este valor se expresó en porcentaje.

#### **4.2.4 Análisis estadístico y transformación de datos**

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

Transformación logarítmica ( $\log X$ ), donde X es el valor observado, que según Litle y Hills (1981), recomienda la transformación cuando las desviaciones estándar de las muestras sean aproximadamente proporcionales a las medias, también cuando los efectos son multiplicativos en vez de aditivos.

Transformación por raíz cuadrada que según Reyes (1990), cuando algún valor observado es muy pequeño o cero la fórmula que debe usarse es:  $\sqrt{X+1}$ , siendo X el valor observado.

Solo en la variable de respuesta porcentaje de supervivencia se utilizó la transformación logarítmica, mientras que en las variables porcentaje de contaminación, altura de planta, número de nudos y número de raíces se empleó la transformación por raíz cuadrada.

Los datos fueron procesados con el programa InfoStat Software Estadístico versión 2012, se aplicó una prueba de Duncan al (5 %).

**b) Fase II:** En esta fase se empleó una comparación de medias entre las variedades de papa, para determinar el porcentaje más alto de supervivencia.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Para una mejor interpretación y comprensión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se debe tener en cuenta que la investigación estuvo dividida en dos etapas, la de laboratorio y la de invernadero:

### **5.1 Etapa de Laboratorio**

#### **5.1.1 Evaluación de diámetro de semilla artificial**

Los análisis de varianza y pruebas de Duncan de las variables de repuesta de cada variedad de papa se resumieron en los siguientes cuadros (3 – 7) y figuras (9 – 13), se describe en detalle los datos procesados por el programa InfoStat en el (Anexo 10).

##### **5.1.1.1 Porcentaje de supervivencia**

Los resultados expuestos a continuación muestran los valores más sobresalientes por cada tratamiento y por cada variedad obteniendo un 93,33 % de supervivencia para un diámetro de cápsula de 6 mm para la variedad Waych`a, un 60 % y 76,67 % de supervivencia para un diámetro de semilla artificial de 4 mm para las dos variedades Imilla Negra y Sani Negra respectivamente.

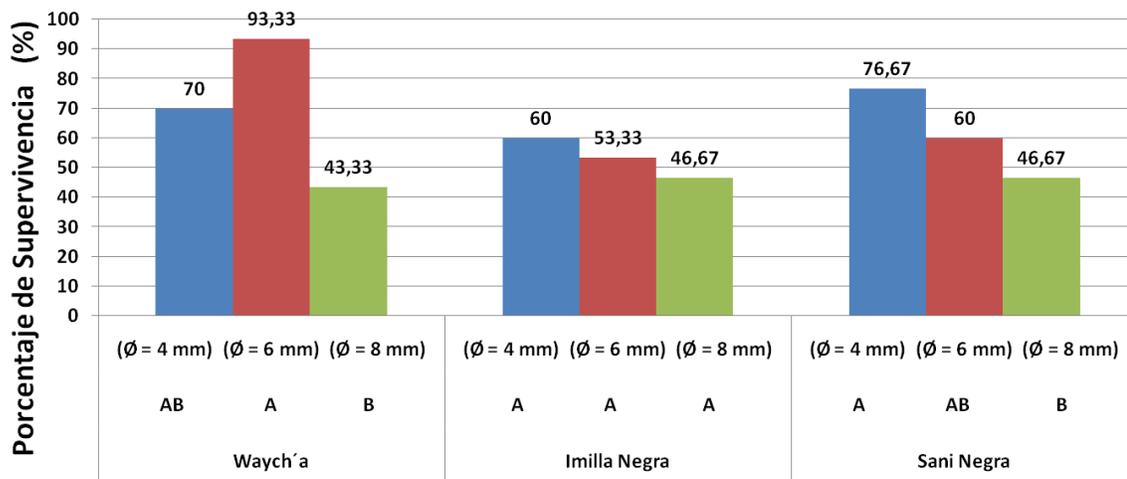
**Cuadro 3.** Análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia en cada variedad.

Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Diámetro de cápsula	0.02 *	6.00 %
Imilla Negra	Diámetro de cápsula	0,46 (ns)	5,44 %
Sani Negra	Diámetro de cápsula	0,06 (ns)	4,78 %

\* = Es significativo al 5%

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia (cuadro 3), indica que existen diferencias significativas entre los diámetros de semilla artificial en la variedad Waych`a, pero no existen diferencias significativas entre los diámetros de cápsula en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 6,00 %, 5,44 % y 4,78 % por cada variedad indican que los datos en estudio son confiables y que hubo un buen manejo experimental.



**Figura 9.** Comparación de medias del porcentaje de supervivencia por efecto de diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 9, se observan las pruebas de rango múltiple de Duncan al (5 %), indica que existen diferencias entre los diámetros de semilla artificial de 6 mm con 93,33 % de

supervivencia, 4 mm y 8 mm con 70 %, 43,33 % de supervivencia respectivamente para la variedad Waych`a, por otra parte no existen diferencias entre los diámetros de cápsula de 4 mm, 6 mm y 8 mm en las variedades Imilla Negra y Sani Negra, es decir que los tres diámetros proporcionan condiciones uniformes para la supervivencia.

Una de las razones que determino que hubiese diferencias en los porcentajes de supervivencia en las semillas artificiales fue el hecho de que los meristemos axilares de papa tuvieron que vencer la resistencia que ofrece el endospermo artificial, ocasionó un desarrollo desigual de las vitro-plantas lo que corresponde con lo estudiado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes mencionan que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece el endospermo, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones.

Por otra parte también se puede mencionar de que el encapsulado de meristemos axilares de papa no es un impedimento para obtener ciertos niveles de supervivencia en condiciones *in vitro*, afirmación que también menciona Navarro (2002) que asevera que el encapsulado en alginato de sodio no presentó factores inhibidores sobre el crecimiento de los meristemos, ni representó una barrera para la elongación del brote.

Otra razón importante que apporto a que hubiera diferencias entre los porcentajes de supervivencia esta la relacionada con el tamaño de los meristemos axilares de papa

encapsuladas, porque no todos fueron de un mismo tamaño lo que ocasionó un crecimiento desuniforme de las vitro-plantas lo que concuerda con lo que indica Navarro (2002), que asevera que el uso de meristemas con un tamaño considerable (mayor a 4 mm) y aislados de vitro-plantas de condición sana garantiza, una alta sobrevivencia de las semillas artificiales.

Confirmando la anterior afirmación, de que el tamaño del meristemo es un factor importante que influye en la supervivencia de las semillas artificiales Roca y Ramírez (1991); citado por Navarro (2002), aseguran que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad encontrada para fomentar la producción de brotes.

Las características propias de cada variedad de papa como la facultad de regeneración también influyeron en los niveles de supervivencia de las semillas artificiales en la presente investigación lo que también está de acuerdo con lo que menciona Rodríguez (2000); citado por Navarro (2002), quien indica que la capacidad para un desarrollo sincrónico, es decir, un desarrollo equivalente entre la raíz y la zona aérea, corresponden a factores propios del explante que son necesarios para obtener un alto porcentaje de sobrevivencia y un alto vigor en el crecimiento.

#### **5.1.1.2 Porcentaje de contaminación**

No se registró contaminación alguna de las cápsulas de alginato de sodio para la evaluación de diámetros de semilla artificial en la variedad Waych`a, mientras que la

rapidez y precisión en la extracción de meristemas fue un factor a tomar en cuenta en las variedades Imilla Negra y Sani Negra que obtuvieron valores de 3,33 % y 26,67 % de contaminación ambos con un diámetro de cápsula de 6 mm.

**Cuadro 4.** Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación en cada variedad.

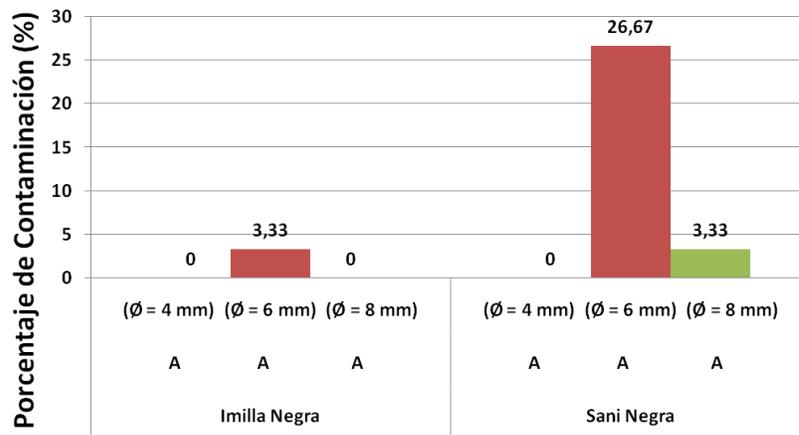
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Diámetro de cápsula	-	-
Imilla Negra	Diámetro de cápsula	0,42 (ns)	61,27 %
Sani Negra	Diámetro de cápsula	0,52 (ns)	129,37 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para el porcentaje de contaminación de cada variedad (cuadro 4), indican que no existen diferencias significativas entre los diámetros de semilla artificial en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 61,27 % y 129,37 % indican que los datos en estudio no son del todo confiables y que hubo un mal manejo de las unidades experimentales.

En cuanto a los valores de los coeficientes de variación considerablemente altos se los puede atribuir primero a un número insuficiente de repeticiones o unidades experimentales y a una distribución anormal de los datos experimentales (Reyes, 1990).

A decir de Vicente (2001), los elevados porcentajes del coeficiente de variación indican un alto grado de dispersión de las observaciones.



**Figura 10.** Comparación de medias del porcentaje de contaminación por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 10, se observan las pruebas de rango múltiple de Duncan al (5 %), de las variedades Imilla Negra y Sani Negra que indican que no existen diferencias entre los diámetros de semilla artificial de 4 mm, 6 mm y 8 mm para ambas variedades es decir que los diámetros de cápsula proporcionan condiciones uniformes para el porcentaje de contaminación.

La presencia de ciertos niveles de contaminación en la evaluación de diámetros de semilla artificial de tres variedades de papa, se debió a que los medios de cultivo utilizados de la presente investigación (Anexo 3 - 5), contenían niveles considerables de azúcar que fueron la fuente de energía que requerían los meristemas axilares papa para su desarrollo, el problema con el azúcar es que es medio que favorece el desarrollo de ciertos agentes contaminantes como los hongos, esto concuerda con lo que mencionan Sanada y col. (1993); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el empleo de sacarosa como fuente de energía incrementa los riesgos de

contaminación de las semillas artificiales, ya que favorece la presencia y proliferación de microorganismos.

Reafirmando la anterior discusión puntualizamos el hecho de que pudo haber algún tipo de falla en el protocolo de encapsulado de meristemas axilares de papa, porque como ya se menciona los medios de cultivo utilizados en laboratorio tenían concentraciones respetables de azúcar, lo que es un imán para los agentes contaminantes, afirmación que comparte Quiala *et al.* (2002); indicando que la contaminación microbiana del endospermo sintético es uno de los principales problemas que enfrenta la tecnología de la semilla artificial ya que el hecho de que el endospermo sintético contenga como principal fuente de energía la sacarosa, lo hace un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos.

Por otra parte la ausencia de contaminación registrada en la variedad Waych`a concuerda con lo señalado por Jiménez (1999); citado por Monroy (2009), que indica que mientras más pequeño es el explante, menor es el riesgo de contaminación.

#### **5.1.1.3 Altura del explante**

Los valores más altos por tratamiento y por variedad se describen a continuación, se registró una altura promedio de 11,27 mm para el diámetro de cápsula de ( $\varnothing = 6$  mm) en la variedad Waych`a, un valor de 6,7 mm para la var. Imilla Negra y por ultimo un valor de 7,83 mm en la var. Sani Negra ambos con un diámetro de ( $\varnothing = 4$  mm).

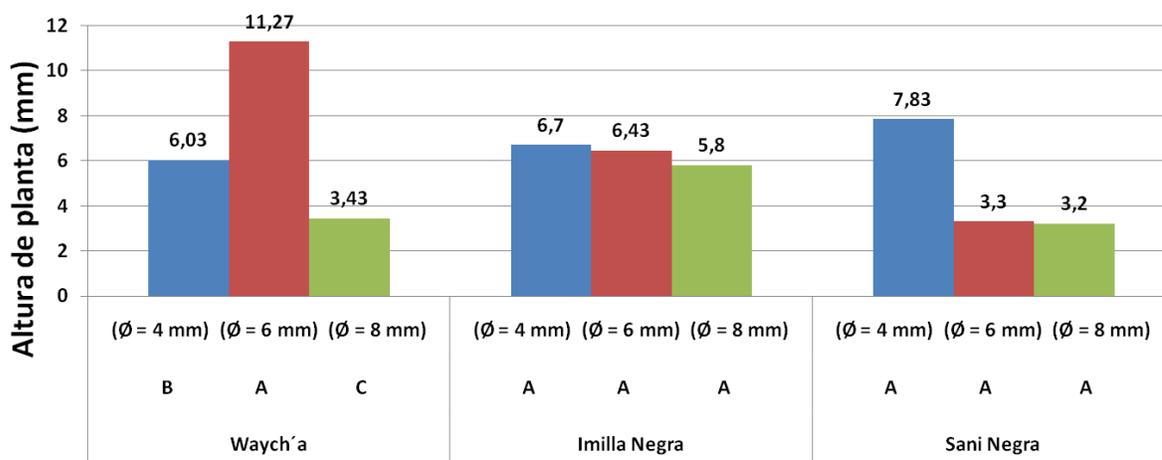
**Cuadro 5.** Análisis de varianza para altura de planta en cada variedad.

Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Diámetro de cápsula	0,001 *	8,45 %
Imilla Negra	Diámetro de cápsula	0,86 (ns)	14,00 %
Sani Negra	Diámetro de cápsula	0,17 (ns)	22,61 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para altura de planta en cada variedad (cuadro 5), indica que existen diferencias significativas entre los diámetros de semilla artificial en la var. Waych`a, pero no existen diferencias significativas entre los diámetros de capsula en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 8,45 %, 14,00 % y 22,61 % indican que los datos en estudio se encuentran dentro del rango tolerable para esta investigación.



**Figura 11.** Comparación de medias de altura de planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %).

En figura 11, se observan las comparaciones de medias por prueba de Duncan al (5%), para cada variedad, donde se confirma que existen diferencias entre los diámetros de

semilla artificial es decir 6 mm es diferente de 4 mm y de 8 mm para la var. Waych`a, por otro lado en las variedades Imilla Negra y Sani Negra no existen diferencias entre los diámetros de cápsula es decir los tratamientos proporcionan condiciones uniformes para la variable altura de planta.

El principal argumento que se tiene en vista de las diferencias en la variable altura de planta originadas de las semillas artificiales, es el hecho de que los meristemos axilares de papa tuvieron que superar la resistencia física que tienen los endospermos artificiales ocasionando que hubiera un desarrollo desigual de las vitro-plantas, lo que también fue estudiado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes mencionaron que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece el endospermo, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones emergentes de las semillas sintéticas.

Las variaciones en altura de planta en la evaluación de diámetros de semilla artificial contradicen lo afirmado por Navarro (2002), que asevera que el encapsulado en alginato de sodio no presentó factores inhibidores sobre el crecimiento de los meristemos, ni representa una barrera para la elongación del brote.

El tamaño de los meristemos axilares de papa también influyó en las diferencias en la variable alturas de planta en las semillas artificiales, porque no todos los meristemos

utilizados tuvieron un mismo tamaño lo que llevo a un desarrollo desuniforme de las vitro-plantas, lo cual está de acuerdo con lo mencionado por Jiménez (1999); citado por Monrroy (2009), quien señala que a medida que el explante varia de tamaño el crecimiento es desigual, cuando el explante es más pequeño menor es el riesgo de contaminación pero la regeneración es más difícil, mientras que con el aumento del tamaño del explante el peligro de contaminación es mayor pero la regeneración y el crecimiento son más rápidos.

Otro factor a mencionar no menos importante con relación al desnivel en la altura de vitro-plantas es la relacionada con la composición de los medios de cultivo utilizados en la formación de las semillas artificiales (Anexo 3 - 5), fundamentalmente lo relacionado a la concentración adecuada de vitaminas ya que ellas promueven el desarrollo de brotes en los explantes, esto también fue resaltado por Durán *et al.* (2004); citado por Aliaga (2008), quién indica que el complejo de vitaminas tiene un efecto significativo en la altura de las plántulas en los primeros 15 días después de la multiplicación.

#### **5.1.1.4 Número de nudos**

A continuación se resaltan los valores más sobresalientes por tratamiento y variedad, donde los resultados indican un número de nudos promedio de 1,07 para el diámetro de semilla artificial de ( $\varnothing = 6$  mm) en la variedad Waych`a, mientras que la var. Imilla Negra registro un valor de 0,73 para el diámetro de cápsula de ( $\varnothing = 6$  mm) y por último la var. Sani Negra con 0,6 para un diámetro de ( $\varnothing = 4$  mm).

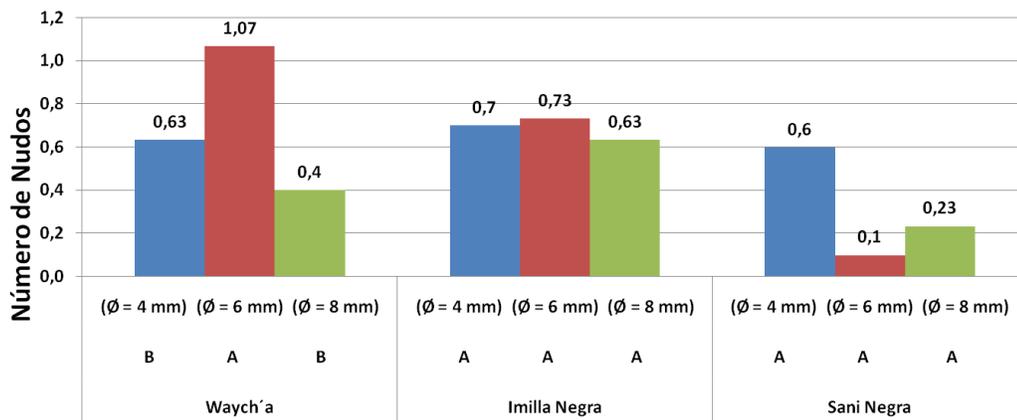
**Cuadro 6.** Análisis de varianza para el número de nudos en cada variedad.

Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Diámetro de cápsula	0,009 *	5,15 %
Imilla Negra	Diámetro de cápsula	0,79 (ns)	5,54 %
Sani Negra	Diámetro de cápsula	0,37 (ns)	14,18 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para número de nudos por planta para cada variedad (cuadro 6), indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de semilla artificial en la var. Waych`a, pero no existen diferencias en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 5,15 %, 5,54 % y 14,18 % indica que los datos en estudio son confiables y que hubo un manejo adecuado de las unidades experimentales.



**Figura 12.** Comparación de medias del número de nudos por planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 12, se observan las comparaciones de medias por prueba de Duncan al (5 %), por cada variedad para la variable número de nudos / planta, donde se denota que existen diferencias entre los diámetros de ( $\varnothing = 6$  mm) con un valor de 1,07, ( $\varnothing = 4$  mm)

y ( $\varnothing = 8$  mm) con valores de 0,63 y 0,40 respectivamente en la variedad Waych`a, por otra parte en las variedades Imilla Negra y Sani Negra no existe diferencias entre los diámetros cápsula es decir que los tratamientos son iguales.

Las diferencias en la variable número de nudos por planta procedentes de las semillas artificiales de tres variedades de papa se debió en gran parte a que los meristemas axilares utilizaron gran cantidad de energía superando la resistencia física que ofrecen los endospermos artificiales provocando que haya desigualdad en el desarrollo de las vitro-plantas, lo mismo que estudió Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes mencionan que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece el endospermo, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones desarrollados a partir de semillas sintéticas.

De igual manera un factor que influyó en una pobre formación de nudos por planta fue el tamaño de los meristemas axilares encapsulados, ya que no todos los meristemas tuvieron un mismo tamaño esto concuerda con lo dicho por Roca y Mroginski (1991); citado por Navarro (2002), quienes aseguran que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad encontrada para fomentar la producción de brotes.

Adicionalmente otro factor no menos importante que determino la presencia de nudos en las vitro-plantas provenientes de semillas artificiales es la facultad de regeneración

característica propia de cada variedad de papa, igualmente Ponce (1998); citado por Aliaga (2008), menciona que el comportamiento diferente de las variedades puede atribuirse a diferencias intrínsecas características de cada variedad, así también a la capacidad de regeneración que tienen las plantas que están estrechamente relacionadas con el genotipo de las especies.

#### 5.1.1.5 Número de raíces

Los valores más altos por tratamiento y variedad se denotan a continuación, obteniendo un número de raíces promedio por planta de 1,53 para un diámetro de capsula de 6 mm en la var. Waych`a, por otro lado con unos valores de 0,8 y 0,9 raíces por vitro-planta para las variedades Imilla Negra y Sani Negra respectivamente ambos con un diámetro de cápsula de 4 mm.

**Cuadro 7.** Análisis de varianza para el número de raíces en cada variedad.

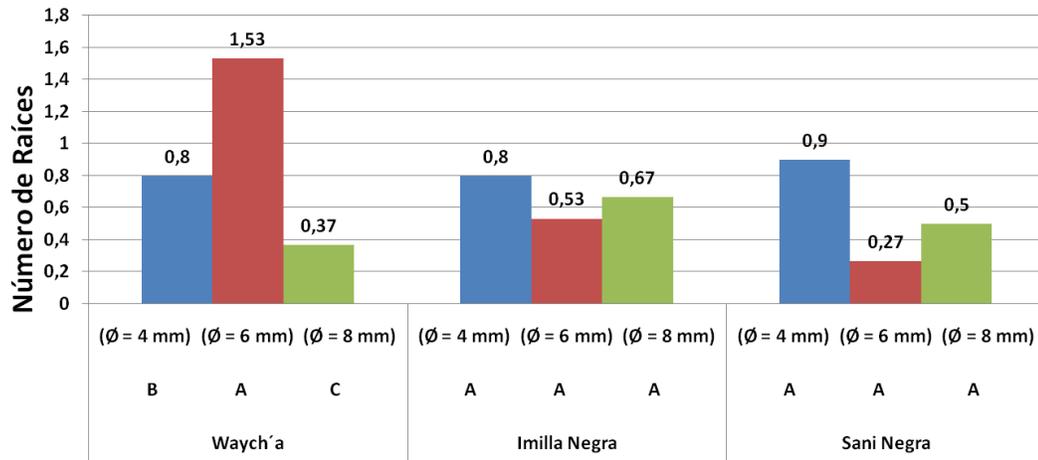
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Diámetro de cápsula	0,001 *	5,84 %
Imilla Negra	Diámetro de cápsula	0,73 (ns)	12,79 %
Sani Negra	Diámetro de cápsula	0,27 (ns)	12,77 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para la variable número de raíces por planta para cada variedad (cuadro 7), indican que existen diferencias significativas entre los diámetros de semilla artificial en la var. Waych`a, pero no existen diferencias entre los diámetros de

cápsula en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 5,84 %, 12,79 % y 12,77 % indica que los datos en estudio son confiables y que hubo un manejo adecuado de las unidades experimentales.



**Figura 13.** Comparación de medias del número de raíces por planta por efecto de los diámetros de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 13, se observan la comparaciones de medias por prueba de Duncan al (5 %), para cada variedad, donde se indican las diferencias de diámetros de semilla artificial con valores de 1,53, 0,8 y 0,37 raíces por planta, para los diámetros de cápsula de 6 mm, 4 mm y 8 mm respectivamente en la variedad Waych`a, por otra parte no existen diferencias entre los diámetros de cápsula en las variedades Imilla Negra y Sani Negra, es decir que proporcionan condiciones uniformes para el número de raíces.

El factor fundamental que influyó en el desarrollo desigual de raíces emergentes de semillas artificiales fue la resistencia física que ofrecen las cápsulas de alginato de sodio promoviendo un desequilibrio en el desarrollo de las vitro-plantas, esto también es señalado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el

crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece el endospermo, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones que surgen de las semillas sintéticas.

Un factor recurrente que influye en el desarrollo de raíces emergentes de semillas artificiales es el atribuible a la capacidad de regeneración propia de cada variedad de papa lo que concuerda con lo señalado por López (2001); citado por Aliaga (2008), que menciona que el comportamiento diferente entre genotipos se atribuye a las diferencias intrínsecas de cada una de ellas y a su capacidad de regeneración.

De la misma manera y corroborando la anterior afirmación Darías (1993); citado por Monrroy (2009), menciona también que las diferencia en el número de raíces es atribuible a las características fisiológicas propias de cada ecotipo.

Otro factor no menos importante a tomar en cuenta es la que se relaciona con la composición del medio de cultivo que pueda contener cierta concentración de vitaminas que favorecen la formación de raíces mencionado por Rodríguez (1999), quien señala que la función de las vitaminas en la formación de raíces es muy importante, se debe tomar en cuenta que la mayor parte del sistema radicular de la planta no sintetiza una cantidad suficiente de tiamina y otros nutrientes para satisfacer sus necesidades por lo que el medio de cultivo debe disponer de los nutrientes necesarios.

Finalmente un factor ambiental que pudo influir en la formación de raíces es el que señala Pierik (1990); citado por Monrroy (2009), que indica que la luz provoca un efecto inhibitorio sobre la formación de raíces, ya que las plantas cultivadas en la oscuridad enraízan mejor. Esta afirmación es elemental puesto que el sistema radicular posee fototropismo negativo y al suministrar 16 hrs. luz indirectamente se está limitando el enraizamiento de las plantas.

### **5.1.2 Evaluación de tratamientos de desecado en semillas artificiales**

Continuando con las evaluaciones en laboratorio y en vista de los resultados de la evaluación de diámetros de cápsula por variedad, se enmarca que para los próximos resultados se utilizó los siguientes diámetros de semilla artificial, para la var. Waych`a 6 mm y para las variedades Imilla Negra y Sani Negra 4 mm. Los análisis de varianza y pruebas de Duncan de las variables de repuesta de cada variedad de papa se resumieron en los siguientes cuadros (8 – 12) y figuras (14 – 18), se describe en detalle los datos procesados por el programa InfoStat en el (Anexo 11).

#### **5.1.2.1 Porcentaje de supervivencia**

Los resultados expuestos a continuación muestran los valores más altos por tratamiento y variedad donde tenemos un 70 % de supervivencia para un tiempo de desecado de 2 horas en la var. Waych`a, por otro lado se tiene unos valores de 72,5 % y 10 % de supervivencia para un tiempo de desecado de semilla artificial de 2 horas para las variedades Imilla Negra y Sani Negra respectivamente.

**Cuadro 8.** Análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia en cada variedad.

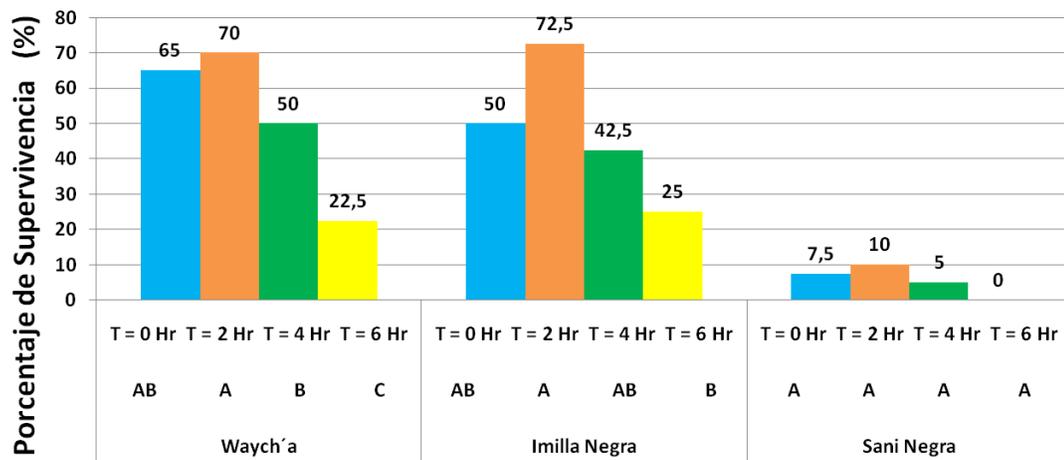
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Tiempo de desecado	<0,0001 *	4,58 %
Imilla Negra	Tiempo de desecado	0,08 (ns)	15,54 %
Sani Negra	Tiempo de desecado	0,22 (ns)	72,96 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para la variable porcentaje de supervivencia en cada variedad (cuadro 8), indican que existen diferencias significativas entre los tiempos de desecado de semilla artificial en la var. Waych`a, pero no existen diferencias entre los tratamientos de desecado en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 4,58 % y 15,54 % indican que los datos en estudio son confiables, pero un coeficiente de 72,96 % indica que los datos en estudio no son del todo confiables.

El coeficiente de variación alto es atribuible a que los datos experimentales no siguen una distribución normal por un número insuficiente de repeticiones (Reyes, 1990).



**Figura 14.** Comparación de medias del porcentaje de supervivencia por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 14, se observan las pruebas de rango múltiple de Duncan al (5 %), por cada variedad, donde se denota que los tiempos de desecado de 0 (testigo), 2, y 4 horas son iguales pero son diferentes con relación al tratamiento de 6 horas en la var. Waych`a, pero por otra parte en las variedades de Imilla Negra y Sani Negra no existen diferencias entre los tratamientos de desecado, es decir todos los tratamientos proporcionan iguales condiciones para la supervivencia.

Las variaciones existentes entre los porcentajes de supervivencia en las tres variedades de papa se debe fundamentalmente a los tratamientos de desecado sobre las semillas artificiales, porque la deshidratación provoca una reducción del volumen y endurecimiento de las cápsulas de alginato de sodio, promoviéndose a su vez diferencias en las vitro-plantas, esto también fue descrito por Hebe y Mroginski (2001); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes manifestaron que la desecación constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas de semillas sintéticas.

Otro factor fundamental que influyó en el desnivel en los porcentajes de supervivencia es la resistencia mecánica que presentan los endospermos artificiales, afectando el normal desarrollo de los meristemas axilares de papa esta afirmación concuerda con lo estudiado Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece un endospermo excesivamente duro, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy

débil de los embriones que se encuentran dentro de las semillas artificiales.

El desuniforme crecimiento de los brotes procedentes de meristemas axilares de papa se debe al encapsulado en una solución de alginato de sodio, lo que no concuerda con lo que afirma Navarro (2002), que menciona, que el encapsulado en alginato de sodio no presentó factores inhibidores sobre el crecimiento de los meristemas, ni representó una barrera para la elongación del brote.

Un último factor y no menos importante que influyó en los resultados anteriormente presentados fue el tamaño apropiado del meristema a ser encapsulado, porque a pesar de que se utilizó meristemas con tamaños apropiados, no todos fueron iguales, lo que concuerda con lo mencionado por Navarro (2002), que indica que la utilización de meristemas de un tamaño muy pequeño (menor a 2 mm) resulta en una pobre sobrevivencia de semillas artificiales en las pruebas *in vitro*.

#### **5.1.2.2 Porcentaje de contaminación**

No se registró contaminación alguna en la evaluación de los tratamientos de desecado de las semillas artificiales en la variedad Waych`a, por otra parte en las variedades Imilla Negra y Sani Negra se obtuvieron unos valores de 30 % y 97,5 % de contaminación ambos para el tiempo de desecado de cápsula testigo de 0 horas.

Los elevados porcentajes de contaminación indican que el protocolo de producción de semillas artificiales no estuvo libre de agentes contaminantes filtrados en el proceso.

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación en cada variedad.

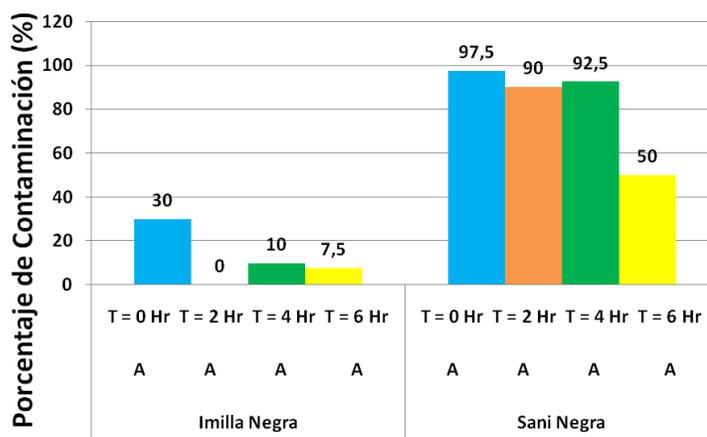
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych´a	Tiempo de desecado	-	-
Imilla Negra	Tiempo de desecado	0,47 (ns)	115,0 %
Sani Negra	Tiempo de desecado	0,11 (ns)	30.68 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para la variable porcentaje de contaminación por cada variedad (cuadro 9), indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de desecado de semilla artificial para las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 115,0 % y 30,67 % indican que los datos en estudio no son del todo confiables y que no hubo un manejo adecuado en laboratorio.

Los valores de los coeficientes de variación considerablemente altos se los atribuye primero a un número insuficiente de repeticiones o unidades experimentales y a que los datos experimentales no siguen una distribución normal (Reyes, 1990).



**Figura 15.** Comparación de medias del porcentaje de contaminación por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 15, se observan las pruebas de rango múltiple de Duncan al (5 %), por cada variedad, donde se denota que no existen diferencias entre los tratamientos de desecado de 0 (testigo), 2, 4 y 6 horas en las variedades Imilla Negra y Sani Negra, es decir que todos los tratamientos proporcionan condiciones uniformes para la variable porcentaje de contaminación.

Los diferentes niveles de contaminación presentes en las semillas artificiales de las variedades Waych`a, Imilla Negra y Sani Negra, se debió a deficiencias en el protocolo de encapsulado y a los tratamientos de desecado, porque los medios empleados en la presente investigación contenían un nivel considerable de azúcar como fuente de energía (Anexo 3), lo que provocó la aparición de hongos y bacterias, confirmando la presente información Quiala *et al.* (2002), menciona que el hecho de que el endospermo sintético contenga como principal fuente de energía la sacarosa, lo hace un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos.

Confirmando las aseveraciones de que la presencia de niveles relativamente altos de fuentes de energía como el azúcar promueven el desarrollo de microorganismos como los hongos, Sanada y col. (1993); citado por Cruz *et al.* (2005), indican que el empleo de sacarosa como fuente de energía incrementa los riesgos de contaminación de las semillas artificiales, ya que favorece la presencia y proliferación de microorganismos.

Por otra parte no se registro contaminación alguna en la var. Waych`a debido a un buen

manejo en laboratorio y al empleo de un material vegetal adecuado, como lo indica Jiménez (1999); citado por Monrroy (2009), que menciona que mientras más pequeño es el explante, menor es el riesgo de contaminación.

### 5.1.2.3 Altura del explante

A continuación se denotan los datos más relevantes por tratamiento y variedad, donde la altura promedio por planta es 2,23 mm y 0,25 mm en la var. Waych`a y Sani Negra respectivamente ambos para un tiempo de desecado de (T = 2 hr), por otro lado la var. Imilla Negra registro una altura de 6,05 mm para un tiempo testigo de (T = 0 hr).

**Cuadro 10.** Análisis de varianza para altura de planta en cada variedad.

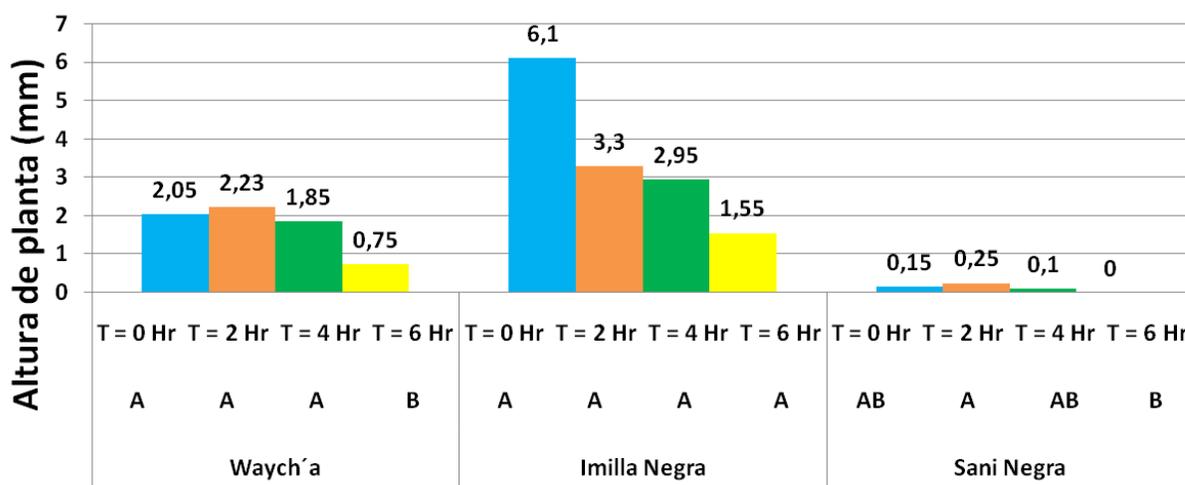
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Tiempo de desecado	0,0002 *	6,70 %
Imilla Negra	Tiempo de desecado	0,35 (ns)	33,84 %
Sani Negra	Tiempo de desecado	0,15 (ns)	6,19 %

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

Los análisis de varianza para la variable altura de planta por variedad (cuadro 10), indican que existen diferencias significativas entre los tiempos de desecado de semilla artificial en la var. Waych`a, por otra parte no se reporta diferencias entre los tratamientos de desecado en las variedades Imilla Negra y Sani Negra. Unos coeficientes de variación de 6,70 % y 6,19 % indican que los datos en estudio son confiables y que hubo un manejo adecuado en laboratorio, pero un coeficiente de

33,84 % indica que los datos no son del todo confiables.



**Figura 16.** Comparación de medias de altura de planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 16, se observan las pruebas de rango múltiple de Duncan al (5 %) por cada variedad, donde se denota que los tiempos de desecado de 0 (testigo), 2 y 4 horas son iguales pero diferentes respecto del tratamiento de 6 horas para la var. Waych`a, por otra parte no se halló diferencias entre los tratamientos de desecado en las variedades Imilla Negra y Sani Negra.

Las diferencias en altura de planta entre los tratamientos de desecado en semillas artificiales para cada variedad de papa, se debió a los tratamientos de desecado sobre las cápsulas de alginato de sodio, porque la deshidratación provocó una pérdida de volumen y endurecimiento de las mismas, que origino los desniveles en las vitro-plantas, este apunte coincide con lo indicado por Hebe y Mroginski (2001); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes manifestaron que la desecación constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas por parte de las semillas sintéticas.

Otro factor importante que influyó en las diferencias en altura de planta emergentes de las semillas artificiales fue la resistencia física a vencer del endospermo artificial por parte de los meristemas axilares de papa, esto coincide con lo estudiado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece un endospermo excesivamente duro, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones emergentes de cápsulas de alginato de sodio.

Por otra parte un factor también influyó en el tamaño de las planta surgidas de las semilla artificiales fue el tamaño apropiado del meristemo axilares a ser encapsulado, porque a pesar de que se utilizó meristemas con tamaños apropiados, no todos fueron iguales, lo que coincide con lo mencionado por Navarro (2002), que indica que la utilización de meristemas de un tamaño muy pequeño (menor a 2 mm) resulta en una pobre sobrevivencia de semillas artificiales en las pruebas *in vitro*.

Como último argumento en discusión sobre los resultados en la variable altura de planta originadas de las semillas artificiales, se denota que pudo haber algún tipo de afectación en células meristemáticas, cuando se aislaron las yemas axilares de papa, provocando un desarrollo desuniforme de las vitro-plantas, lo que coincide con lo que Jiménez (1999); citado por Monrroy (2009), indica que un explante estéril en un medio de cultivo, pueden mostrar regeneración, siempre y cuando sus células

meristemáticas no hayan sido afectadas en el momento de la multiplicación.

#### 5.1.2.4 Número de nudos

No se registró la presencia de nudos en las variedades Waych`a y Sani Negra, por otra parte la var. Imilla Negra registró su valor más alto con un número de nudos promedio por planta de 0,6 para un tiempo de desecado testigo de 0 horas.

**Cuadro 11.** Análisis de varianza para el número de nudos en cada variedad.

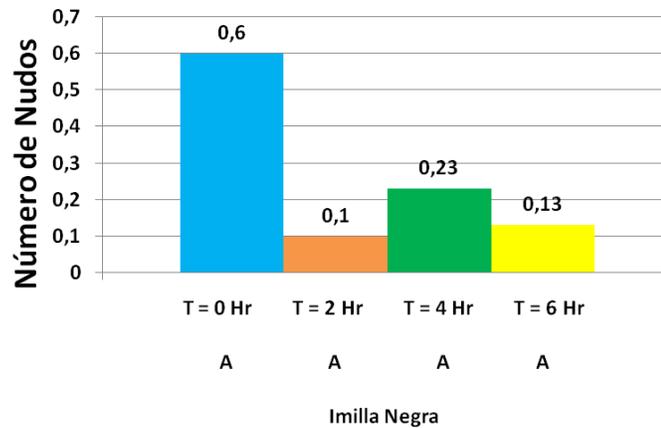
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Tiempo de desecado	-	-
Imilla Negra	Tiempo de desecado	0,21 (ns)	12,65 %
Sani Negra	Tiempo de desecado	-	-

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

El análisis de varianza para la variable número de nudos promedio por planta en la var. Imilla Negra (cuadro 11), indica que no existen diferencias significativas entre los tiempos de desecado de semilla artificial. Un coeficiente de variación de 12,65 % indica que los datos en estudio son confiables.

Según Vicente (2008); citado por Monrroy (2009), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.



**Figura 17.** Comparación de medias del número de nudos por planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 17, se observa la prueba de rango múltiple de Duncan al (5 %), que indica que no existen diferencias entre los tiempos de desecado de 0, 4, 6 y 2 horas, es decir que los tratamientos de desecado son iguales para la variedad Imilla Negra.

Un factor fundamental que influyó drásticamente en los resultados para la variable número de nudos por planta en las tres variedades de papa fueron los tratamientos de desecado sobre las semillas artificiales, porque la deshidratación de las cápsulas de alginato de sodio, provocaron una disminución del volumen y endurecimiento de las mismas esto llevo a una pérdida del vigor de los meristemas axilares encapsulados, afirmación que concuerda con lo dicho por Hebe y Mroginski (2001); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes manifestaron que la desecación constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas originadas de semillas sintéticas.

La resistencia a vencer del endospermo artificial por parte de los meristemas axilares de papa, fue un factor que influyó a la par de los tratamientos de desecado en las semillas

artificiales, razón por la cual hay un desarrollo muy pobre en la variable número de nudos por planta, esto coincide con lo manifestado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece un endospermo excesivamente duro, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones originados de semillas sintéticas.

Complementando las razones fundamentales que originaron un pobre desarrollo en la variable número de nudos por planta surgidas de las semilla artificiales, fue el tamaño apropiado del meristemo axilares de papa encapsulado, porque a pesar de que se utilizó meristemas con tamaños apropiados, no todos fueron iguales, lo que concuerda con lo mencionado por Navarro (2002); que indica que la utilización de meristemas de un tamaño muy pequeño (menor a 2 mm) resulta en una pobre sobrevivencia de semillas artificiales en las pruebas *in vitro*.

Como un último argumento a mencionar dentro de la investigación, mencionaremos que las diferentes características propias de cada variedad de papa, como la capacidad de regeneración influyó en el desigual desarrollo en la variable número de nudos por planta, lo que está en total acuerdo con lo mencionado por Ponce (1998); citado por Aliaga (2008), que indica que el comportamiento diferente de las variedades puede atribuirse a diferencias intrínsecas características de cada variedad, así también a la

capacidad de regeneración que tienen las plantas que están estrechamente relacionadas con el genotipo.

#### 5.1.2.5 Número de raíces

No se registró la presencia de raíces en las variedades Waych`a y Sani Negra, pero por otro lado la variedad Imilla Negra, reportó su valor más alto con un número de raíces promedio por planta de 1 para un tiempo de desecado testigo de 0 horas.

**Cuadro 12.** Análisis de varianza para el número de raíces en cada variedad.

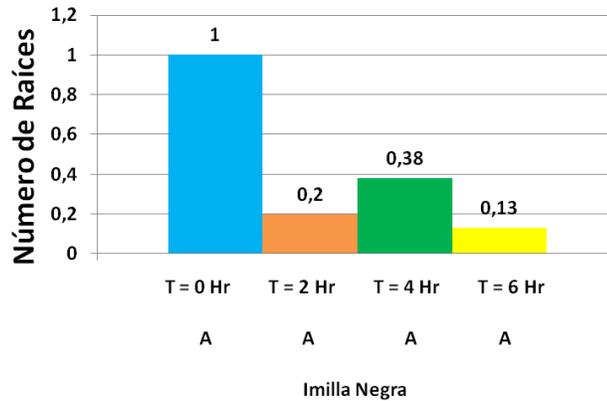
Variedad de Papa	Tratamiento en Prueba	Probabilidad al 5%	Coefficiente de Variación (CV)
Waych`a	Tiempo de desecado	-	-
Imilla Negra	Tiempo de desecado	0,18 (ns)	17,62 %
Sani Negra	Tiempo de desecado	-	-

\* = Es significativo al 5 %

(ns) = No significativo al 5 %

El análisis de varianza para la variable número de raíces por planta para la var. Imilla Negra (cuadro 12), indica que no existen diferencias significativas entre los tiempos de desecado de semilla artificial. Un coeficiente de variación de 17,62 % indica que los datos en estudio son confiables y que hubo un manejo adecuado en laboratorio.

A decir de Vicente (2008); citado por Monrroy (2009), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.



**Figura 18.** Comparación de medias del número de raíces por planta por efecto de los tratamientos de desecado de semilla artificial. Duncan (5 %).

En la figura 18, se observa la prueba de rango múltiple de Duncan al (5 %), que indica que no existe diferencias entre los tiempos de desecado de 0, 4, 2 y 6 horas en la variedad Imilla Negra, es decir que los tratamientos son iguales.

Un desarrollo pobre y desigual en la variable número de raíces por planta originadas a partir de semillas artificiales en las tres variedades de papa en estudio, se debió fundamentalmente a los tratamientos de desecado sobre las cápsulas de alginato de sodio, porque la desecación provocó una disminución del tamaño de las cápsulas y la vez afectando al meristemo axilar de papa influyendo en su desarrollo, esto coincide con lo descrito por Hebe y Mroginski (2001); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes manifestaron que la desecación constituye la principal causa de los bajos valores de conversión en plantas de las semillas sintéticas.

Por otra parte un segundo factor determinante en el desarrollo pobre en la variable número de raíces por planta fue la resistencia a superar del endospermo artificial por

parte de los meristemas axilares de papa en las semillas artificiales, esto corrobora lo estudiado por Deng y col. (1990); citado por Cruz *et al.* (2005), quienes indican que el crecimiento de los embriones puede ser afectado por la resistencia mecánica que ofrece un endospermo excesivamente duro, ocasionando que una gran parte de la energía disponible sea utilizada en vencer la misma promoviéndose un crecimiento muy débil de los embriones originados de semillas sintéticas.

Continuando con los factores prioritarios que influyeron con los resultados de la investigación y propiamente con un desarrollo muy pobre en la variable número de raíces por planta emergentes de las semillas artificiales, estuvo el tamaño de los meristemas axilares de papa, que a pesar de utilizar los mejores ejemplares no todos ellos tuvieron un mismo tamaño y en consecuencia hubo un desarrollo desuniforme, lo que coincide con lo dicho por Roca y Mroginski (1991); citado por Navarro (2002), quienes aseguran que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad encontrada para fomentar la producción de raíces.

Las características propias de cada variedad de papa como la capacidad de regeneración, fueron uno de los factores influyentes dentro de los resultados en la variable número de raíces por planta, porque a decir de López (2001); citado por Aliaga (2008), el comportamiento diferente entre genotipos se atribuye a las diferencias intrínsecas de cada una de ellas y a su capacidad de regeneración.

Un factor a discutir por el grado de su influencia, es la concentración de vitaminas dentro de los medios de cultivo utilizados en la investigación (Anexo 1 - 5), que pudieron influir en el desarrollo en la variable número de raíces por planta porque a decir Rodríguez (1999), que señala que la función de las vitaminas en la formación de raíces es muy importante, se debe tomar en cuenta que la mayor parte del sistema radicular de la planta no sintetiza una cantidad suficiente de tiamina y otros nutrientes para satisfacer sus necesidades por lo que el medio de cultivo debe disponer de los nutrientes necesarios.

Las condiciones en cámara de crecimiento también pudieron influir en los resultados de la variable número de raíces por planta porque a decir de Pierik (1990); citado por Monroy (2009), que indica que la luz provoca un efecto inhibitorio sobre la formación de raíces, ya que las plantas cultivadas en la oscuridad enraízan mejor, esta afirmación es elemental puesto que el sistema radicular posee fototropismo negativo y al suministrar 16 hrs. luz indirectamente se está limitando el enraizamiento de las plantas.

### **5.1.3 Comparación de variables de respuesta por tratamientos y variedades de papa**

A continuación se muestra el cuadro 13 que sintetiza la evaluación de diámetros de semilla artificial por variables de respuesta y variedades de papa, por otra parte también describen y resaltan las variedades con el respectivo diámetro de cápsula de mejor desempeño ante las variables en estudio:

**Cuadro 13.** Comparación de diámetros de semilla artificial por variables de respuesta y variedades de papa.

Diámetros de semilla artificial																
Variables de respuesta	% Supervivencia			% Contaminación			Altura de planta (mm)			Número de nudos			Número de Raíces			
	Ø = 4 mm	Ø = 6 mm	Ø = 8 mm	Ø = 4 mm	Ø = 6 mm	Ø = 8 mm	Ø = 4 mm	Ø = 6 mm	Ø = 8 mm	Ø = 4 mm	Ø = 6 mm	Ø = 8 mm	Ø = 4 mm	Ø = 6 mm	Ø = 8 mm	
Tratamiento (Diámetros de cápsula)	Promedio			Promedio			Promedio			Promedio			Promedio			
	Waych`a	70	93,33	43,33	0	0	0	6,03	11,27	3,43	0,63	1,07	0,40	0,8	1,53	0,37
	Imilla Negra	60	53,33	46,67	0	3,33	0	6,7	6,43	5,8	0,7	0,73	0,63	0,8	0,53	0,67
	Sani Negra	76,67	60	46,67	0	26,67	3,33	7,83	3,3	3,2	0,6	0,1	0,23	0,9	0,27	0,5

- **Waych`a:** Diámetro de semilla 6 mm, con un 93,33 porciento de supervivencia, no se registró contaminación, altura de planta de 11,27 mm, número de nudos de 1,07 y número de raíces de 1,53.
- **Imilla Negra:** Diámetro de semilla 4 mm, con un 60 porciento de supervivencia, no se registró contaminación, altura de planta de 6,7 mm, número de nudos de 0,7 y número de raíces de 0,8.
- **Sani Negra:** Diámetro de semilla 4 mm, con un 76,67 porciento de supervivencia, no se registró contaminación, altura de planta de 7,83 mm, número de nudos de 0,6 y número de raíces de 0,9.

Se denota a continuación el cuadro 14 que resume la evaluación de los tratamientos de desecado de las semillas artificiales por variables de respuesta y por variedad de papa, por otra parte también describen y resaltan las variedades con el respectivo tratamiento de desecado de semilla artificial de mejor desempeño frente a las variables en estudio:

**Cuadro 14.** Comparación de tratamientos de desecado de semilla artificial por variables de respuesta y variedades de papa.

Tratamientos de desecado de semilla artificial																					
Variables de respuesta	% Supervivencia				% Contaminación				Altura de planta (mm)				Número de nudos			Número de Raíces					
	T = 0 hr (Test)	T = 2 hr	T = 4 hr	T = 6 hr	T = 0 hr (Test)	T = 2 hr	T = 4 hr	T = 6 hr	T = 0 hr (Test)	T = 2 hr	T = 4 hr	T = 6 hr	T = 0 hr (Test)	T = 2 hr	T = 4 hr	T = 6 hr	T = 0 hr (Test)	T = 2 hr	T = 4 hr	T = 6 hr	
Variedades de papa	Promedio				Promedio				Promedio				Promedio			Promedio					
	Waych`a				Imilla Negra				Sani Negra												
	65	70	50	22,5	0	0	0	0	2,05	2,23	1,85	0,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	72,5	42,5	25	30	0	10	7,5	6,05	3,3	2,95	1,55	0,6	0,1	0,23	0,13	1	0,2	0,38	0,13	
	7,5	10	5	0	97,5	90	92,5	50	0,15	0,25	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- **Waych`a:** Tiempo de desecado de semilla artificial de 2 horas, con un 70 por ciento de supervivencia, no se registró de contaminación, altura de planta de 2,23 mm, número de nudos de 0 y número de raíces de 0.

- **Imilla Negra:** Tiempo de desecado de semilla artificial de 2 horas, con un 72,5 por ciento de supervivencia, no se registró contaminación, altura de planta de 3,3 mm, número de nudos de 0,1 y número de raíces de 0,2.
- **Sani Negra:** Tiempo de desecado de semilla artificial de 2 horas, con un 10 por ciento de supervivencia, se registró 90 por ciento de contaminación, altura de planta de 0,25 mm, número de nudos de 0 y número de raíces de 0.

Observando el cuadro 13 se puede afirmar que los resultados en la evaluación de diámetros de semilla artificial estuvieron influenciados principalmente por tres factores los cuales fueron: la primera la resistencia mecánica del endospermo artificial que tienen que superar los meristemas axilares de papa (Deng y col., 1990; citado por Cruz *et al.*, 2005), la segunda el tamaño apropiado de meristemo porque no todos fueron iguales y que tamaños muy pequeños (menor a 2 mm) resultaron en una pobre sobrevivencia de semillas artificiales (Navarro, 2002), y la tercera la que está relacionada con las diferencias intrínsecas propias de cada variedad como la capacidad de regeneración ligada siempre al genotipo Ponce (1998); citado por Aliaga (2008).

Por otra parte observando el cuadro 14, se puede enfatizar que en la evaluación de los tratamientos de desecado de semilla artificial, los principales factores que influyeron en los resultados fueron: en primer lugar los tratamientos de desecado en las semillas artificiales, que provocaron una reducción del tamaño y endurecimiento de la cápsulas haciendo difícil el desarrollo de los meristemas Hebe y Mroginski (2001); citado por

Cruz *et al.* (2005), continuando con los factores influyentes tenemos la resistencia mecánica del endospermo artificial, el tamaño apropiado del meristemo y las características propias de cada variedad, mismas que se mencionaron anteriormente en el cuadro 13.

## **5.2 Etapa de invernadero**

### **5.2.1 Porcentaje de supervivencia**

Los resultados en esta etapa fueron negativos, no se registró datos de supervivencia de semillas artificiales de ninguna de las variedades puestas a prueba en camas de almácigo en invernadero, las razones serán discutidas con fundamentos.

Un factor a destacar en la presente investigación es la necesidad de un mayor control sobre los niveles de humedad en el sustrato utilizado en invernadero para la brotación y desarrollo de las semillas artificiales, porque a decir de Navarro (2002), es necesario el control de la humedad del sustrato debido a que la membrana del alginato de sodio presenta un alto grado de permeabilidad y un grosor relativamente bajo, lo que permite un movimiento de agua desde la cápsula hacia el sustrato, provocando así una deshidratación y la posible muerte del explante si el porcentaje de humedad alcanza valores muy bajos.

El tamaño apropiado de los meristemos axilares encapsulados, los tratamientos de desecado, la resistencia mecánica del endospermo artificial, y las características

propias de cada variedad de papa son factores a tomar en cuenta, los mismos que fueron discutidos en los cuadros 13 y 14, en la evaluación en laboratorio pero que también son validos en invernadero.

Otro factor a tomar en cuenta es la necesidad de la esterilización del sustrato, porque a decir de Navarro (2002), es necesaria la desinfección de los sustratos debido a la presencia de azúcar en la solución interna de la cápsula (semilla artificial), lo que provoca la colonización por microorganismos.

## 6. CONCLUSIONES

- En cuanto a la evaluación en laboratorio de tres diámetros de cápsulas de alginato de sodio, se observó que existe regeneración de vitro plantas a partir de meristemas con cierto diámetro de cápsula para cada variedad de papa; en consecuencia se indicarán seguidamente los valores más notables por cada variable de respuesta, anteponiendo siempre que los diámetros de mejor desempeño fueron: Waych`a con ( $\varnothing = 6$  mm), Imilla Negra y Sani Negra con ( $\varnothing = 4$  mm).
- Para la variable porcentaje supervivencia de las semillas artificiales la var. Waych`a logro registrar un 93,33 por ciento y las variedades Imilla Negra y Sani Negra registraron valores de 60 y 76,67 por ciento respectivamente.
- En cuanto a la variable porcentaje de contaminación el 100 por ciento de las semillas artificiales, de las variedades de papa Waych`a, Imilla Negra y Sani Negra estuvieron libres de agentes contaminantes.

- Continuando con la variable altura de planta promedio la variedad Waych`a registró un valor de 11,27 milímetros mientras que las variedades Imilla Negra y Sani Negra obtuvieron alturas de 6,7 y 7,83 milímetros.
- La variable número de nudos promedio por planta registró lo siguiente, la var. Waych`a obtuvo un valor de 1,07 nudos y las variedades Imilla Negra y Sani Negra obtuvieron 0,7 y 0,6 nudos por explante respectivamente.
- Finalizando la evaluación de diámetros de cápsula, la variable número de raíces promedio por planta destacó que la var. Waych`a obtuvo un valor de 1,53 raíces, mientras que las variedades Imilla Negra y Sani Negra registraron valores de 0,8 y 0,9 raíces por explante respectivamente.
- Continuando con las evaluaciones en laboratorio, se determinó que existen efectos de los tratamientos de desecado de las cápsulas de alginato de sodio para una adecuada viabilidad de los meristemas de papa, en consecuencia se concluyó que el tiempo de deshidratación de 2 horas fue el que mejor desempeño logró en las tres variedades de papa Waych`a, Imilla Negra y Sani Negra y también en las variables de respuesta de esta investigación.
- En cuanto a la variable porcentaje de supervivencia de las cápsulas de alginato de sodio desecadas la var. Waych`a registró un 70 por ciento y las variedades Imilla Negra y Sani Negra obtuvieron 72,5 y 10 por ciento respectivamente.

- Para la variable porcentaje de contaminación de semillas artificiales desecadas en las variedades Waych`a y Imilla Negra no se registró contaminación por otra parte la var. Sani Negra obtuvo un 90 por ciento de sus cápsulas desecadas contaminadas.
- Continuando con la variable altura promedio de planta la variedad Waych`a logró un registro de 2,23 milímetros y las variedades Imilla Negra y Sani Negra registraron valores de 3,3 y 0,25 milímetros respectivamente.
- En la variable número de nudos promedio por planta la var. Imilla Negra registró un valor de 0,1 nudos y en las variedades Waych`a y Sani Negra no se observó desarrollo de nudos.
- Concluyendo la evaluación en laboratorio de los tratamientos de desecado en las cápsulas de alginato de sodio, se tiene la última variable que es número de raíces promedio por planta donde la var. Imilla Negra registró un valor de 0,2 raíces y las variedades Waych`a y Sani Negra no registraron desarrollo de raíces por causa del tratamiento de desecado en las semillas artificiales.
- Finalmente en la evaluación de las fases fenológicas de las variedades de papa obtenidas a partir de semilla artificial durante el primer ciclo productivo en invernadero, no se registro supervivencia alguna de las semillas artificiales provenientes de laboratorio, lo que no permitió un análisis estadístico, la aclimatización y desarrollo de los meristemas encapsulados estuvo influenciada por el tamaño del meristemo y el tratamiento de desecado.

## 7. RECOMENDACIONES GENERALES

- Para aumentar el porcentaje de supervivencia de las semillas artificiales en laboratorio se recomienda utilizar meristemas de considerable tamaño ( **$\geq 2$  mm**).
- Se recomienda aumentar la concentración reguladores de crecimiento al medio de encapsulado de meristemas, para mejorar los porcentajes de supervivencia.
- Se recomienda evaluar otras soluciones de encapsulado de meristemas para la formación de semillas artificiales.
- Se recomienda el empleo de embriones somáticos para la formación de semillas artificiales de variedades nativas de papa.
- En las evaluaciones en invernadero de las semillas artificiales se recomienda el uso de distintas combinaciones y materiales para el sustrato.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Achá, D.; Fortúrbel, F.; Moncada, D.; Zambrana, I. 1999. Introducción a la Botánica. Manual Universitario. Laboratorio de Biología "San Calixto". Impreso en La Paz - Bolivia. 32 p.
- Aliaga, R. 2008. Sustitución de la solución de vitaminas del medio Murashigue y Skoog (1962) por extracto de harina de quinua y cañahua para la multiplicación "in vitro" de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum spp andigenum*). Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 73 p.
- Alva, S.; Menéndez, A.; Oropeza, M.; Vargas, T. 2010. Guía de Practicas Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Departamento de Botánica. Caracas, Venezuela. Consultado 7 abril 2012. Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/andrea.menendez/archivos/GuiadePracticas2010-11-completa-public2.pdf>
- Artola, A. 2002. La semilla artificial y su tecnología (en línea). Monografías.com. Consultado 7 agosto 2012. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/semar/semar.shtml>
- Badillo, J.; Oliver, M.; Moreno, K.; Pacheco, V.; Cortes, H. 2009. Manual del laboratorio de cultivo de tejidos. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. México D. F. 11 p.
- Barba, A.; Luna, B.; Romero, J. 2001. Micro propagación de plantas. Editorial Trillas. México D.F. pp. 7-53.
- Cadmo, R. 1990. Fundamentos teórico – prácticos del cultivo de tejidos Vegetales. Editorial FAO. pp. 25-27.

- Cruz, N.; Nieves, N. y Ramos, L. 2005. Avances en la encapsulación *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.), con fines de conservación y mejoramiento genético. Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Consultado 7 mayo 2012. Disponible en: [http://www.uteq.edu.ec/eventos/2007/congreso\\_biotecnologia/biotecnologia/archivos/92.pdf](http://www.uteq.edu.ec/eventos/2007/congreso_biotecnologia/biotecnologia/archivos/92.pdf)
- Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Centro internacional de la papa. PROINPA. La Paz-Bolivia. pp. 308-329.
- Flores, O. 2010. Determinación de Iones  $Ca^{++}$  Mediante el Método de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) en Capsulas de Alginato. Tesis. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Carrera Químico Farmacéutico Biólogo. Orizaba, Ver.-México. 12 p.
- Fontúrbel, F.; Acha, D.; Moncada, D. 2007. Manual de Introducción a la Botánica. 2º Edición, Editorial. Publicaciones Integrales, La Paz-Bolivia. pp. 53,127-129.
- Guidi, A.; Mamani, P. 2001. Características de la Cadena Agroalimentaria dela Papa y su Industrialización en Bolivia. PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 21p.
- González, O.; Silva, J. y Espinoza, A. 2004. “La semilla artificial. Una solución en la biodiversidad mundial”. Cuadernos de biodiversidad. N° 15. Editor: Universidad de Alicante. Centro Iberoamericano de la Biodiversidad. pp. 17-22. Consultado 7 mayo 2012. Disponible en: [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1115/1/cuadbiod15\\_3.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1115/1/cuadbiod15_3.pdf)
- Hall, C.; Villalobos, V. 1996. Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma. pp. 15-17.
- Hartmann, H.; Kester, D. 1999. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Séptima Reimpresión. Traducido por: Marino, A. Compañía Editorial Continental S.A. México D.F. 760 p.
- Hewstone, N.; Reyes, M. 2011. Cultivo de tejidos en la agricultura. INIA - La Platina.

Consultado 7 mayo 2012. Disponible en:  
<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR23800.pdf>

- Huasco, V. 2000. Producción de semilla de papa (*Solanum tuberosum ssp. andigena*), Var. Sani Negra por medio de selección positiva, testeo serológico y utilización de brotes de araca, prov. Loayza. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 32 p.
- Hurtado, D.; Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. pp. 67-71.
- Lee, H.; Murguía, J.; Laguna, A.; García, B.; Gámez, M.; Galindo, M.; Landero, I.; Iglesias, L.; Santana, N. 2009. Encapsulación de embriones somáticos de *Laelia anceps ssp. dawsonii* para la producción de semilla sintética. Revista Chapingo. Serie Horticultura, Vol. 15. Núm. 2, pp. 33 - 40. Universidad Autónoma Chapingo. México. Consultado 26 agosto 2011. Disponible en:  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=60912623005>
- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 364 p.
- Litle, T.; Hills, F. 1981. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Tercera reimpresión. Editorial Trillas. México D.F. pp. 133-139.
- López, M. 1995. Fitomejoramiento. Editorial: Trillas. México D.F. 69 p.
- López, C. (s.f.). Semillas artificiales (en línea). Científico en la Estación Experimental La Mayora (CSIC). Consultado 26 agosto 2002. Disponible en:  
<http://www.encuentros.uma.es/encuentros40/semillas.html>
- Mamani, G. 2006. Evaluación de cinco métodos para inducir la brotación en papa de la variedad Waych'a (*Solanum tuberosum L. ssp. Andigena*) en dos localidades de

la provincia Loayza. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 20 p.

Mariscal, P. 2000. Diseminación de nematodos en tubérculos semilla de papa de los agricultores, en el altiplano central del departamento de La Paz. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 12 p.

Mena, F. 2005. Producción ecológica de papa (*Solanum tuberosum ssp. Andigenum*) var. Imilla Negra con la aplicación de abono bocashi en el altiplano central de La Paz. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 37 p.

Merino, R. 2004. Catálogo de variedades locales de papa y oca de la zona de candelaria. PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 18 p.

Monrroy, V. 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 licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 86 p.

Murillo, E. 2012. Semilla Pre-básica de papa de variedades tradicionales es producida en la Estación Experimental de Toralapa. Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF). Consultado el 10 de Abril 2012. Disponible en: [www.iniaf.gob.bo](http://www.iniaf.gob.bo)

Navarro, J. 2002. Encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la crio-conservación y la propagación en invernadero. Informe de práctica de especialidad para optar por el grado de bachiller en ingeniería en biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. San José – Costa Rica. 18 p.

Nieves, N; Blanco, M; González A. y Tapia, R. 2000. Difusión del ácido giberélico a partir de la matriz de alginato de sodio. Efecto sobre la germinación de embriones somáticos de caña de azúcar (en línea). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Consultado 7 junio 2012. Disponible en:

<http://revista.ibp.co.cu/2000/48-difusion-del-acido-giberelico-a-partir-de-la-matriz-de-alginato-de-sodio-efecto-sobre-la-germinacion-de-embriones-somaticos-de-cana-de-azucar.html>

- Nieves, N.; Rodríguez, K.; Cid, M.; Lezcano, Y.; Rodríguez, R. y Daquinta, M. 2010. Encapsulación de ápices de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) en perlas de alginato. Influencia del AIB y elMH-5 (en línea). Lab. de Células y Tejidos, Centro Bioplantas, UNICA. Ciego de Avila, Cuba. Consultado 7 junio 2012. Disponible en: [http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V37-Numero\\_4/cag044101754.pdf](http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V37-Numero_4/cag044101754.pdf)
- Ochoa, C. 2001. Las Papas de Sudamérica: Bolivia. Editorial: Plural. La Paz-Bolivia. 407 p.
- Otazu, V. 2009. Manual de Producción de Semilla de Papa de Calidad Usando Aeroponía. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 15 p.
- Patiño, F.; Condori, B.; Segales, L.; Mamani, A.; Cadima, X. 2008. Atlas de Especies Silvestres y Cultivadas de Papa de Bolivia. Vice-ministerio de Biodiversidad Recursos Forestales y Medio Ambiente (VBRFMA) - BIOVERSITY. La Paz-Bolivia. 89 p.
- Pohlman, J.; Allen, D. 2005. Mejoramiento Genético de las Cosechas. Editorial Limusa. México. 147 p.
- Polar, V. 2001. Programa Nacional de Semillas-Informe Anual Ministerio de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (MAGDR). La Paz-Bolivia. 6 p.
- Programa Nacional de Semillas (PNS). 2008. Ministerio de Desarrollo Rural Agropecuario y Medio Ambiente (MDRAYMA). Lanzamiento del Año Internacional de la Papa en Bolivia-Memoria. Comité Nacional de Año Internacional de la Papa. Editorial Grupo Design. La Paz- Bolivia. 15 p.
- Prosempa. 1998. XVIII Reunión de la Asociación Latinoamericana de la Papa. Compendio de Expositores. Edición Unidad de Promoción y Comunicación Prosempa Cochabamba, Bolivia. 232 p.

- Querejeta, M.; Ochoa, D. y Villares, C. (s.f.). Semilla artificial. Consultado el 21 de mayo 2010. Disponible en: <http://www.google.com.bo/#hl=es&ei=59zhS4PxLsP-8AaMx9mfDQ&sa=X&oi=spellfullpage&resnum=0&ct=result&cd=2&ved=0CAYQvwUoAQ&q=importancia+de+la+semilla+sintetica&spell=1&fp=7d7f5054cf141b51>
- Quiala, E.; Jiménez, E.; Feria, M.; Alvarado, Y.; Chávez, M.; Agramonte, A.; Ramírez, D.; Acosta, M.; Pérez, N. y Capote, A. 2002. Empleo del Vitrofurul en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var Cuba 87- 51. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Villa Clara. Cuba. Consultado el 21 de mayo 2012. Disponible en: <http://revista.ibp.co.cu/2002/127-empleo-del-vitrofurul-en-la-esterilizacion-quimica-del-endospermo-artificial-de-los-embriones-somaticos-encapsulados-de-saccharum-spp-hibrido-var-cuba-87-51-.html>
- Reyes, P. 1990. Bioestadística aplicada. Segunda reimpresión (1995) de la segunda edición. Editorial Trillas. México D.F. pp. 34-35; 173-180.
- Rivero, M. 2011. Cultivo de tejidos vegetales I. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. B.A.-Argentina. pp. 72 -75.
- Roca, W.; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana. pp. 23-25.
- Rodríguez, M. 1999. Morfología y Anatomía Vegetal. Ed. 3° Rev. Los Amigos del Libro. Cochabamba-Bolivia. 514 p.
- Rodríguez, J. 1991. Métodos de Investigación Pecuaria. 1ª ed. D.F.-México. pp.111 - 119.
- Sánchez, 2003. Cultivo y comercialización de papa. Editorial Ripalme. Lima-Perú. 21 p.

- Segretín, M. 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA. ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Consultado el 21 de mayo 2012. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Toledo, J.; Espinoza, N.; Golmirzaie, A. 1998. Cultivo de Tejidos. Manejo de Plántulas In Vitro en la Producción de Semilla de Papa. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP). La Molina. Lima, Perú. 23 p.
- Ugarte, M. 2001. Una herencia de Bolivia para el mundo. PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 2 p.
- Vicente, R. J. 2001. Guía metodológica de diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 3 p.
- Villalba, E. 2003. Adaptación de cinco variedades de papa amarga (*Solanum juzepczukii* Buck.) en diferentes medios de introducción y conservación *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 45 p.
- Zaid, A.; Hughes, H.; Porceddu, E.; Nicholas, F. 2004. Glosario de Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación. Traductores: Fraga, M.; Rodríguez, P.; Cabrera, E. y Alfonso, A. Estudio F A O - Investigación y Tecnología. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma- Italia. 329 p.

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para los medios utilizados en la práctica.

---

Componentes	Concentración (mg/l)
<b>Macroelementos</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
KNO <sub>3</sub>	1900.00
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440.00
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
<b>Microelemntos</b>	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	16.90
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25
CaCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025
<b>Quelatos de Hierro</b>	
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	27.85
Na <sub>2</sub> EDTA*H <sub>2</sub> O	37.25
<b>Vitaminas</b>	
Acido nicotínico	0.50
PiridoxinaHCl	0.50
Tiamina HCl	0.10
Glicina	2.00

---

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

**ANEXOS 2.** Composición del medio de cultivo semi-solidó utilizado para la multiplicación de papa. Medio utilizado en el Estación Experimental de Toralapa.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Quelatos de Hierro	M&S
Vitaminas	M&S
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Pantetonato de Calcio	2 mg/l
Mioinositol	100 mg/l
<b>Hormona</b>	
AG <sub>3</sub>	0.25 mg/l
Sacarosa	25 g/l
<b>Gelificante</b>	
Carragenina	6 g/l
pH	5.7

Fuente: Datos de laboratorio

**ANEXO 3.** Composición del medio de cultivo líquido utilizado para la recuperación de meristemos.

---

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Quelatos de Hierro	M&S
Vitaminas	M&S
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Pantetonato de Calcio	2 mg/l
Mioinositol	100 mg/l
<b>Hormona</b>	
AG <sub>3</sub>	0.50 mg/l
Sacarosa	120 g/l
<b>Gelificante</b>	-----
pH	5.7

---

Fuente: Datos de laboratorio

**ANEXO 4.** Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Quelatos de Hierro	M&S
Vitaminas	M&S
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Pantetonato de Calcio	2 mg/l
Mioinositol	100 mg/l
<b>Hormona</b>	
AG <sub>3</sub>	0.50 mg/l
Sacarosa	120 mg/l
<b>Gelificante</b>	-----
Alginato de sodio	30 g/l
pH	5.7

Fuente: Datos de laboratorio

\* Las formulas con calcio han sido retiradas.

**ANEXO 5.** Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Quelatos de Hierro	M&S
Vitaminas	M&S
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina HCl	0.4 mg/l
Pantetonato de Calcio	2 mg/l
Mioinositol	100 mg/l
<b>Hormona</b>	
AG <sub>3</sub>	0.50 mg/l
Sacarosa	120 mg/l
<b>Gelificante</b>	-----
Cloruro de calcio	100 mM
pH	5.7

Fuente: Datos de laboratorio

\* Las formulas con calcio han sido retiradas.

ANEXO 6. Datos experimentales en la evaluación de efectos para diámetros de semilla artificial.

Variedad	Diámetro	Repetición	% Supervivencia	% Contaminación	Altura de planta	Número de nudos	Número de raíces
1	= 4 mm)	1	90	0	6,9	0,6	0,8
1	= 4 mm)	2	70	0	5,4	0,5	0,8
Variedad de papa Waych'a	= 4 mm)	3	50	0	5,8	0,8	0,8
1	= 6 mm)	1	100	0	11	0,9	1,2
1	= 6 mm)	2	80	0	9,4	0,9	1,5
1	= 6 mm)	3	100	0	13,4	1,4	1,9
1	= 8 mm)	1	50	0	4	0,4	0,2
1	= 8 mm)	2	50	0	4	0,4	0,6
1	= 8 mm)	3	30	0	2,3	0,4	0,3
2	= 4 mm)	1	40	0	3,8	0,5	0,6
2	= 4 mm)	2	70	0	9,1	0,8	0,7
2	= 4 mm)	3	70	0	7,2	0,8	1,1
Variedad de papa Imilla Negra	= 6 mm)	1	50	0	5,5	0,7	0,1
2	= 6 mm)	2	60	0	7,4	0,8	0,6
2	= 6 mm)	3	50	10	6,4	0,7	0,9
2	= 8 mm)	1	40	0	4	0,4	0,1
2	= 8 mm)	2	50	0	7,9	0,9	0,8
2	= 8 mm)	3	50	0	5,5	0,6	1,1
3	= 4 mm)	1	100	0	14,4	1,4	1,8
3	= 4 mm)	2	60	0	5	0,3	0,4
3	= 4 mm)	3	70	0	4,1	0,1	0,5
Variedad de papa Sani Negra	= 6 mm)	1	60	0	3,3	0,2	0,3
3	= 6 mm)	2	70	0	3,5	0	0,2
3	= 6 mm)	3	50	80	3,1	0,1	0,3
3	= 8 mm)	1	50	0	2,9	0,2	0,5
3	= 8 mm)	2	40	0	3,2	0,4	0,5
3	= 8 mm)	3	50	10	3,5	0,1	0,5

ANEXO 7. Datos experimentales transformados en la evaluación de efectos para diámetros de semilla artificial.

Variedad	Diámetro	Repetición	% Supervivencia	% Contaminación	Altura de planta	Número de nudos	Número de raíces
1	= 4 mm)	1	1,95	1	2,81	1,26	1,34
1	= 4 mm)	2	1,85	1	2,53	1,22	1,34
Variedad de papa Waych'a	= 4 mm)	3	1,70	1	2,61	1,34	1,34
1	= 6 mm)	1	2	1	3,46	1,38	1,48
1	= 6 mm)	2	1,90	1	3,22	1,38	1,58
1	= 6 mm)	3	2	1	3,79	1,55	1,70
1	= 8 mm)	1	1,70	1	2,24	1,18	1,10
1	= 8 mm)	2	1,70	1	2,24	1,18	1,26
1	= 8 mm)	3	1,48	1	1,82	1,18	1,14
2	= 4 mm)	1	1,60	1	2,19	1,22	1,26
2	= 4 mm)	2	1,85	1	3,18	1,34	1,30
2	= 4 mm)	3	1,85	1	2,86	1,34	1,45
Variedad de papa Imilla Negra	= 6 mm)	1	1,70	1	2,55	1,30	1,05
2	= 6 mm)	2	1,78	1	2,90	1,34	1,26
2	= 6 mm)	3	1,70	3,31	2,72	1,30	1,38
2	= 8 mm)	1	1,60	1	2,24	1,18	1,05
2	= 8 mm)	2	1,70	1	2,98	1,38	1,34
2	= 8 mm)	3	1,70	1	2,55	1,26	1,45
3	= 4 mm)	1	2	1	3,92	1,55	1,67
3	= 4 mm)	2	1,78	1	2,45	1,14	1,18
3	= 4 mm)	3	1,85	1	2,26	1,05	1,22
Variedad de papa Sani Negra	= 6 mm)	1	1,78	1	2,07	1,10	1,14
3	= 6 mm)	2	1,85	1	2,12	1	1,10
3	= 6 mm)	3	1,70	9	2,02	1,05	1,14
3	= 8 mm)	1	1,70	1	1,97	1,10	1,22
3	= 8 mm)	2	1,60	1	2,05	1,18	1,22
3	= 8 mm)	3	1,70	3,31	2,12	1,05	1,22

ANEXO 8. Datos experimentales en la evaluación de efectos para tiempos de desecado de semilla artificial.

Variedad	Tiempo	Repetición	% Supervivencia	% Contaminación	Altura de planta	Número de nudos	Número de raíces
1	T=0 horas	1	70	0	2,4	0	0
1	T=0 horas	2	50	0	1,7	0	0
1	T=0 horas	3	80	0	2,5	0	0
Variedad de papa Waych`a	T=0 horas	4	60	0	1,6	0	0
1	T=2 horas	1	80	0	2,3	0	0
1	T=2 horas	2	60	0	2,2	0	0
1	T=2 horas	3	70	0	2,7	0	0
1	T=2 horas	4	70	0	1,7	0	0
1	T=4 horas	1	40	0	1,8	0	0
1	T=4 horas	2	50	0	2,1	0	0
1	T=4 horas	3	50	0	2	0	0
1	T=4 horas	4	60	0	1,5	0	0
1	T=6 horas	1	30	0	1,1	0	0
1	T=6 horas	2	20	0	0,6	0	0
1	T=6 horas	3	20	0	0,8	0	0
1	T=6 horas	4	20	0	0,5	0	0
2	T=0 horas	1	10	100	0,2	0	0
2	T=0 horas	2	70	20	12,8	1,2	2,4
2	T=0 horas	3	50	0	3,1	0,2	0,4
Variedad de papa Imilla Negra	T=0 horas	4	70	0	8,3	1	1,2
2	T=2 horas	1	60	0	5,1	0,4	0,6
2	T=2 horas	2	70	0	2,8	0	0,2
2	T=2 horas	3	70	0	2,5	0	0
2	T=2 horas	4	90	0	2,8	0	0
2	T=4 horas	1	50	40	3,5	0,3	0,4
2	T=4 horas	2	40	0	4,8	0,5	0,7
2	T=4 horas	3	30	0	2,1	0,1	0,4
2	T=4 horas	4	50	0	1,4	0	0
2	T=6 horas	1	30	30	0,7	0	0
2	T=6 horas	2	10	0	0,3	0	0
2	T=6 horas	3	20	0	1,5	0,1	0,2
2	T=6 horas	4	40	0	3,7	0,4	0,3
3	T=0 horas	1	0	100	0	0	0
3	T=0 horas	2	10	90	0,2	0	0
3	T=0 horas	3	0	100	0	0	0
3	T=0 horas	4	20	100	0,4	0	0
Variedad de papa Sani Negra	T=2 horas	1	10	80	0,3	0	0
3	T=2 horas	2	10	100	0,3	0	0
3	T=2 horas	3	0	90	0	0	0
3	T=2 horas	4	20	90	0,4	0	0
3	T=4 horas	1	10	100	0,2	0	0
3	T=4 horas	2	0	100	0	0	0
3	T=4 horas	3	10	70	0,2	0	0
3	T=4 horas	4	0	100	0	0	0
3	T=6 horas	1	0	100	0	0	0
3	T=6 horas	2	0	100	0	0	0
3	T=6 horas	3	0	0	0	0	0
3	T=6 horas	4	0	0	0	0	0

ANEXO 9. Datos experimentales transformados en la evaluación de efectos para tiempos de desecado de semilla artificial.

Variedad	Tiempo	Repetición	% Supervivencia	% Contaminación	Altura de planta	Número de nudos	Número de raíces	
Variedad de papa Waych`a	1	T=0 horas	1	1,85	1	1,84	1	1
	1	T=0 horas	2	1,70	1	1,64	1	1
	1	T=0 horas	3	1,90	1	1,87	1	1
	1	T=0 horas	4	1,78	1	1,61	1	1
	1	T=2 horas	1	1,90	1	1,82	1	1
	1	T=2 horas	2	1,78	1	1,79	1	1
	1	T=2 horas	3	1,85	1	1,92	1	1
	1	T=2 horas	4	1,85	1	1,64	1	1
	1	T=4 horas	1	1,60	1	1,67	1	1
	1	T=4 horas	2	1,70	1	1,76	1	1
	1	T=4 horas	3	1,70	1	1,73	1	1
	1	T=4 horas	4	1,78	1	1,58	1	1
	1	T=6 horas	1	1,48	1	1,45	1	1
	1	T=6 horas	2	1,30	1	1,26	1	1
	1	T=6 horas	3	1,30	1	1,34	1	1
	1	T=6 horas	4	1,30	1	1,22	1	1
Variedad de papa Imilla Negra	2	T=0 horas	1	1	10,05	1	1	1
	2	T=0 horas	2	1,85	4,58	3,71	1,48	1,84
	2	T=0 horas	3	1,70	1	2,02	1,10	1,18
	2	T=0 horas	4	1,85	1	3,05	1,41	1,48
	2	T=2 horas	1	1,78	1	2,47	1,18	1,26
	2	T=2 horas	2	1,85	1	1,95	1	1,10
	2	T=2 horas	3	1,85	1	1,87	1	1
	2	T=2 horas	4	1,95	1	1,95	1	1
	2	T=4 horas	1	1,70	6,4	2,12	1,14	1,18
	2	T=4 horas	2	1,60	1	2,41	1,22	1,30
	2	T=4 horas	3	1,48	1	1,76	1,05	1,18
	2	T=4 horas	4	1,70	1	1,55	1	1
	2	T=6 horas	1	1,48	5,57	1,30	1	1
	2	T=6 horas	2	1	1	1,14	1	1
	2	T=6 horas	3	1,30	1	1,58	1,05	1,10
	2	T=6 horas	4	1,60	1	2,17	1,18	1,14
Variedad de papa Sani Negra	3	T=0 horas	1	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=0 horas	2	3,24	9,54	1,10	1	1
	3	T=0 horas	3	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=0 horas	4	4,53	10,05	1,18	1	1
	3	T=2 horas	1	3,24	9	1,14	1	1
	3	T=2 horas	2	3,24	10,05	1,14	1	1
	3	T=2 horas	3	0,71	9,54	1	1	1
	3	T=2 horas	4	4,53	9,54	1,18	1	1
	3	T=4 horas	1	3,24	10,05	1,10	1	1
	3	T=4 horas	2	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=4 horas	3	3,24	8,43	1,10	1	1
	3	T=4 horas	4	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=6 horas	1	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=6 horas	2	0,71	10,05	1	1	1
	3	T=6 horas	3	0,71	1	1	1	1
	3	T=6 horas	4	0,71	1	1	1	1

ANEXO 10. Resultados del análisis de varianza y prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5 % para la evaluación de efectos derivados de diámetros de semilla artificial procesadas con el software estadístico InfoStat.

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad Waych`a

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% supervivencia	9	0,71	0,62	6,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,18	2	0,09	7,48	0,0234
Diámetro	0,18	2	0,09	7,48	0,0234
Error	0,07	6	0,01		
Total	0,25	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0118 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 6 mm)	1,97	3	0,06 A
(? = 4 mm)	1,83	3	0,06 A B
(? = 8 mm)	1,63	3	0,06 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	9	0,90	0,87	8,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,94	2	1,47	27,31	0,0010
Diámetro	2,94	2	1,47	27,31	0,0010
Error	0,32	6	0,05		
Total	3,26	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0538 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 6 mm)	3,49	3	0,13 A
(? = 4 mm)	2,65	3	0,13 B
(? = 8 mm)	2,10	3	0,13 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de nudos	9	0,79	0,72	5,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	2	0,05	11,36	0,0091
Diámetro	0,10	2	0,05	11,36	0,0091
Error	0,03	6	4,5E-03		
Total	0,13	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0045 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.	
(? = 6 mm)	1,44	3	0,04	A
(? = 4 mm)	1,27	3	0,04	B
(? = 8 mm)	1,18	3	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de raíces	9	0,88	0,83	5,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,27	2	0,13	21,03	0,0019
Diámetro	0,27	2	0,13	21,03	0,0019
Error	0,04	6	0,01		
Total	0,31	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0064 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.	
(? = 6 mm)	1,59	3	0,05	A
(? = 4 mm)	1,34	3	0,05	B
(? = 8 mm)	1,17	3	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad

Imilla Negra

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% supervivencia	9	0,22	0,00	5,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	2	0,01	0,87	0,4669
Diámetro	0,02	2	0,01	0,87	0,4669
Error	0,05	6	0,01		
Total	0,07	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0088 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	1,77	3	0,05 A
(? = 6 mm)	1,73	3	0,05 A
(? = 8 mm)	1,67	3	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% contaminación	9	0,25	0,00	61,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,19	2	0,59	1,00	0,4219
Diámetro	1,19	2	0,59	1,00	0,4219
Error	3,56	6	0,59		
Total	4,74	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,5929 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 6 mm)	1,77	3	0,44 A
(? = 4 mm)	1,00	3	0,44 A
(? = 8 mm)	1,00	3	0,44 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	9	0,05	0,00	14,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	2	0,02	0,15	0,8659
Diámetro	0,04	2	0,02	0,15	0,8659
Error	0,85	6	0,14		
Total	0,89	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,1413 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	2,74	3	0,22 A
(? = 6 mm)	2,72	3	0,22 A
(? = 8 mm)	2,59	3	0,22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de nudos	9	0,07	0,00	5,54

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,5E-03	2	1,2E-03	0,24	0,7928
Diámetro	2,5E-03	2	1,2E-03	0,24	0,7928
Error	0,03	6	0,01		
Total	0,03	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0052 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 6 mm)	1,31	3	0,04 A
(? = 4 mm)	1,30	3	0,04 A
(? = 8 mm)	1,27	3	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de raíces	9	0,10	0,00	12,79

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	2	0,01	0,32	0,7392
Diámetro	0,02	2	0,01	0,32	0,7392
Error	0,16	6	0,03		
Total	0,18	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0269 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	1,34	3	0,09 A
(? = 8 mm)	1,28	3	0,09 A
(? = 6 mm)	1,23	3	0,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad  
Sani Negra

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% supervivencia	9	0,61	0,47	4,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	2	0,03	4,60	0,0616
Diámetro	0,07	2	0,03	4,60	0,0616
Error	0,04	6	0,01		
Total	0,11	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0072 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	1,88	3	0,05 A
(? = 6 mm)	1,78	3	0,05 A B
(? = 8 mm)	1,67	3	0,05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% contaminación	9	0,20	0,00	129,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	11,30	2	5,65	0,73	0,5188
Diámetro	11,30	2	5,65	0,73	0,5188
Error	46,22	6	7,70		
Total	57,53	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 7,7040 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 6 mm)	3,67	3	1,60 A
(? = 8 mm)	1,77	3	1,60 A
(? = 4 mm)	1,00	3	1,60 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	9	0,45	0,26	22,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,34	2	0,67	2,41	0,1704

Diámetro	1,34	2	0,67	2,41	0,1704
Error	1,67	6	0,28		
Total	3,01	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,2779 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	2,88	3	0,30 A
(? = 6 mm)	2,07	3	0,30 A
(? = 8 mm)	2,05	3	0,30 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de nudos	9	0,28	0,04	14,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	2	0,03	1,17	0,3711
Diámetro	0,06	2	0,03	1,17	0,3711
Error	0,16	6	0,03		
Total	0,22	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0259 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	1,25	3	0,09 A
(? = 8 mm)	1,11	3	0,09 A
(? = 6 mm)	1,05	3	0,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de raíces	9	0,35	0,13	12,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	2	0,04	1,62	0,2747
Diámetro	0,08	2	0,04	1,62	0,2747
Error	0,15	6	0,02		
Total	0,23	8			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0249 gl: 6

Diámetro	Medias	n	E.E.
(? = 4 mm)	1,36	3	0,09 A
(? = 8 mm)	1,22	3	0,09 A
(? = 6 mm)	1,13	3	0,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

ANEXO 11. Resultados del análisis de varianza y prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5 % para la evaluación de efectos derivados de tratamientos de desecado de semilla artificial procesadas con el software estadístico InfoStat.

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad Waych`a

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% supervivencia	16	0,90	0,87	4,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,62	3	0,21	35,31	<0,0001
Tiempo de desecado	0,62	3	0,21	35,31	<0,0001
Error	0,07	12	0,01		
Total	0,69	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0059 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=2 horas	1,85	4	0,04	A
T=0 horas	1,81	4	0,04	A B
T=4 horas	1,70	4	0,04	B
T=6 horas	1,35	4	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	16	0,79	0,74	6,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,56	3	0,19	15,48	0,0002
Tiempo de desecado	0,56	3	0,19	15,48	0,0002
Error	0,14	12	0,01		
Total	0,70	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0120 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=2 horas	1,79	4	0,05	A
T=0 horas	1,74	4	0,05	A
T=4 horas	1,69	4	0,05	A
T=6 horas	1,32	4	0,05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad Imilla Negra

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% supervivencia	16	0,41	0,27	15,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,53	3	0,18	2,82	0,0840
Tiempo de desecado	0,53	3	0,18	2,82	0,0840
Error	0,75	12	0,06		
Total	1,27	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0622 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=2 horas	1,86	4	0,12	A
T=4 horas	1,62	4	0,12	A B
T=0 horas	1,60	4	0,12	A B
T=6 horas	1,35	4	0,12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% contaminación	16	0,18	0,00	115,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,47	3	6,82	0,89	0,4759
Tiempo de desecado	20,47	3	6,82	0,89	0,4759
Error	92,37	12	7,70		
Total	112,84	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 7,6978 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=0 horas	4,16	4	1,39	A
T=4 horas	2,35	4	1,39	A
T=6 horas	2,14	4	1,39	A
T=2 horas	1,00	4	1,39	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	16	0,23	0,04	33,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,63	3	0,54	1,18	0,3571
Tiempo de desecado	1,63	3	0,54	1,18	0,3571
Error	5,52	12	0,46		
Total	7,15	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4596 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=0 horas	2,45	4	0,34	A
T=2 horas	2,06	4	0,34	A
T=4 horas	1,96	4	0,34	A
T=6 horas	1,55	4	0,34	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de nudos	16	0,30	0,13	12,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,10	3	0,03	1,74	0,2116
Tiempo de desecado	0,10	3	0,03	1,74	0,2116
Error	0,24	12	0,02		
Total	0,34	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0198 gl: 12

Tiempo de desecado Medias n E.E.

T=0 horas	1,25	4	0,07	A
T=4 horas	1,10	4	0,07	A
T=6 horas	1,06	4	0,07	A
T=2 horas	1,05	4	0,07	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de raíces	16	0,32	0,15	17,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,24	3	0,08	1,89	0,1850
Tiempo de desecado	0,24	3	0,08	1,89	0,1850
Error	0,51	12	0,04		
Total	0,75	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0427 gl: 12

<u>Tiempo de desecado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
T=0 horas	1,38	4	0,10 A
T=4 horas	1,17	4	0,10 A
T=2 horas	1,09	4	0,10 A
T=6 horas	1,06	4	0,10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes  
( $p \leq 0,05$ )

Análisis de Varianza para la Evaluación de Efectos en la Variedad Sani Negra

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
% supervivencia	16	0,30	0,12	72,96	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	10,46	3	3,49	1,67	0,2250
Tiempo de desecado	10,46	3	3,49	1,67	0,2250
Error	24,99	12	2,08		
Total	35,46	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,0828 gl: 12

<u>Tiempo de desecado</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
T=2 horas	2,93	4	0,72 A
T=0 horas	2,30	4	0,72 A
T=4 horas	1,98	4	0,72 A
T=6 horas	0,71	4	0,72 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes  
( $p \leq 0,05$ )

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
% contaminación	16	0,38	0,23	30,68	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	52,61	3	17,54	2,49	0,1103
Tiempo de desecado	52,61	3	17,54	2,49	0,1103
Error	84,62	12	7,05		
Total	137,23	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 7,0514 gl: 12

Tiempo de desecado	Medias	n	E.E.
T=0 horas	9,92	4	1,33 A
T=4 horas	9,65	4	1,33 A
T=2 horas	9,53	4	1,33 A
T=6 horas	5,53	4	1,33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes  
( $p \leq 0,05$ )

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta	16	0,35	0,18	6,19

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	3	0,01	2,12	0,1512
Tiempo de desecado	0,03	3	0,01	2,12	0,1512
Error	0,05	12	4,3E-03		
Total	0,08	15			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0043 gl: 12

Tiempo de desecado	Medias	n	E.E.
T=2 horas	1,12	4	0,03 A
T=0 horas	1,07	4	0,03 A B
T=4 horas	1,05	4	0,03 A B
T=6 horas	1,00	4	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes  
( $p \leq 0,05$ )