

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



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y DEL
REGULADOR DE CRECIMIENTO BAP EN LA MULTIPLICACIÓN Y
TUBERIZACIÓN *IN VITRO* DE PAPA (*Solanum tuberosum ssp andigena*)**

MICHAEL CARLOS LLANCO AGUIRRE

La Paz, Bolivia

2013

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y DEL REGULADOR DE
CRECIMIENTO BAP EN LA MULTIPLICACIÓN Y TUBERIZACIÓN *IN VITRO* DE
PAPA (*Solanum tuberosum ssp andigena*)”**

*Tesis de Grado presentado como requisito
Parcial para optar el Título de Licenciado en
Ingeniería Agronómica*

MICHAEL CARLOS LLANCO AGUIRE

ASESOR(ES):

Ing. Ph. D. Félix Marza Mamani _____

Ing. M. Sc. Hugo Bosque Sánchez _____

TRIBUNAL REVISOR:

Ing. Ph. D. Alejandro Bonifacio Flores _____

Ing. Ph. D Víctor H. Mendoza Condori _____

Ing. M. Sc. Rafael Murillo García _____

APROBADA

PRESIDENTE TRIBUNAL EXAMINADOR: _____

DEDICATORIA

A Dios: Todo poderoso por darme la vida, la luz de su espíritu y proveerme de conocimiento para culminar mi carrera.

A Rodrigo (+): Hermanito porque te fuiste, espero yo algún día volver a verte. Dios te encargo a mi hermano y a este servidor.

A mis Padres: Con mucho cariño a mis padres; Justo Llanco y Simona Aguirre, que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento, gracias a ellos por creer en mí, por brindarme todo su amor, quienes con su comprensión, apoyo y esfuerzo lograron que siga adelante en mis estudios y alcance una más de mis metas.

A Leonelita: Por ser la razón de mi existencia y el incentivo de mi superación, por llenar mi vida de emociones, alegrías y felicidad.

A mis Hnos. Joselín, Ana, Jimmy, por todas las palabras de aliento y confianza para que pueda seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a nuestro Señor Dios, quien siempre está al lado nuestro dándonos su bendición, cuidándonos y protegiéndonos de todo mal.

Agradezco a la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés UMSA, por haberme acogido en sus aulas, a todos los docentes por compartir sus conocimientos y enseñanzas.

Un agradecimiento especial a mis tutores; Ing. Ph. D. Félix Marza Mamani e Ing. M. Sc. Hugo Bosque Sánchez, por la paciencia, apoyo, amistad, y dedicación que me brindaron al revisar cada capítulo de la presente Tesis de Grado.

Al tribunal revisor; Ing. Ph. D. Víctor H. Mendoza Condori, Ing. M. Sc. Rafael Murillo García, Ing. Ph. D. Alejandro Bonifacio Flores, por su ayuda y colaboración desinteresada, su paciencia y sobre todo por su amistad.

A todos los amigos y compañeros que siempre me alentaron.

A todas las personas que de forma desinteresada proporcionaron su apoyo en todo momento, mis más sinceros agradecimientos.

Mil gracias a todos.

Michael Carlos Blanco Aguirre.

CONTENIDO

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

ÍNDICE GENERAL

Página.

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
CONTENIDO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS.	3
1.1.1 Objetivo General.	3
1.1.2 Objetivos Específicos.	3
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Origen y evolución de la planta.....	4
2.2 Descripción Morfológica de la planta.	4
2.3 <i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>	6
2.4 Variedad Imilla Negra (Chiar Imilla-Yana Imilla).	6
2.5 Características de la variedad Imilla Negra (Chiar Imilla, Yana Imilla).	7
2.6 Etapas fenológicas.	7
2.6.1 Estado de crecimiento I (brotación).	7
2.6.2 Estado de crecimiento II (crecimiento vegetativo).....	8
2.6.3 Estado de crecimiento III (iniciación de los tubérculos).....	8
2.6.4 Estado de crecimiento IV (Crecimiento de los tubérculos).....	8
2.6.5 Estado de crecimiento V (Madurez).....	9
2.7 Tuberización.....	9

2.8	Descripción del proceso de tuberización.	10
2.9	Etapas de la tuberización en campo.	11
2.10	Biotecnología vegetal.	11
2.11	Cultivo de Tejidos.	12
2.12	Micropropagación.	13
2.13	Obtención de plántulas por cultivo de meristemas.	13
2.14	Medio de cultivo.	13
2.14.1	Composición del medio de cultivo.	14
2.15	Formación de microtubérculos por almacenamiento.	18
2.16	Microtubérculo <i>in vitro</i>	18
2.17	Ventajas de la producción de tubérculos <i>in vitro</i>	20
2.18	Formación de tubérculos <i>in vitro</i>	21
2.19	Factores que afectan la tuberización <i>in vitro</i>	21
2.20	Métodos para inducción a tuberización <i>in vitro</i> en papa.	23
2.20.1	Protocolo del CIP (Centro Internacional de la Papa).	23
2.20.2	Producción de tubérculos <i>in vitro</i> según CIAT.	24
2.20.3	Otros estudios realizados en inducción a tubérculos <i>in vitro</i>	24
3.	LOCALIZACIÓN.	27
3.1	Ubicación geográfica.	27
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.	27
4.1	Materiales.	27
4.1.1	Material vegetal.	27
4.1.2	Laboratorio de Biotecnología Vegetal Facultad de Agronomía UMSA.	29
4.1.3	Equipos y Materiales de laboratorio.	29
4.1.4	Reactivos químicos.	30
4.1.5	Materiales de gabinete.	30

4.2	Metodología.....	30
4.2.1	Procedimiento experimental.	31
4.2.2	Etapa 0 Tratamiento y selección del material vegetal.	31
4.2.3	Etapa I Establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i>	32
4.2.3.1	Preparación del medio de cultivo.....	32
4.2.3.2	Desinfección y establecimiento a condiciones <i>in vitro</i> del material vegetal.	32
4.2.3.3	Análisis estadístico.....	33
4.2.3.4	Periodos de evaluación.	33
4.2.3.5	Variables de respuesta.....	33
4.2.4	Etapa II Micropropagación de vitroplantas.....	36
4.2.4.1	Análisis estadístico.....	36
4.2.4.2	Periodos de evaluación.	36
4.2.4.3	Variables de respuesta.....	37
4.2.5	Etapa III Siembra en medio de inducción a tuberización <i>in vitro</i>	37
4.2.5.1	Preparación del medio de inducción de tuberización <i>in vitro</i>	37
4.2.5.2	Siembra en medio de inducción a tuberización <i>in vitro</i>	38
4.2.5.3	Fotoperiodos que favorecen la tuberización <i>in vitro</i>	39
4.2.5.4	Diseño experimental.....	39
4.2.5.5	Modelo Lineal Aditivo.	40
4.2.5.6	Factores de variación.	40
4.2.5.7	Combinación de tratamientos.....	41
4.2.5.8	Variables de respuesta.....	41
4.2.6	Etapa III Cosecha de tubérculos <i>in vitro</i>	46
4	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	47
5.1	Etapa I Establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i>	47
5.1.1	Porcentaje de supervivencia (%S ₁).....	47

5.1.2	Porcentaje de contaminación (%C ₁).	47
5.1.3	Porcentaje de Oxidación (%O).	48
5.1.4	Altura de vitroplantas (Hv ₁).	50
5.1.5	Número de nudos (Nn ₁).	51
5.2	Etapa II micropropagación de vitroplantas	52
5.2.1	Porcentaje de supervivencia (%S ₂).	52
5.2.2	Porcentajes de contaminación (%C ₂).	52
5.2.3	Altura de vitroplantas (Hv ₂).	53
5.2.4	Número de nudos (Nn ₂).	55
5.3	Etapa III inducción a tuberización <i>in vitro</i>	55
5.3.1	Altura final de la vitroplantas (Hfv).	55
5.3.2	Peso fresco de vitroplanta (Pfv).	59
5.3.3	Números de tubérculos <i>in vitro</i> por frascos (Ntf).	63
5.3.4	Diámetro de microtubérculos (Dti).	69
5.3.5	Peso fresco del tubérculo <i>in vitro</i> (Pft).	74
5.3.6	Numero de raíces (Nr).	76
5.3.7	Grado de formación de callos (Gfc).	79
5.4	Etapa IV Cosecha de microtubérculos <i>in vitro</i>	81
6.	CONCLUSIONES	82
7.	RECOMENDACIONES	84
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	85

ÍNDICE DE CUADROS

Página.

Cuadro 1. Características relevantes de la variedad Imilla Negra.....	28
Cuadro 2. Influencia de fotoperiodos sobre la tuberización <i>in vitro</i>	39
Cuadro 3. Descripción de factores de estudio en la etapa de microtuberización.	41
Cuadro 4. Tratamientos según combinación de niveles sacarosa y BAP.	41
Cuadro 5. Grado de formación de callos en vitroplantas.	45
Cuadro 6. Porcentaje de supervivencia etapa de introducción a condiciones <i>in vitro</i>	47
Cuadro 7. Porcentaje de contaminación etapa introducción a condiciones <i>in vitro</i>	48
Cuadro 8. Porcentaje de Oxidación en la etapa de introducción a condiciones <i>in vitro</i>	48
Cuadro 9. Promedio de altura de vitroplantas etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	50
Cuadro 10. Desviación estándar de altura de vitroplantas etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	51
Cuadro 11. Promedio de números de nudos por vitroplantas etapa de establecimiento.	51
Cuadro 12. Porcentaje se supervivencia (%S ₂) etapa de micropropagación.....	52
Cuadro 13. Porcentaje de contaminación (%C ₂) en la etapa de micropropagación.	52
Cuadro 14. Promedios de altura de vitroplantas etapa de micropropagación.	53
Cuadro 15. Desviación estándar de altura de vitroplanta etapa de micropropagación.	54
Cuadro 16. Promedio de número de nudos por plántula etapa de micropropagación.	55
Cuadro 17. Análisis de varianza para altura final de vitroplanta (Hfv).	56
Cuadro 18. Análisis de varianza para peso fresco de vitroplanta (Pfv)	60
Cuadro 19. Análisis de varianza para número de tubérculos por frasco.	63
Cuadro 20. Análisis de varianza para diámetro de tubérculo <i>in vitro</i>	69
Cuadro 21. Análisis de varianza para peso fresco de microtubérculo <i>in vitro</i>	74
Cuadro 22. Análisis de varianza para número de raíces por vitroplanta.	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Página.

Figura 1. Formación de microtubérculo producido por almacenamiento a bajas temperaturas..	18
Figura 2. Tubérculo de la variedad Imilla Negra (<i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>).....	27
Figura 3. Inducción de tubérculos a formación de brotes.....	31
Figura 4. Explantes afectados por agentes contaminantes.....	34
Figura 5. Oxidación de explantes en la etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	34
Figura 6. Altura de vitroplanta etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	35
Figura 7. Numero de nudos en la etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	35
Figura 8. Altura de vitroplantas etapa de microtuberización.....	42
Figura 9. Peso fresco de vitroplanta.....	42
Figura 10. Número de tubérculos <i>in vitro</i> por frasco.....	43
Figura 11. Determinación de diámetro de tubérculos <i>in vitro</i>	43
Figura 12. Peso fresco del microtubérculo.....	44
Figura 13. Vista posterior de frascos formación de raíces.....	44
Figura 14. Formación callosa en la parte basal de vitroplantas.....	45
Figura 15. Cosecha de tubérculos <i>in vitro</i>	46
Figura 17. Porcentaje de contaminación (%C ₁), supervivencia (%S ₁) y oxidación (%O) en la etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	49
Figura 18. Comparación de altura máxima, mínima y promedio de vitroplantas en la etapa de establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	50
Figura 19. Porcentaje de contaminación (%C ₂) y supervivencia (%S ₂) en la etapa de micropropagación.....	53
Figura 20. Comparación de altura máxima, mínima y promedio de vitroplantas etapa de micropropagación.....	54

Figura 21. Prueba de promedios Duncan para altura final de vitroplanta (Hfv) por efecto de niveles de concentración de Sacarosa.....	56
Figura 22. Prueba de promedios Duncan para altura final de vitroplanta por efecto de niveles de concentración de BAP.....	57
Figura 23. Variación de altura final de vitroplanta por interacción de niveles de concentración de Sacarosa y BAP.....	59
Figura 24. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de plántula (Pfv) por efecto de niveles de concentración de Sacarosa.....	60
Figura 25. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de vitroplanta por efecto de concentraciones de BAP.....	61
Figura 26. Variación de peso fresco de vitroplanta por interacción de niveles de concentración de sacarosa y BAP.....	62
Figura 27. Prueba de promedios Duncan para número de tubérculos por frasco como efecto de niveles de sacarosa.....	64
Figura 28. Prueba de promedios Duncan para número tubérculos por frasco como efecto del factor niveles de concentración de BAP.....	66
Figura 29. Variación de número de microtubérculos en frascos por interacción de niveles sacarosa y BAP.....	68
Figura 30. Prueba de promedio Duncan para diámetro de tubérculos <i>in vitro</i> por efecto de niveles de sacarosa.....	70
Figura 31. Prueba de promedios Duncan para diámetro de tubérculos <i>in vitro</i> por efecto de niveles sacarosa.....	72
Figura 32. Variación del diámetro de tubérculos <i>in vitro</i> por interacción de niveles de sacarosa y BAP.....	73
Figura 33. Prueba de promedio Duncan para peso fresco de tubérculos <i>in vitro</i> por efecto de niveles de sacarosa.....	75

Figura 34. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de tubérculos <i>in vitro</i> por efecto de niveles de BAP.....	76
Figura 35. Prueba de promedio Duncan para número de raíces por efecto de niveles de sacarosa.....	78
Figura 35. Prueba de promedios Duncan para numero de raíces por efecto de niveles de BAP.	79
Figura 36. Grado de formación de callo de los diferentes tratamientos.	80

RESUMEN

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del trigo, maíz y arroz. En el altiplano entre Bolivia y Perú, alrededor del lago Titicaca, se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y cultivadas. En Bolivia se cultivan principalmente la especie *Solanum tuberosum* subespecie *andigena*.

Actualmente, un serio problema para los agricultores es la obtención de semilla de alta calidad, libre de patógenos, razón por la cual el promedio nacional de rendimiento se ha estancado en los últimos años. Esta limitación se debe primordialmente a su forma de propagación vegetativa o asexual. Mediante la utilización de herramientas de biotecnología, como la técnica de cultivo de tejidos se obtiene tubérculos *in vitro*, que pueden ser propagados directamente en invernaderos para producir plantas libres de patógenos.

No existe consenso sobre el protocolo de tuberización *in vitro* más adecuado, la implementación de un procedimiento de tuberización eficiente y libre de reguladores del crecimiento es deseable en el actual contexto. El objetivo de la investigación ha sido explorar el efecto de diversos niveles de concentración de sacarosa y regulador de crecimiento Bencilaminopurina (BAP), a fin de determinar los niveles apropiados y óptimos para inducir la tuberización *in vitro* en explantes de papa de la variedad Imilla Negra.

Se planteó la formulación de medios de cultivo enriquecido con sacarosa (6 - 8%) y regulador de crecimiento BAP (0, 2.5, 5, 10 mg/l), la combinación de factores de variación determinó los tratamientos, se utilizaron explantes de la variedad Imilla negra. La investigación estuvo dividida en cuatro etapas: establecimiento, micropropagación, inducción a tuberización *in vitro* y cosecha. La mejor producción se dio por el tratamiento 6(8% sacarosa + 2.5 mg/l BAP), que indujo a tuberización *in vitro*, además favoreció el tamaño, peso, proliferación de los microtubérculos, la aplicación de BAP en concentraciones superiores a 2.5 mg/l estimula la formación de callos que limitan la formación de raíces.

La variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), ha demostrado gran capacidad de generar tubérculos *in vitro* en un medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con altas concentraciones de sacarosa y Bencilaminopurina, en estado semisólido, favorecido por días cortos y oscuridad completa, sin embargo es posible obtener microtubérculos en medio basal compuesto por sacarosa al 6 y 8%, aunque se ha establecido que el BAP favorece la inducción y proliferación tubérculos *in vitro* en menor tiempo.

1. INTRODUCCIÓN.

Actualmente el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye una de las principales actividades agrícolas del país, su rendimiento en promedio alcanza 12.6 TM/Ha en algunos países de América Latina, Bolivia posee uno de los rendimientos agrícolas más bajos de la región en cuanto al cultivo de papa, sin embargo respecto a su población es un país netamente papero, es decir que produce y consume mucha papa, con un rendimiento aproximado de 6 TM/Ha y una superficie cultivada de 123000 Ha. El Departamento que presenta mayor rendimiento es Cochabamba, con un promedio de 6.4 TM/Ha y una superficie cultivada de 23000 Ha, La Paz cuenta con un promedio en rendimiento 5.3 TM/Ha con una superficie cultivada de 30900 Ha (Ovidi, 2001).

La papa es originaria de la región andina de Sudamérica (Bolivia y Perú), donde se constituye en un cultivo alimenticio importante, el consumo per cápita en países desarrollados es de 55 kg, a nivel de América Latina es de 23 kg; en el caso concreto de Bolivia es bastante alto 80 kg (Soliz, 2005).

Actualmente, un serio problema para los agricultores locales es la obtención de semilla de alta calidad, libre de patógenos, razón por la cual el promedio nacional de rendimiento se ha estancado en los últimos años. Esta limitación se debe primordialmente a su forma de propagación vegetativa o asexual.

Comercialmente la papa se propaga vegetativamente por tubérculos-semillas; sin embargo, emplear el material vegetativo por ciclos repetidos puede ocasionar degeneración del cultivo por la acumulación de enfermedades, especialmente virales.

Mediante la utilización de herramientas de biotecnología, como la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, se llega a la obtención de tubérculos *in vitro*, que pueden ser propagados directamente en invernaderos para producir plantas libres de patógenos. El proceso de producción de microtubérculos *in vitro*, está determinada por la interacción de diferentes factores como temperatura, fotoperiodo, edad fisiológica del

tubérculo y el uso de reguladores de crecimiento, además los días cortos, intensidad de luz y baja concentración de nitrógeno que también influyen sobre este proceso (Koda y Okasawa, 1983).

Los microtubérculos son tubérculos de papa producidos en condiciones *in vitro*, el proceso se expresa en plántulas o explantes (segmentos nodales) que se colocan bajo determinadas condiciones inductoras de tuberización.

La variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), ha demostrado gran capacidad de generar tubérculos *in vitro* en un medio MS (Murashige y Skoog 1968), suplementado con altas concentraciones de sacarosa (6-8%) y Bencilaminopurina (0,2,5,5,10 mg/l), en estado semisólido, favorecido por días cortos y oscuridad completa, sin embargo es posible obtener microtubérculos en medio basal enriquecido con sacarosa al 6 -8%, aunque se ha establecido que el BAP favorece la inducción y proliferación tubérculos *in vitro* en menor tiempo.

El proceso de microtuberización *in vitro* de papa se conoce desde ya varias décadas, a la fecha no existe un protocolo estandarizado que garantice la producción masiva de microtubérculos en forma rentable, lo cual facilitaría su producción, comercialización y exportación de semilla de papa a nivel mundial (Brenes, 2004).

La incorporación de los tubérculos *in vitro* a programas de multiplicación de semillas también ofrece algunas ventajas con respecto a las plántulas *in vitro*, ya que pueden ser propagados directamente en invernadero para producir plantas madres, las cuales servirán como material de partida para la obtención de propágulos, o pueden ser plantados en camas de alta densidad con lo cual es posible la obtención de tubérculos semillas de alta calidad (Jara, 2004).

1.1 OBJETIVOS.

1.1.1 Objetivo General.

- Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa y regulador de crecimiento BAP (bencilaminopurina) en la multiplicación y tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), variedad Imilla Negra.

1.1.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar el efecto de dos niveles de concentración de sacarosa en un medio de cultivo semisólido, para la multiplicación y tuberización *in vitro* de papa.
- Determinar la concentración óptima de bencilaminopurina (BAP), para promover el proceso de tuberización *in vitro*.
- Caracterizar el comportamiento morfológico *in vitro* de la variedad de papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), por efecto de la interacción de concentración de los diferentes niveles de sacarosa y regulador de crecimiento bencilaminopurina.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Origen y evolución de la planta.

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

2.2 Descripción Morfológica de la planta.

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

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

son de sección angular, y en las axilas de las hojas con los tallos se forman ramificaciones secundarias.

Las hojas son alternas, igual que los estolones. Las primeras hojas tienen aspecto simple, vienen después las hojas compuestas, imparipinadas con 3-4 pares de hojuelas laterales y una hojuela terminal. Entre las hojuelas laterales hay hojuelas pequeñas de segundo orden. Las raíces se desarrollan principalmente en el verticilo, en los nódulos del tallo principal. Su crecimiento es primero vertical dentro de la capa de suelo arable, luego horizontal de 25-50 cm, y a veces, cuando el suelo lo permite, nuevamente vertical hasta 90 cm. La planta de papa posee un sistema radicular fibroso muy ramificado. La inflorescencia es cimosa; las flores son hermafroditas, tetracíclicas, pentámeras; el cáliz es gamosépalo lobulado; la corola es rotácea pentabulada de color blanco a púrpura, con 5 estambres. Cada estambre posee dos anteras de color amarillo pálido, amarillo más fuerte o anaranjado, que producen polen a través de un tubo terminal; gineceo con ovario bilocular. El fruto es una baya bilocular de 15-30 mm de diámetro, color verde, verde amarillento o verde azulado. Cada fruto contiene aproximadamente 200 semillas (Montaldo, 1984).

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

2.3 *Solanum tuberosum* ssp *andigena*.

Plantas vigorosas, desde 40-120 cm de alto, ramosas, ramas abiertas algo extendidas. Tallos gruesos y carnosos, de 8-20 mm de diámetro. Tallos a veces decumbentes, verde claros. Estolones de 10-150 cm de largo, carnosos, blancos pigmentados. Tubérculos variando enormemente de forma, color y tamaño, desde redondos isodiamétricos a redondos algo compresos, periderma variando de colores puros uniformes blanco, amarillo, marrón, rojo, rosado, moteado, violeta, azul violáceo o negro hasta periderma bicolor con aéreas bien definidas o con halos alrededor de los ojos o con jaspes pigmentados irregularmente; ojos superficiales, semí profundos o profundos. Carne blanca, blanca grisácea, blanca marfil o amarilla pura. Periodo de reposo usualmente largo y bien marcado. Hojas ampliamente esparcidas dispuestas en ángulo agudo sobre el tallo, usualmente muy disectada. Inflorescencia lateral o terminal, generalmente muy florífera, hasta con 25 o más flores. Fructificación abundante en racimos de 5-20 frutos, contenido 300 o más semillas fértiles. Número cromosómico: $2n=4x=48$ (Ochoa, 1990).

2.4 Variedad Imilla Negra (Chiar Imilla-Yana Imilla).

Tallos erectos o ascendentes, decumbentes en la floración ligeramente pigmentada. Tubérculos redondos, con periderma azul violáceo oscuro casi negro, irregularmente moteado de violeta claro con jaspes marrones claros, brotes azules morados oscuros, carne blanca marfil clara (Ochoa, 1990).

El mismo autor menciona, entre las papas cultivadas de Bolivia, la variedad Chiar Imilla constituye un grupo muy importante, es la más extensamente cultivada entre las varias formas de la subespecie *andigena*. Su nombre nativo significa en aymara “muchacha negra”.

Estudios realizados por Ochoa (1990), muestran que las plantas de esta variedad crecidas de semilla sexual difieren de la descripción que precede por tener corola azul, azul celeste violeta o blanca y tubérculos con periderma rosado claro o rojizo.

Los tubérculos son similares en color y forma a aquellos de Wila Imilla y Ccompis. Las variedades de papas imilla son las de mayor importancia en Bolivia y sur del Perú. Son siempre de tubérculos redondos oblongos de periderma pigmentado, blanco amarillo o bicolores. Debido a la formación de muchos morfotipos por hibridación natural no todos pueden ser fácilmente clasificados.

2.5 Características de la variedad Imilla Negra (Chiar Imilla, Yana Imilla).

La variedad Imilla Negra conocida como Chiar Imilla o Yana Imilla tiene las siguientes características descritas por Egúsquiza (2000):

- Planta de porte alto; floración numerosa y abundante producción de bayas.
- La flor es de color morada, casi celeste.
- Tubérculos redondos a redondeados; morado oscuro; ojos semiprofundos; pulpa blanca marfil; brotes morados oscuros.
- Buen potencial productivo, tardía.
- Muy buena calidad culinaria.

2.6 Etapas fenológicas.

Para analizar el desarrollo del cultivo según Bouzo (s.f.) es conveniente dividir el crecimiento y desarrollo de la planta de papa en cinco estados diferentes:

2.6.1 Estado de crecimiento I (brotación).

Se inicia con el desarrollo de los brotes desde los ojos del tubérculo “semilla”, su crecimiento inicial aéreo y la emisión de las primeras raíces en la base de los brotes. Durante esta etapa el crecimiento se sostiene solo con las reservas contenidas en el tubérculo de plantación (Bouzo, s.f.).

2.6.2 Estado de crecimiento II (crecimiento vegetativo).

Comienza un activo crecimiento aéreo con la emisión y expansión foliar desde los brotes emergidos, crecimiento de raíces y rizomas. Parte de este crecimiento todavía se debe a reservas del tubérculo “semilla” aunque pronto agotados la fase de mayor tasa de crecimiento se debe a la actividad fotosintética de las hojas. Los estados de crecimiento I y II pueden llevar de 30 a 70 días, dependiendo de la fecha de plantación, temperatura del suelo, edad fisiológica del tubérculo “semilla” y el genotipo utilizado (Bouzo, s.f.).

2.6.3 Estado de crecimiento III (iniciación de los tubérculos).

Comienza con el inicio del engrosamiento de las puntas de los rizomas. La tuberización es controlada por hormonas producidas en la planta. Este estado es un período relativamente corto, entre 10 y 14 días y en muchos cultivares el final del período coincide con el inicio de la floración, momento en que unas pocas flores comienza a ser visibles. Los cultivares de maduración temprana usualmente comienzan la tuberización antes que los de maduración tardía. Los tipos de maduración tardía pueden incluso continuar esta etapa durante el estado de crecimiento IV, aunque muchos de los tubérculos formados no suelen alcanzar el tamaño comercial (Bouzo, s.f.).

2.6.4 Estado de crecimiento IV (Crecimiento de los tubérculos).

Las células de los tubérculos se expanden con la acumulación de agua, nutrientes y carbohidratos. El incremento en volumen de los tubérculos ocurre de una manera lineal de no mediar factores limitantes. Durante el estado de crecimiento IV los tubérculos se transforman en los destinos dominantes para la deposición de carbohidratos (Bouzo, s.f.).

2.6.5 Estado de crecimiento V (Madurez).

La parte aérea de la planta comienza a amarillear y a perder hojas, la fotosíntesis gradualmente disminuye, la tasa de crecimiento de los tubérculos se retarda y finalmente el dosel de la planta muere. El contenido de materia seca de los tubérculos alcanza en esta etapa su máximo, dando inicio al engrosamiento de la epidermis de los mismos (formación de peridermis) (Bouzo, s.f.).

2.7 Tuberización.

El CIP (1997), indica que este proceso denominado tuberización está bajo el control de factores medioambientales y genéticos. Los factores medioambientales más importantes que favorecen la tuberización son: fotoperíodos cortos, bajas temperaturas y bajos niveles de fertilización nitrogenada. Estas condiciones provocan cambios en el metabolismo de las plantas. Los cambios internos podrían transferir la señal medioambiental al lugar de formación del tubérculo (estolón) para empezar su formación. La señal de transducción es parcialmente controlada por fitohormonas. Además, un cambio en el metabolismo de los carbohidratos parece estar asociado con la tuberización.

Las yemas axilares de la papa pueden formar estolones (tallos diageotrópico con un crecimiento reducido de la hoja). El proceso de estolonización se inicia en los nudos más cercanos al tubérculo madre (o en los nudos de la parte inferior del tallo, en el caso de una planta originada por semilla sexual) y progresa, en forma acrópeta, favorecido por la oscuridad, la humedad relativa muy elevada y por los altos contenidos de giberélinas en la planta. De hecho, la aplicación exógena de giberélinas promueve la iniciación de estolones. Aunque todas las yemas de una planta tienen la capacidad de crecer como estolones. La dominancia apical limita esta posibilidad a ciertas yemas, inhibiendo las demás, mediante la distribución de los contenidos endógenos de citoquininas.

Herrera *et al.* (2006), menciona cuando ocurre la inducción de la tuberización, un alto porcentaje de los asimilados son orientados hacia los tubérculos, lo que conlleva una reducción del crecimiento de otras partes de la planta. Por otro lado, se da una disminución drástica de la actividad de las giberélinas, las cuales se oponen al proceso de tuberización. De hecho, la aplicación exógena de esta sustancia inhibe este proceso. Aunque la presencia de las citoquininas es indispensable para el desarrollo del tubérculo, no existe evidencias de estas que sean responsables de su inducción, ya que su concentración solo aumenta 4 a 6 días después de la inducción, la actividad auxínica solo se incrementa muy levemente durante los primeros estadios de la tuberización.

2.8 Descripción del proceso de tuberización.

Según Estrella (1990), el proceso de tuberización en papa es una secuencia de acontecimientos morfológicos y fisiológicos. El tubérculo comienza a formarse en la zona subapical del estolón y la hinchazón por acumulación de carbohidratos se produce acropétalmente en los entrenudos existentes en dicha zona. Casi al mismo tiempo en que evoluciona el ensanchamiento del estolón, cesa la actividad meristemática del ápice. La formación de varias secciones longitudinales en el interior del estolón durante los primeros estados de la tuberización, indica que el alargamiento celular precede a la división celular. La acumulación de almidón ocurre muy tempranamente en la ontogenia del tubérculo y está acompañada por la formación de altos niveles de patatina, una glicoproteína específica de los tubérculos.

El mismo autor menciona, los tubérculos aéreos, típicos de la tuberización *in vitro*, ilustran que a pesar de que la mayoría de unidades se forman de estolones, cualquier yema o ápice de tallo es capaz de tuberizar bajo condiciones especiales (Estrella, 1990).

Se ha estudiado la relación de diferentes fitohormonas con la tuberización, de las que el ácido giberélico (AG) es la más convincente. El ácido giberélico aplicado a plantas enteras, esquejes de plántulas *in vitro* y brotes de tubérculos inhibe la tuberización,

mientras que las aplicaciones de inhibidores de la biosíntesis del AG promueven la tuberización. La actividad del AG en las hojas de papa es relativamente alta, bajo condiciones que disminuye el inicio de la tuberización, tales como alta temperatura, altas dosis de fertilizante nitrogenado y fotoperiodo largos (Pozo, 1999).

2.9 Etapas de la tuberización en campo.

Según Egúsqiza (2000), la formación de tubérculos o tuberización, es el proceso biológico más interesante del que es capaz la planta de papa. La tuberización se realiza en dos etapas consecutivas:

a) Inducción o inicio.

Ocurre cuando los azúcares se depositan en la forma de almidón; las células se multiplican a lo largo del gancho, los estolones dejan de crecer. La inducción ocurre en una o dos semanas a nivel de la planta.

b) Tuberización o llenado.

Es la etapa de crecimiento del tubérculo, las células se multiplican radialmente (hacia los costados del gancho) y el tubérculo se expande (crece) por acumulación de agua y sólidos, ocurre hasta la muerte del follaje.

2.10 Biotecnología vegetal.

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

Mendoza; citado por Monrroy (2009), indica es el área de la ciencia y tecnología que utiliza organismos vivos o algunas de sus partes constituyentes, para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaria y/o

industria. Tiene como objeto principal el aumento de la productividad de los vegetales, lo cual es indispensable para lograr un incremento en la producción de alimentos y otros productos producidos por las plantas. Las investigaciones se encuentran en producciones superiores, valor nutritivo más elevado, plantas más resistentes a las condiciones ambientales, plantas resistentes a plagas y enfermedades, conservación de la diversidad de las especies.

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

2.11 Cultivo de Tejidos.

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

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

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con propiedades de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Se

define el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con la cual se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio (CATIE, 1994).

2.12 Micropropagación.

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

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

2.13 Obtención de plántulas por cultivo de meristemas.

CORPOICA (2000), el cultivo de meristemas es una técnica que se utiliza para producir materiales libres de virus y otros patógenos. El meristemo es el punto de crecimiento de las yemas vegetales de las plantas, considerado libre de virus. El aislamiento del meristemo en condiciones asépticas y su posterior siembra en un medio de cultivo específico, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa, permite el desarrollo de plántulas *in vitro*, después de seis a ocho semanas (semilla inicial).

2.14 Medio de cultivo.

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A

menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias y gelificando generalmente con agar, también se pueden encontrar variantes de acuerdo a la etapa de propagación, específicamente para la multiplicación (Sandoval, 2001).

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

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

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

2.14.1 Composición del medio de cultivo.

a) Sales inorgánicas o minerales.

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

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

b) Compuestos orgánicos.

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

c) Fuentes de Carbono.

Hurtado y merino (1997), indica que la sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3%; sin embargo en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivo de monocotiledoneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies. Mendoza (2007), indica que intervienen en el crecimiento, metabolismo y estructura de los vegetales.

d) Reguladores de crecimiento.

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

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

agrupadas y divididas en: promotores de crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), inhibidores de Crecimiento (ácido abscísico) y etileno.

- **Auxinas.**

Weaver (1996), indica que una concentración baja de auxinas estimula la prolongación de las células, sin embargo una concentración extremadamente alta puede provocar inhibiciones, los compuestos que tienen actividad auxínica son orgánicos; todos ellos poseen hidrógeno y oxígeno en proporciones y disposiciones diferentes y algunos de ellos contienen; además, nitrógeno y cloro; algunos tienen estructuras simples pero la mayoría son complejos, el ácido indolacético (AIA) es una de las principales auxinas que aparecen en las plantas superiores, se detecta en una gran variedad de tejidos vegetales. Por lo común el nivel de AIA en tejidos de plantas varía según la etapa de desarrollo del vegetal.

Gómez (1999), indica que ha demostrado que la acción de las auxinas sobre el alargamiento celular está basado en una serie de modificaciones que se producen previas a este proceso, tales como: incremento del contenido osmótico de la célula, aumento en la permeabilidad celular al incrementarse la plasticidad de la pared y aumento en la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas específicas, lo cual origina un incremento de la plasticidad y de la extensión celular.

Las concentraciones a usar de las auxinas varían de especie a especie, pero generalmente se utilizan de 0.1 a 10 mg/l. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente 2,4-D > ANA > AIB > AIA (López, 1990).

- **Citocininas.**

Weaver (1996), indica que las citocininas son sustancias naturales o sintéticas que provocan la división celular en ciertos tejidos vegetales cortados en presencia de las auxinas, dos efectos sorprendentes de las citocininas son provocar la división celular y regular la diferenciación en los tejidos cortados. Niveles relativamente altos de esta sustancia se han hallado sobre todo en tejidos que presentan una división celular

activa, como las semillas en germinación y los frutos jóvenes, por tal razón las citocininas se consideran reguladores de la división celular. Es probable que las citocininas se sinteticen en las puntas de las raíces y se desplacen por el xilema hacia las hojas, donde desempeñan importantes funciones en el metabolismo y envejecimiento.

Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes, cuando la relación es intermedia se desarrollan tejidos de callos no diferenciados, también provocan la elongación de algunas hojas y la elongación de segmentos de tallos etiolados, es la respuesta se deben en gran parte a la expansión celular (Gómez, 1999).

López (1990), indica que dentro de este grupo se encuentran: la 6-furfuril amino-purina (Kinetina), la 6-Bencilaminopurina (6BAP), la 6 dimetil-alil-aminopurina (2ip) y la 6(4hidroxi, 3metil, 2butenil) adenina (zeatina).

e) Vitaminas.

Ascon y Talon. (1993), menciona que las vitaminas son compuestos orgánicos que a bajas concentraciones desempeñan en el metabolismo celular funciones catalíticas y reguladoras López (1990), indica que las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas concentraciones. Las vitaminas más empleadas son: tiamina, ácido nicotínico, myoinositol, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y la vitamina E. Así mismo Roca y Mroginski (1991), menciona que los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina.

f) Aminoácidos y amidas.

López (1990), ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor.

2.15 Formación de microtubérculos por almacenamiento.

Van Staden y Dimalla; citado por Pomar (2002), reportan que tubérculos de papa almacenados a bajas temperaturas y en oscuridad por un período prolongado de tiempo desarrollan un desorden conocido como “microtubérculo” por el cual se formarán estolones y nuevos tubérculos a partir del tubérculo madre.



Figura 1. Formación de microtubérculo producido por almacenamiento a bajas temperaturas.

2.16 Microtubérculo *in vitro*.

Los microtubérculos son tubérculos de papa producidos *in vitro* cuando plántulas o explantes de la misma se colocan bajo determinadas condiciones inductoras de

tuberización. Este tipo de materiales son empleados como modelo de investigación, para la selección y mantenimiento de germoplasma, como explantes de transformación genética y en algunos casos, como tubérculo-semilla de alta calidad (Fuentes, s.f.).

Estrella (1990), conceptúa a los microtubérculos *in vitro* como unidades morfológicamente idénticas a los tubérculos producidos *in situ*; cada unidad es una porción caulinar engrosada en mayor o menor grado, de crecimiento, en la oscuridad o a bajas intensidades luminosas; son unidades ricas en sustancias de reserva.

Pomar (2002), indica que Okazawa; reporto que trabajando bajo condiciones de esterilidad había obtenido tubérculos de papa y la formación de éstos parecía estar relacionado con la concentración de sacarosa. Así mismo, indica que no había obtenido tubérculos *in vitro* a partir de las yemas apicales, pero sí de las yemas intercalares y la formación de los mismos tuvo relación inversa con la distancia de yema apical.

Se propone que la kinetina podría regular la formación de tubérculos de papa por supresión de la actividad del almidón hidrolasa y por estimulación del almidón sintetasa, mientras que el ácido giberélico (AG) inhibe la formación de tubérculos por promoción de la actividad del almidón hidrolasa o por supresión de enzimas sintetizadoras de almidón (Smith y Palmer, 1970).

Según Lugo (2009), menciona las vitroplantas provenientes de microestacas nodales, tienen la capacidad de producir microtubérculos, los cuales se originan en forma aérea, la microtuberización es considerada un proceso complejo por estar controlada por varios factores, entre ellos, los componentes del medio de cultivo, reguladores del crecimiento y suplencia de carbohidratos como fuentes de energía. Otros factores a considerar, son el control efectivo del medio ambiente en el cultivo *in vitro*, luz, fotoperíodo y temperatura.

Se ha demostrado que la tuberización es inducida por el ácido jásmonico, un inhibidor natural cuyos efectos opone a las giberélinas. El compuesto activo es el glucósido del ácido jásmonico hidroxilado en la posición 12. La forma no glucosídica se conoce como ácido tuberónico y es igual activa sobre la inducción de la tuberización; concentraciones tan bajas como 3×10^{-8} M inducen la tuberización *in vitro*. La hidroxilación del ácido jásmonico sería el paso crítico, el cual estaría bajo el control de las enzimas hidroxilantes. La glucosidación de este compuesto de este compuesto permitiría su transporte de las hojas (donde es sintetizado) hacia los estolones, donde iniciaría la tuberización. Como no se han detectado formas hidroxiladas en plantas cultivadas en días largos, se presume que el fotoperiodo regula la actividad de las enzimas hidroxilantes (Herrera *et al.*, 2006).

2.17 Ventajas de la producción de tubérculos *in vitro*.

Según Jaramillo (2003), la utilización de microtubérculos como semilla tiene grandes ventajas, existen antecedentes de que los microtubérculos aguantan condiciones adversas de plantación y producen plantas más vigorosas en las generaciones sucesivas, también existen reportes de que es posible obtener mayor número de mini tubérculos de plantas procedentes de microtubérculos que de plántulas cultivadas *in vitro*. Con el establecimiento de un sistema de producción de microtubérculos *in vitro*, se puede iniciar un proyecto de producción de semilla básica.

Estrella (1990), indica que comparando la producción de microtubérculos con la de plántulas *in vitro*, anota las siguientes ventajas: 1) los microtubérculos pueden producirse en cantidades apropiadas sin importar la estación o la demanda; 2) pueden almacenarse durante meses, siendo innecesaria la transferencia a un medio renovado; 3) en caso de envíos a programas nacionales de otros países no se requiere de infraestructura ni personal especializados para establecer los microtubérculos; 4) se evita pérdidas parciales o totales de germoplasma valioso en caso de demoras y complicaciones durante el transporte y manejo.

2.18 Formación de tubérculos *in vitro*

Koda y Okazawa (1983), sostiene la ocurrencia de estímulos específicos de tuberización, que se forman en las hojas de papa y son transmitidos a los ápices del estolón, a fin de inducir tuberización. Es muy probable la participación de fitohormonas endógenas; a si, se plantea el decrecimiento de la giberélinas GA₃ ya que altos niveles de esta inhiben el proceso. La falta de citoquininas elimina el habito diageotrópico de crecimiento del estolón.

Según Gopal *et al.* (1998), obtuvieron una mayor producción y peso en los tubérculos trabajando bajo condiciones de días cortos y bajas temperaturas que en días largos y temperaturas altas. La adición del BAP aumentó la producción bajo ambas condiciones. Así mismo, la oscuridad continua promovió la tuberización aunque tenían un menor número de ojos que aquellos producidos con luz.

Pomar (2002), indica que Villafranca; encontró en trabajos de cultivo de tejidos en papa, que una mayor edad fisiológica del tubérculo madre permitía un incremento en el grado de tuberización de los nudos obtenidos a partir de este tubérculo e inducidos con kinetina. Así mismo la producción tubérculos disminuyó cuando el material era obtenido después de un mayor número de subcultivos.

2.19 Factores que afectan la tuberización *in vitro*

Según Koda y Okazawa (1983), el proceso de la tuberización de la papa es controlado por condiciones ambientales; días cortos y bajas temperaturas nocturnas (condiciones que inducen) estimulan el proceso, mientras que días largos y altas temperaturas (condiciones de no inducción) retardan el avance del proceso. Varios investigadores sugieren que el estímulo específico de formación del tubérculo se origina en las hojas de la planta de papa, bajo las condiciones de inducción y transmitido hacia las yemas de los estolones para inducir la tuberización. De otro lado, un número de investigadores indican que hormonas endógenas de las plantas podrían también participar en el proceso.

Ha sido revelado que la tuberización está estrechamente correlacionado con el decrecimiento de los niveles de la giberélinas (GA) y altos niveles de GA inhiben el proceso. Sin embargo, el rol de las citocininas y el ácido abscísico (ABA) es aún materia de controversia. Por ejemplo una aplicación de citocininas en el medio de cultivo induce la tuberización *in vitro*. (Koda y Okazawa, 1983).

Pozo (1997), explica que la tuberización en papa está bajo el control de condiciones ambientales y genéticas. De los primeros, los factores más importantes para la tuberización serían fotoperiodos cortos, bajas temperaturas y bajos niveles de fertilización nitrogenada. La señal de transducción estaría controlada por fitohormonas. Explica que una sustancia aislada de las hojas de papa relacionada químicamente con el ácido jásmonico, ha demostrado alta inducción de tubérculos en bióensayos con segmentos etiolados de brotes de tubérculos, se le ha denominado ácido tuberónico.

Morales (2006), menciona que existe un mayor número de investigadores que aseguran que las altas concentraciones de sacarosa promueve la microtuberización y que posiblemente esta se dé sin sacarosa dependiendo del genotipo que se estudie.

Borda (2000), este proceso de microtuberización *in vitro* requiere de la interacción de diferentes factores como temperatura, fotoperiodo, edad fisiológica de los tubérculos y el uso de reguladores de crecimiento, los días cortos, la baja concentración de nitrógeno.

Hussey y Stacey; citado por Morales (2006), la inducción de la microtuberización es debido tanto a factores ambientales como endógenos, haciendo que esta sea favorecida por: fotoperíodos principalmente de días cortos, principalmente; temperatura relativamente bajas (20-24 °C), alta concentración de sacarosa (8-10%) al medio de cultivo, intensidad de luz alta, baja cantidad de nitrógeno y la adición de reguladores del crecimiento como citocininas.

Se ha encontrado que la tuberización es inducida por cambios hormonales endógenos y/o exógenos. Las causas parecen ser ocasionadas por un desbalance hormonal debido a la alteración en concentraciones de citoquininas y auxinas en el medio de cultivo, por el incremento de carbohidratos como sacarosa, glucosa y fructosa, por la adición de retardantes de crecimiento como Daminozide (B9), cloruro clorocolina (CCC), por la acción de hormonas como kinetina, ácido abscísico (ABA) u otras sustancias como cumarinas, jasmonatos etc. Además de los ya mencionados otro factor importante, es el soporte utilizado en el medio de cultivo, ya que se ha comprobado que existe una relación directa entre el peso fresco del microtubérculo y el soporte utilizado (Borda, 2000).

2.20 Métodos para inducción a tuberización *in vitro* en papa.

Existe una gran cantidad de protocolos para la inducción a tuberización *in vitro* de papa, mismo que contemplan diversos factores tales como fotoperiodos, reguladores de crecimiento, variedades, fuente de carbono, estado fisiológico de explante madre, etc.

2.20.1 Protocolo del CIP (Centro Internacional de la Papa).

Según el manual de capacitación; cultivo de tejidos manejo de plántulas *in vitro* en la producción de semilla de papa del CIP, elaborado por Toledo *et al.* (1998), indica la inducción de microtubérculos se produce mediante un efecto de estrés producido por el CCC (cloruro de clorocolina), BAP (Bencilaminopurina) y la sacarosa, los cuales en oscuridad producirán de tres a cuatro microtubérculos por planta, según la variedad. En procedimientos indicados, se añade el medio de inducción y se colocan en el cuarto oscuro; luego de tres meses se producirán microtubérculos que pueden ser cosechados y transferidos a envases estériles (a 4 °C), en donde pueden mantenerse hasta por diez meses, e incluso se usados en la siguiente campaña en lugar de plántulas *in vitro*.

2.20.2 Producción de tubérculos *in vitro* según CIAT.

Según el CIAT (1991), describe un procedimiento para generar tubérculos *in vitro*:

- a) Coloque brotes axilares “cosechados *in vitro*” en un medio Ms con 22 a 44 uM de BA y 0.23 de sacarosa, en un Erlenmeyer de 30 a 500 ml.
- b) Incube, a una temperatura de 18 a 20 °C, con un fotoperiodo de 8 horas, y con 100 a 500 lux de intensidad lumínica.
- c) En un lapso de 4 meses se obtiene de 30 a 50 tubérculos en miniatura en cada Erlenmeyer.

2.20.3 Otros estudios realizados en inducción a tubérculos *in vitro*.

Pomar (2002), cita a Estrada *et al.*, quien describe un método para la inducción de tubérculos *in vitro* de papa aplicable a un amplio rango de genotipos, así mismo estos tubérculos mostraron similitud con los producidos en campo. Utilizaron 5 mg/l de BAP + 500 mg/l de CCC + 8 % de sacarosa en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) y en completa oscuridad. Indican que la Dormancia de los tubérculos *in vitro* cuando son almacenados a 4°C es de 60 días si estos han sido inducidos bajo condiciones de días cortos, mientras que si fueron inducidos en completa oscuridad la dormancia fue de 210 días.

Lugo (2009), indica a los 35 días de crecimiento de los esquejes se procedió a inducir tuberización en vitroplantas desarrolladas bajo fotoperíodo de 16 horas e intensidad de luz de 8000 lux, adicionando medio de cultivo MS líquido con 80 g de sacarosa mas 12 mg de Bencilaminopurina (BA) bajo condiciones estériles. Posteriormente se ubicaron en una cámara oscura con temperaturas de 22 ± 2°C. Transcurridos 60 días de cultivo, se procedió a cosechar y evaluar.

Según Fuentes (s.f.), se emplearon plántulas de papa cv. Alpha producidas *in vitro*. Se colocaron cuatro explantes en frascos con MS, tres dosis de sacarosa (6, 8 y 10

%, p/v) y 3 concentraciones de cinetina (1.5, 3.0 y 4.5 mg/l), dichos tratamientos fueron colocados en oscuridad a 25 °C por diez semanas. Las plántulas fueron capaces de producir microtubérculos en los 9 tratamientos evaluados, después de diez semanas de incubación bajo condiciones de tuberización. La cinetina no mostró un efecto significativo sobre el desarrollo de los microtubérculos; sin embargo, la concentración de sacarosa sí tuvo un efecto sobre el número de microtubérculos por frasco. La mayor producción de microtubérculos se obtuvo en los tratamientos con 8 % de sacarosa con una producción promedio de 1.0 a 1.16 microtubérculos por plántula.

Según Jara (2004), la inducción de microtubérculos en medios sólidos adicionados con 5.0 mg/L de BAP, utilizando dos ciclos de luz (16 horas el primer mes y 8 horas el segundo mes), entregó microtubérculos con un calibre entre 1.8-3.7 mm y 11.0-216.8 mg de peso. Se determinó que la respuesta de la microtuberización se encuentra fuertemente influenciada por el genotipo el fotoperíodo y la edad de la planta madre.

Se evaluó el efecto del precultivo de vitroplantas de papa de las variedades Floresta y Granola en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con diferentes concentraciones de ácido jásmonico. Posteriormente, se subcultivó segmentos nodales de estas en medio MS suplementado con una concentración fija de 8% de sacarosa, concentraciones crecientes de 6-BAP y dos fotoperíodos distintos (8 y 16 horas luz), con una temperatura promedio de 20°C (Brenes, 2004).

Según Borda (2000), se investigó la producción de microtubérculos en cuatro medios de inducción cuyos componentes fueron: 1) El medio basal Murashige & Skoog 1962, 2) Sacarosa 8%, 3) Vitaminas, 4) Inductores de tuberización (Kinetina 2 mg/l, Daminozide 10 mg/l, ácido Jasmónico 1mg/l/BAP 10 mg/l y Cumarina 50 mg/l. Estos medios de inducción fueron comparados con el medio control (BAP 10 mg/l y CCC 500 mg/l) que es rutinariamente utilizado en el Centro Internacional de la Papa (CIP) para la producción de microtubérculos de papa. Adicionalmente, se estudiaron dos

condiciones de iluminación (16 h/día y oscuridad total) y dos consistencias de medio (sólido y líquido). La siembra de los segmentos uninodales en el medio sólido fue directa, mientras que en el medio de inducción líquido los nudos fueron previamente sembrados en medio sólido de propagación (MS, sacarosa 2.5%, vitaminas y phytigel) y posteriormente a su crecimiento (un mes) se inoculó el medio inductor líquido. Todos los tratamientos fueron almacenados a 16 horas/día y en oscuridad total, a una temperatura de 20°- 22° C, 70% de humedad y a 3000 lux. La evaluación final se realizó a los tres meses después de realizada la cosecha de los microtubérculos y se evaluó el número, peso fresco, materia seca, porcentaje de materia seca y diámetro de cada uno de ellos.

Según Hussey y Stacey (1984), trabajando con tubérculos *in vitro* de papa explican que el BAP (Bencilaminopurina) tiene un efecto promovedor de tuberculillos, el cual es mayor en días cortos que en días largos. Si bien la tuberización es promovida menos efectivamente por el CCC (Cloruro de clorocolina), su aplicación refuerza los efectos del BAP induciendo la formación temprana de tubérculos. Observaron que la tuberización también tenía lugar sin la aplicación de hormonas, pero tardaba más, en especial si era bajo condiciones de días largos. El ácido abscísico tuvo un pequeño efecto en la promoción de la tuberización. Encontraron además que el sellar los envases inhibía la tuberización a menos que agentes de absorción de etileno fueran incluidos.

Estudios realizados en el CIP por Toledo *et al.* (1998), indican, los microtubérculos de papa se usan en su mayor parte en los programas de semilla en Europa, donde se producen grandes cantidades (cientos de miles) de semilla prebásica de muy pocas variedades. Mediante esta técnica se producen y almacenan microtubérculos, pudiendo acumular varios miles en un espacio pequeño (envases húmedos a 4 °C) durante largos periodos de tiempo. La inducción de microtubérculos se produce mediante el efecto de estrés producido por el CCC (cloruro de clorocolina), BAP (6-Bencilaminopurina) y la sacarosa, los cuales en oscuridad producirán de tres a cuatro microtubérculos por planta, según la variedad.

3. LOCALIZACIÓN.

3.1 Ubicación geográfica.

La presente investigación se realizó en ambientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Agronomía dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicado a una altura aproximada de 3650 msnm, geográficamente situada entre los paralelos 16°30'00" latitud Sur, y 68°08'00" Longitud Oeste del Meridiano de Grendwich.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Materiales.

4.1.1 Material vegetal.

El material vegetal que se utilizó, fueron tubérculos de *Solanum tuberosum* ssp *andigena*, variedad Imilla Negra, conocida como Chiar Imilla o Yana Imilla, de gran aceptación en mercados regionales.



Figura 2. Tubérculo de la variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*).

Según Iriarte y Ugarte (2005), Las características apreciables de la variedad Imilla Negra, se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Características relevantes de la variedad Imilla Negra.

Especie: <i>Solanum tuberosum</i> ssp <i>andigena</i>
Variedad: Imilla Negra, Chiar Imilla, Yana Imilla.
Ploidía: 2n=4x=48.
INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA:
Significado del nombre: Niña morena.
Exigencia del suelo: Se comporta bien en suelos vírgenes o <i>purumas</i> (suelos que nunca se cultivaron), profundos de color amarillo.
Antigüedad: Variedad utilizada desde hace mas de tres generaciones atrás.
Formas de consumo: Buena para <i>tunta</i> (tubérculo deshidratado de color claro), <i>ch'uñu</i> (tubérculo deshidratado de color oscuro), <i>munti</i> (papa pelada para sopa) y <i>muraya</i> (papa congelada para sopa).
CARACTERES MORFOLÓGICOS:
Color de la flor: Azul morado con jaspes violetas.
Forma de la flor: Rotada.
Grado de floración: Moderada.
Habito de crecimiento: Erecto.
Color del tallo: Verde con pocas manchas.
Disección de la hoja: Disectada.
Forma del tubérculo: Redondos con ojos profundos.
Color de la piel: Negro.
Color de la pulpa: Crema.
CARACTERES AGRONÓMICOS
Hábito de crecimiento: Semí – erecto.
Ciclo vegetativo: Tardío (150 a 180 días).
Rendimiento: 6.5 tn/ha.
Almacenamiento: 6 meses.
CALIDAD DEL TUBÉRCULO
Calidad culinaria: Semi harinosa, la cocción dura 45 minutos. Glicoalcaloides: Bajo en contenido (no amarga).
ZONAS DE PRODUCCIÓN
La Paz: Provincia Camacho, en las comunidades Umanata, Cariquina Grande, Purapurani, Mollipongo, Huarcamarca y Chuani; en parcelas ubicadas entre 3.800 a 4.100 m de altitud.

Fuente: PROINPA-INIAF, 2009.

4.1.2 Laboratorio de Biotecnología Vegetal Facultad de Agronomía UMSA.

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

- a) **Área de lavado:** Destinado a limpieza de instrumental, frascos, recipientes, material vegetal; Provista de mesones, lavaderos de acero, bañadores de plástico y destilador de agua.
- b) **Área de preparación de medio de cultivo y esterilización:** Establecida para preparar medios de cultivo, equipada con estantes para almacenar reactivos químicos, materiales de vidrio; cuenta con mesones para la preparación de medios.
- c) **Área de transferencia:** Destinada para trabajos de excisión, micropropagación y transferencia de explantes a condiciones *in vitro*; provista de una cámara de flujo laminar, cuenta con altos niveles de asepsia.
- d) **Área de incubación:** Los cultivos *in vitro* se incuban en una sala que provee condiciones ambientales mínimamente requeridas, llegando a tener una temperatura promedio 28°C y humedad relativa 60 %.

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

4.1.3 Equipos y Materiales de laboratorio.

- a) **Equipos de laboratorio:** Autoclave tipo olla de presión (vapor bajo presión), balanzas (analítica y precisión), cámara de flujo laminar de aire, cámara de

crecimiento, horno microondas, potenciómetro o pH-metro, agitador magnético, refrigerador, termómetros de máximas y mínimas, destilador de agua.

b) Materiales de vidrio: Frascos de vidrio para almacenar soluciones stock, frascos de cultivos, matraces Erlenmeyer (250,500 ml), pipetas graduadas (10,25 ml), probetas (500,1000 ml), tubos de ensayo (100x14mm), placas petrí, vasos de precipitación (75, 100 ml), varilla de vidrio.

c) Instrumental de disección e implementos de laboratorio: Hojas de bisturí (Nº 10,11), mangos para bisturí, pinzas largas, tijeras, mechero de alcohol, bandeja de metal, papel aluminio, papel toalla, plastifilm.

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

4.1.4 Reactivos químicos.

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

b) Reguladores de crecimiento: Bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (AG)₃.

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

4.1.5 Materiales de gabinete.

Computadora, Impresora, calculadora, cámara fotográfica, planillas, marcador indeleble, etiquetas, regla, vernier o calibrador.

4.2 Metodología.

4.2.1 Procedimiento experimental.

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

4.2.2 Etapa 0 Tratamiento y selección del material vegetal.

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

El material vegetal (tubérculos madre) seleccionado, se lavó con agua corriente para eliminar restos de sustratos, materia orgánica y se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio NaOH al 2% (v/v), durante diez minutos, según su tamaño, se enjuagó tres veces con agua corriente y agua destilada estéril.

Los tubérculos fueron inducidos a la formación de brotes, en base a oscuridad por un determinado periodo de sesenta días, previa inmersión en una solución de agua destilada y ácido giberélico AG₃ (2 mg/l); almacenados a temperatura ambiente, los tubérculos tratados fueron envueltos en papel sabana.



Figura 3. Inducción de tubérculos a formación de brotes.

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

4.2.3.1 Preparación del medio de cultivo.

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

De acuerdo al requerimiento de medio de cultivo para la investigación, se formuló soluciones stock, donde los nutrimentos están dispuestos en altas concentraciones. (Anexo N°2). Para el desarrollo de plántulas en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*, se preparo el medio basal Murashige y Skoog (1962), sin la adición de reguladores de crecimiento.

4.2.3.2. Desinfección y establecimiento a condiciones *in vitro* del material vegetal.

En condiciones asépticas, se procedió seccionar los brotes desarrollados por los tubérculos, de una longitud aproximada de 80 mm, los explantes fueron sometidos a desinfección externa mediante inmersión en alcohol al 70% (v/v) por diez segundos y en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) por diez minutos. Para eliminar residuos de los agentes desinfectantes, que poseen efectos oxidativos en los explantes, se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril.

Los brotes seccionados fueron transferidos a placas petrí, donde se realizarón cortes con bisturí y pinzas flameadas, para obtener explantes de longitudes entre 4 a 6 mm con una yema, descartando los extremos apicales y basales debido a que presentaron necrosis en los tejidos, ocasionado por los agentes desinfectantes; finalmente estos explantes fueron cultivados a razón de un explante por tubo de ensayo, en posición vertical en sentido al desarrollo del brote, quedando la yema encima del medio de cultivo.

Cada explante fue sembrado en un tubo de ensayo que contenía 3 ml de medio básico MS (fuente de carbono + nutrimentos minerales + vitaminas), la composición se detalla en anexo 2, una vez sembrados los explantes en los tubos de ensayo, fueron sellados con plastifilm, se registro la variedad y fecha de la actividad, transfiriéndolos inmediatamente a sala de crecimiento o incubación que cuenta con ambientes controlados.

4.2.3.3 Análisis estadístico.

Para la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*, se procedió con el análisis estadístico descriptivo de una muestra de 150 vitroplantas escogidas completamente al azar de una población total de 400 vitroplantas.

4.2.3.4 Periodos de evaluación.

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

4.2.3.5 Variables de respuesta.

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

- a) Porcentaje de supervivencia (%S₁):** Expresa el número de vitroplantas que lograron desarrollar favorablemente en porcentajes, la relación refiere a número de plántulas desarrolladas entre el número de vitroplantas totales por cien.

- b) Porcentaje de contaminación (%C₁):** Expresa el número de vitroplantas contaminadas en porcentajes, el fenómeno se da por presencia de bacterias, hongos o algún agente contaminante externo, la relación define número de vitroplantas contaminadas entre número de vitroplantas totales por cien.



Figura 4. Explantes afectados por agentes contaminantes.

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



Figura 5. Oxidación de explantes en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

d) Altura de vitroplanta (Hv_1): Expresa el desarrollo longitudinal alcanzado medido en milímetros (mm), datos tomados desde inicio del vástago hasta el ápice, la evaluación se realizó a cuatro semanas.



Figura 6. Altura de vitroplanta etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

e) Número de nudos de plántula (Nn_1): Variable de respuesta determinada por observación y cuantificación directa, se contabilizó los nudos desarrollados en las vitroplantas a cuatro semanas.



Figura 7. Numero de nudos en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

4.2.4 Etapa II Micropropagación de vitroplantas.

Una vez que los explantes expresen su totipotencia y hayan alcanzado una altura de 60 a 80 mm, se procedió a seleccionar el mejor material vegetal, descartando plántulas que presenten algún tipo de contaminación, vitroplantas ahiladas y escaso desarrollo longitudinal.

Los tubos de ensayos fueron abiertos extrayendo las plántulas, colocándolas en placas petrí, aislando segmentos uninodales provistos de yema mas una hoja, eliminando las partes apicales y basales de la plántula, con la finalidad de uniformizar desarrollo de las vitroplantas.

Las vitroplantas fueron micropropagadas y sembradas a razón de un segmento uninodal por tubo de ensayo, que contenía 3 ml de medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962); finalmente fueron sellados con plastifilm, en posición vertical y en sentido del desarrollo de la vitroplantas, debiendo quedar el meristemo y la hoja encima del medio basal.

4.2.4.1 Análisis estadístico.

Para la etapa micropropagación *in vitro*, se procedió con el análisis estadístico descriptivo, una muestra de 150 vitroplantas escogidas completamente al azar; la población total durante la esta de micropropagación estaba comprendida por 600 vitroplantas.

4.2.4.2 Periodos de evaluación.

Las evaluaciones y análisis de datos fueron realizados; para la variable altura de vitroplanta, numero de nudos, presencia de vitrificación a tres semanas y para las variables supervivencia, contaminación a cinco días, después de iniciarse la etapa de micropropagación.

4.2.4.3 Variables de respuesta.

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

- a) **Porcentaje de supervivencia (%S₂):** Expresa el número de explantes que lograron expresar su totipotencia favorablemente.
- b) **Porcentaje de contaminación (%C₂):** expresa el número de vitroplantas contaminadas en porcentajes, el fenómeno se da por presencia de bacterias, hongos o algún agente contaminante externo.
- c) **Altura de vitroplantas (Hv₂):** Definido por el desarrollo longitudinal de las plántulas, mediciones tomadas con una regla en milímetro (mm).
- d) **Número de nudos de plántula (Nn₂):** Para establecer la variable de respuesta se procede con la observación y cuantificación directa de nudos formados por las vitroplanta en los tubos de ensayo.

4.2.5 Etapa III Siembra en medio de inducción a tuberización *in vitro*.

4.2.5.1 Preparación del medio de inducción de tuberización *in vitro*.

Se formuló medios de inducción a tuberización *in vitro*, esencialmente es un medio convencional de micropropagación MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con concentraciones altas de sacarosa en dos niveles 6% y 8% (p/v), además de adición del regulador de crecimiento bencilaminopurina (BAP), en sus niveles de concentración de 0, 2.5,5 y 10 mg/l.

Para preparar 2500 ml (aproximadamente 250 ml por tratamiento) de medio de inducción a tuberización *in vitro*, se realizó la siguiente actividad:

- Se disolvió y mezcló diferentes cantidades de soluciones concentradas del medio basal Murashige y Skoog 1962 (Anexo 1). En un matraz Erlenmeyer previamente lavado y enjuagado.

- Posteriormente se agregó sacarosa (azúcar comercial) en cantidades, según concentración 6 y 8% (p/v).
- Se añadió el regulador de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) en sus diferentes concentraciones (0,2.5, 5,10 mg/l) según tratamiento.
- Se enrazó el volumen a 250 ml por tratamiento, con agua destilada.
- El pH de los medios de inducción a tuberización *in vitro* debe ajustarse a 5.7 (elevar con hidróxido de sodio NaOH al 1N, bajar con ácido clorhídrico HCl al 1N).
- Añadir 7,5 g de agar como agente gelificante, con la finalidad de formar un medio en estado semisólido.
- Se disolvió el agente gelificante en horno microondas, agitar el matraz Erlenmeyer hasta que el agar se disuelva, obteniendo una solución homogénea, evitando que hierva.
- Se distribuyó 25 ml del medio de inducción a tuberización *in vitro*, por cada frasco de vidrio, previamente lavado y esterilizado.
- Se procedió a sellar los frascos de cultivo con papel aluminio y papel madera sujetos por banditas elásticas.
- La esterilización del medio de inducción a microtuberización *in vitro*, fue por vapor bajo presión (autoclave) a 121 °C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
- El BAP se autoclavó junto al medio de cultivo, sin embargo se estima que pierda parte de su principio activo.

4.2.5.2 Siembra en medio de inducción a tuberización *in vitro*.

Se procedió a seccionar segmentos uninodales de las vitroplantas propagadas en la etapa de establecimiento y micropropagación, se seleccionaron las mejores vitroplantas, suprimiendo plántulas ahiladas que desarrollaron un escaso crecimiento longitudinal, descartando plántulas afectadas por vitrificación; se introdujo diez segmentos nodales por frasco de vidrio, cada frasco contenía 25 ml del medio de inducción a tuberización *in vitro*.

Una vez realizadas las siembras de los explantes en medios de inducción a tuberización *in vitro*, se selló con plastifilm; previo flameo de los frascos, debidamente

etiquetadas, transfiriéndolos inmediatamente a sala de crecimiento o incubación, que cuenta con ambientes controladas mínimamente requeridos con temperatura 27 °C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad (fotoperiodo largo).

Las vitroplantas fueron incubadas en tres regímenes de fotoperiodo, treinta días en fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), que favorece el desarrollo *in vitro* de gran cantidad de especies; posteriormente las vitroplantas fueron cambiadas a fotoperiodo corto (8 horas luz y 16 horas de oscuridad), que promueve la tuberización en cultivos de papa de la especie *Solanum tuberosum ssp andigena*, se considero un tercer fotoperiodo que consistía en someter a las vitroplantas en oscuridad completa, esto favorece eficientemente la tuberización *in vitro*.

4.2.5.3 Fotoperiodos que favorecen la tuberización *in vitro*.

Se determinaron tres regímenes de fotoperiodo, que favorecen la tuberización *in vitro*, según cuadro:

Cuadro 2. Influencia de fotoperiodos sobre la tuberización *in vitro*.

Nº	Fotoperiodo	Observación
1	16 Hr. luz / 8 oscuridad	Favorece el desarrollo longitudinal de los explantes.
2	8 Hr. luz/16 oscuridad	Favorece y promueve la tuberización.
3	Oscuridad completa	La tuberización <i>in vitro</i> es promovida eficientemente por la oscuridad.

4.2.5.4 Diseño experimental.

El Diseño Experimental empleado en la investigación, durante la etapa de tuberización *in vitro* fue Completos al Azar, con arreglo bifactorial y diez repeticiones por tratamiento, los factores (2x4) de estudio son niveles de concentración de sacarosa y BAP (Bencilaminopurina).

4.2.5.5 Modelo Lineal Aditivo.

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

Donde:

- Y_{ijk} = Una observación cualquiera.
 μ = Media General.
 α_i = Efecto del i-ésimo factor **A** (niveles de concentración sacarosa).
 β_j = Efecto del j-ésimo factor **B** (niveles de concentración de BAP).
 $(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción entre i-j (efecto de la interacción de concentraciones **sacarosa*BAP**).
 ε_{ijk} = Error Experimental.

Los datos obtenidos, fueron analizados por medio del programa estadístico S.A.S. (Sistema de Análisis estadístico), realizando antes la transformación de datos usando al formula $\sqrt{x+1}$, debido a que algunos parámetros observados eran cero "0" en las variables de respuesta numero de tubérculos por frasco (Ntf), diámetro de tubérculos (Dti), peso fresco de tubérculo (Pft), para las demás variables no fue necesario realizar la transformación.

4.2.5.6 Factores de variación.

Los criterios de selección de las concentraciones del factor A (niveles de concentración de sacarosa) y factor B (niveles de concentración de Bencilaminopurina), están determinadas por investigaciones en tuberización *in vitro* que presentan óptimos resultados con dichas concentraciones:

Factor A: Niveles de concentración de sacarosa (p/v).

$a_1=$	6 %
$a_2=$	8 %

Factor B: Niveles de concentración del regulador de crecimiento Bencilaminopurina (BAP).

b₀ =	0 mg/l
b₁ =	2.5 mg/l
b₂ =	5 mg/l
b₃ =	10 mg/l

Cuadro 3. Descripción de factores de estudio en la etapa de tuberización *in vitro*.

FACTOR A CONCENTRACIÓN DE SACAROSA (%)	FACTOR B CONCENTRACIÓN DE BAP (mg/l)
a₁ = 6	b₁ =0
	b₂ = 2.5
	b₃ = 5
	b₄ = 10
a₂ = 8	b₁ =0
	b₂ = 2.5
	b₃ = 5
	b₄ = 10

4.2.5.7 Combinación de tratamientos.

Cuadro 4. Tratamientos según combinación de niveles sacarosa y BAP.

Tratamiento 1	a₁ × b₁	6% sacarosa+ sin regulador de crecimiento BAP (0 mg/l)
Tratamiento 2	a₁ × b₂	6% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (2,5 mg/l)
Tratamiento 3	a₁ × b₃	6% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (5 mg/l)
Tratamiento 4	a₁ × b₄	6% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (10 mg/l)
Tratamiento 5	a₂ × b₁	8% sacarosa+ sin regulador de crecimiento BAP (0 mg/l)
Tratamiento 6	a₂ × b₂	8% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (2,5 mg/l)
Tratamiento 7	a₂ × b₃	8% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (5 mg/l)
Tratamiento 8	a₂ × b₄	8% sacarosa + regulador de crecimiento BAP (10 mg/l)

4.2.5.8 Variables de respuesta.

Las variables de respuesta para la etapa de inducción a tuberización *in vitro*, fueron priorizados bajo el siguiente detalle:

a) **Altura final de vitroplantas (Hfv):** Expresa el desarrollo longitudinal alcanzado por las vitroplantas en el medio de inducción a tuberización *in vitro*, medido en milímetros (mm).



Figura 8. Altura de vitroplantas etapa de tuberización *in vitro*.

b) **Peso fresco de la plántula (Pfv):** Establecida por la biomasa producida por las vitroplantas en miligramos (mg), variable respuesta tomada al final de la etapa de inducción a tuberización *in vitro*.



Figura 9. Peso fresco de vitroplanta.

c) **Números de tubérculos *in vitro* por frascos (Ntf)**: Variable de respuesta establecida por observación y cuantificación directa, indica el número de tubérculos *in vitro* por frascos que se desarrollaron durante la etapa de inducción a tuberización.



Figura 10. Número de tubérculos *in vitro* por frasco.

d) **Diámetro de tubérculos *in vitro* (Dti)**: Expresa el diámetro ecuatorial de los tubérculos *in vitro* por tratamientos, la medición se la realizó con un calibrador o vernier en milímetro (mm), proceso realizado en la cosecha de los tubérculos.

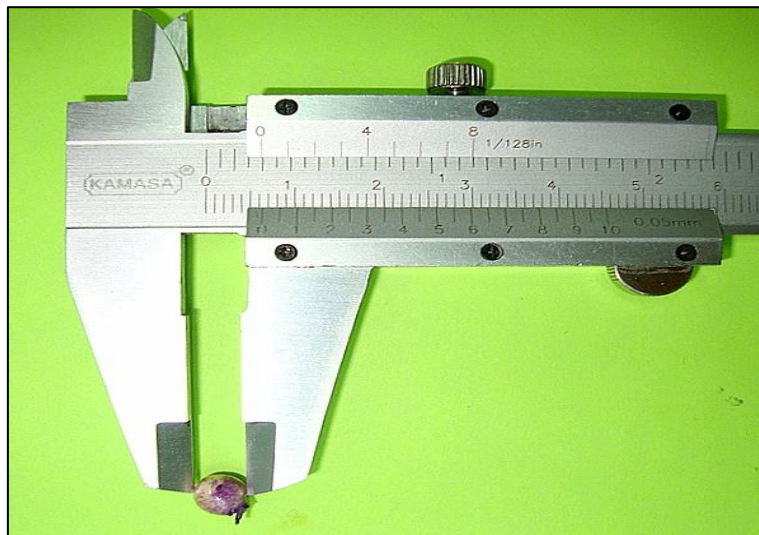


Figura 11. Determinación de diámetro de tubérculos *in vitro*.

e) **Peso fresco del microtubérculo (Pft):** Los tubérculos desarrollados en condiciones *in vitro*, una vez cosechados fueron sometidos a pesaje en una balanza digital, datos tomados en miligramos (mg) y clasificados según tratamientos.

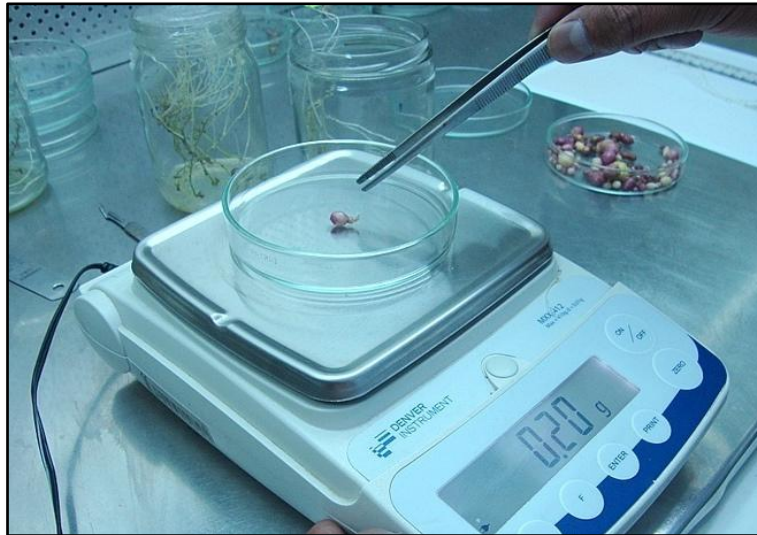


Figura 12. Peso fresco del microtubérculo.

f) **Numero de raíces (Nr):** Variable evaluada por observación y cuantificación directa de los frascos de cultivo, datos tomados al finalizar la etapa de inducción a tuberización *in vitro*.



Figura 13. Vista posterior de frascos formación de raíces.

g) Grado de formación de callos (Gfc): Parámetro evaluado a través de observación directa de las vitroplantas, se tomó en cuenta formaciones de tejido desorganizado presentes en la parte basal de las plántulas.



Figura 14. Formación callosa en la parte basal de vitroplantas.

La obtención de datos para su análisis estuvo basada bajo los siguientes rangos:

Cuadro 5. Grado de formación de callos en vitroplantas.

Formación de callos	Valor
Nulo	0
Escaso	1
Regular	2
Abundante	3

Fuente: Propia, 2013.

4.2.6 Etapa III Cosecha de tubérculos *in vitro*.

Los tubérculos *in vitro*, fueron extraídos a tres meses de los frascos de cultivo, separados en la parte de unión del microtubérculo y el estolón, se los clasificó por tratamientos. Bajo condiciones asépticas los tubérculos *in vitro* correspondiente a cada tratamiento y unidades experimentales, fueron almacenados en cajas petrís, bajo temperatura ambiente y oscuridad completa.



Figura 15. Cosecha de tubérculos *in vitro*.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

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

5.1.1 Porcentaje de supervivencia (%S₁).

Determinado por el número de vitroplantas desarrolladas favorablemente, aptas para micropropagación *in vitro*, expresada en porcentajes (%).

El cuadro 6, refleja el porcentaje de supervivencias (%S₁) de los brotes de tubérculos de papa variedad Imilla Negra; en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro* asciende a 70%, atribuible al estricto protocolo de desinfección del material vegetal e instrumental de laboratorio empleados.

Cuadro 6. Porcentaje de supervivencia etapa de introducción a condiciones *in vitro*.

Variedad	Nro. Explantes Establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	Nro. de explantes supervivientes	Porcentaje de supervivencia (%S ₁)
Imilla Negra	150	105	70%

Al respecto Gutiérrez (2009), indica una de las desventajas para iniciar el cultivo *in vitro*, sin duda es el porcentaje de supervivencia, ya que después del establecimiento dependerá del manejo adecuado de los explantes, del medio de cultivo y del tipo de órgano a emplear, en este caso es recomendable utilizar brotes jóvenes de tubérculos de papa.

Una de las causas para la reducción de la misma, puede deberse a que los explantes fueron quemados con pinzas o también al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y etanol (Gutiérrez, 2009).

5.1.2 Porcentaje de contaminación (%C₁).

Definido por el número de vitroplantas contaminadas expresada en porcentajes (% C₁), el fenómeno es causado por presencia de bacterias, hongos o agentes contaminantes externos, que hallan en el medio de cultivo y el ambiente condiciones

apropiadas para su proliferación, se caracteriza por competir la disponibilidad de nutrimentos con las vitroplantas.

El porcentaje de contaminación durante la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro* ascienden a un 20 % (Cuadro 7), los agentes contaminantes identificados son de naturaleza fúngica; el fenómeno se presenta en los primeros cinco a seis días de haber transferidos las plántulas a sala de incubación.

Cuadro 7. Porcentaje de contaminación etapa introducción a condiciones *in vitro*.

Variedad	Nro. Explantes Establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	Nro. de explantes contaminados	Porcentaje de contaminación (%)
Imilla Negra	150	30	20%

Menciona Monrroy (2009), son considerados como agentes contaminantes comunes en laboratorios de cultivos de tejidos *penicillum* y *aspergillus*; que corrobora la presencia de contaminación fúngica en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro* de papa variedad Imilla Negra.

5.1.3 Porcentaje de Oxidación (%O).

La determinación de la variable de respuesta porcentaje de oxidación (%O), fue medida por observación directa de los tubos de ensayo, se cuantifico el número explantes y medios de cultivos que presentan características de tonalidad marrón y café, el cambio de color indica la presencia de oxidación, este fenómeno en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro* asciende a 10% (Cuadro 8); la oxidación puede apreciarse tanto en el explante como en el medio de cultivo.

Cuadro 8. Porcentaje de Oxidación en la etapa de introducción a condiciones *in vitro*.

Variedad	Nro. Explantes Establecimiento a condiciones <i>in vitro</i>	Nro. de explantes oxidados	Porcentaje Oxidación (O%)
Imilla Negra	150	15	10%

La oxidación se da principalmente por la desinfección superficial de los explantes, con altas concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) o por la prolongada exposición al compuesto químico.

Los resultados concuerdan con Mamani (2005), quien menciona que la inmersión prolongada en concentraciones altas de blanqueador comercial, causan necrosis en los explantes. Al respecto Roca y Mroginski (1991), indican que el hipoclorito de sodio (NaClO) además de ser un desinfectante también es un agente oxidante. Concordando que, mientras la concentración de hipoclorito de sodio se reduce proporcionalmente se disminuyen los problemas de oxidación.

Choque (2009), menciona que el hipoclorito de sodio al 4%, produce mayor porcentaje de oxidación en combinación con sacarosa al 5%, es probable que esto se deba a la respuesta de los explantes al medio nutritivo, los explantes se adecuan mejor en medios con concentraciones regulares de sacarosa y consecuentemente ocurre menor porcentaje de contaminación.

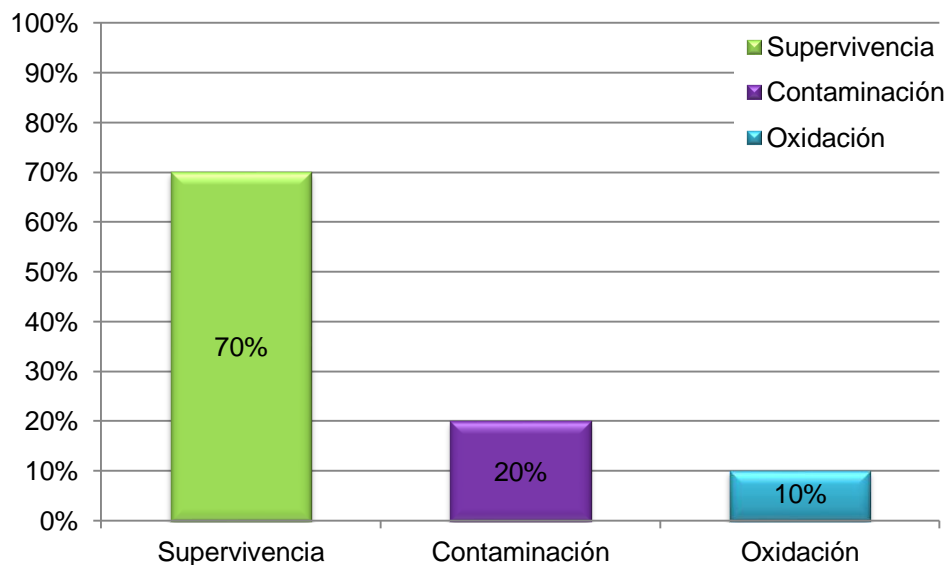


Figura 16. Porcentaje de contaminación (%C₁), supervivencia (%S₁) y oxidación (%O) en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

5.1.4 Altura de vitroplantas (Hv₁).

a) Promedio de altura final de vitroplanta.

Las vitroplantas desarrolladas favorablemente (% de supervivencia), fueron medidas en cuanto a su desarrollo longitudinal alcanzado, expresado en milímetros (mm), desde inicio del vástago hasta el ápice.

Cuadro 9. Promedio de altura de vitroplantas etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

Variedad	Nro. Explantes	Promedio de altura final (mm)
Imilla Negra	105	60.3

Los explantes de la variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), durante la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*, ostentaron un promedio de altura de 60.3 mm (máxima 82 y mínima 41 mm), las plántula tuvieron una expansión longitudinal que alcanzó alrededor del 80% del tubo de ensayo (100x14mm), considerado optimo para realizar la micropropagación o multiplicación *in vitro* (Figura 17).

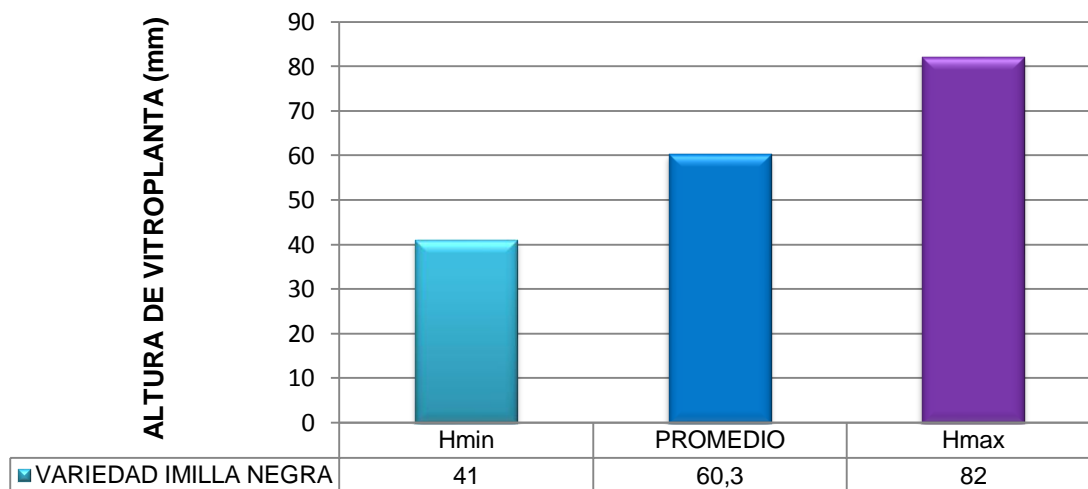


Figura 17. Comparación de altura máxima, mínima y promedio de vitroplantas en la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

b) Desvió estándar.

La mayoría de las setenta plántulas expresan cuatro semanas del establecimiento a condiciones *in vitro*, una desviación estándar de altura que varía en mas (+) / menos (-) 6.5 mm por plántula respecto a la media.

Cuadro 10. Desviación estándar de altura de vitroplantas etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*.

Variedad	Nro. Explantes	Desvió estándar S (mm)
Imilla Negra	105	6.5

5.1.5 Número de nudos (Nn₁).

Se cuantificó el número de nudos de vitroplantas, a través de la observación y conteo directo de los tubos de ensayo que contenían las plántulas. Durante la etapa de establecimiento a condiciones *in vitro*, la variedad Imilla Negra obtuvo un promedio de 5.6 nudos por vitroplantas (Cuadro 11), considerada relativamente optima para la etapa de micropropagación.

Cuadro 11. Promedio de números de nudos por vitroplantas etapa de establecimiento.

Variedad	Nro. Explantes	Promedio de nudos/plántula
Imilla Negra	105	5.6

Al respecto Quispe (2009), indica que el número de nudos es una variable primordial en la fase micropropagación, de ello depende el número de vitroplantas a obtenerse posteriormente.

Según Quispe (2009), los índices de multiplicación que se pueden alcanzar en papa tiene una progresión geométrica, de cada plántula *in vitro* se obtiene nudos para generar nuevas plántulas para una siguiente propagación. En condiciones de

laboratorio, en un año, puede llegar a producirse teóricamente gran cantidad de plántulas; de esta manera, se puede garantizar una provisión permanente y oportuna de plantas *in vitro* de óptima calidad sanitaria, según sea la necesidad.

5.2 Etapa II micropropagación de vitroplantas.

5.2.1 Porcentaje de supervivencia (%S₂).

En la etapa de micropropagación se evidencia un alto porcentaje de supervivencia del 90% (Cuadro 12), atribuible a un óptimo manejo de los explantes procedentes de plántulas *in vitro*.

Cuadro 12. Porcentaje de supervivencia (%S₂) etapa de micropropagación.

Variedad	Muestra de explantes micropropagados	Nro. de explantes supervivientes	Porcentaje de supervivencia (%S ₂)
Imilla Negra	150	135	90%

5.2.2 Porcentajes de contaminación (%C₂).

La presencia de agentes contaminantes en la etapa de micropropagación ascienden a un 10% (cuadro 13), los agentes contaminantes identificados fueron de naturaleza fúngica.

Cuadro 13. Porcentaje de contaminación (%C₂) en la etapa de micropropagación.

Variedad	Muestra de explantes micropropagados	Nro. de explantes contaminación	Porcentaje de contaminación (%C ₂)
Imilla Negra	150	15	10%

El porcentaje de contaminación disminuye considerablemente en la etapa de micropropagación, debido a que los explantes provienen de vitroplantas (segmentos uninodales), incubados asépticamente y no se procede con la desinfección de explantes a través de agentes químicos, por tanto en esta etapa no se hallan síntomas de efectos oxidativos.

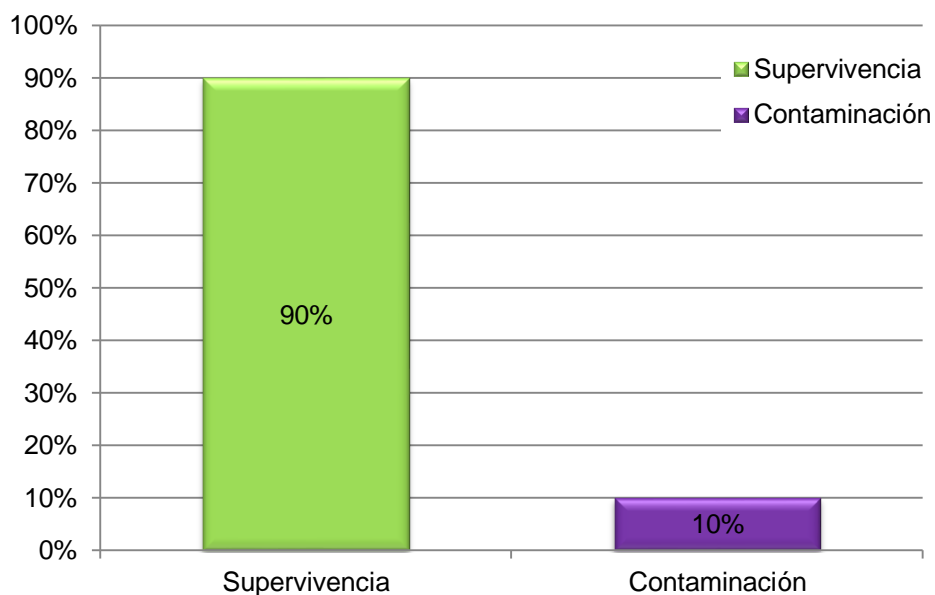


Figura 18. Porcentaje de contaminación (%C₂) y supervivencia (%S₂) en la etapa de micropropagación.

5.2.3 Altura de vitroplantas (Hv₂).

a) Promedio de altura.

Se obtuvo un promedio de 80.8 mm (máxima 98 mm y mínima de 56 mm) de altura de vitroplantas en la etapa micropropagación (Cuadro 14 y Figura 19).

Cuadro 14. Promedios de altura de vitroplantas etapa de micropropagación.

Variedad	Muestra de explantes micropropagados	Promedio de altura (mm)
Imilla Negra	150	80.8

Toledo *et al.* (1998), menciona al respecto; el crecimiento de las plántulas propagadas *in vitro* dependerá del medio utilizado, de las condiciones ambientales del cuarto de incubación y de la variedad, por ello es preciso evaluar las plántulas en las condiciones de crecimiento en relación con el tiempo.

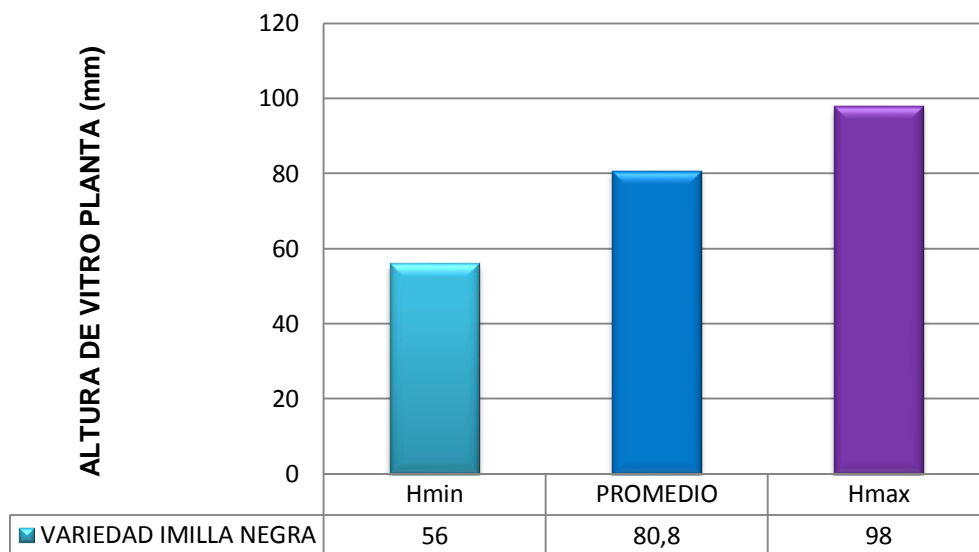


Figura 19. Comparación de altura máxima, mínima y promedio de vitroplantas etapa de micropropagación.

b) Desvió estándar.

Las plántulas desarrolladas, en la etapa de micropropagación, obtuvieron una altura que varía en mas (+)/menos (-) 8.1 mm por plántula con respecto a la media (Cuadro 15).

Cuadro 15. Desviación estándar de altura de vitroplanta etapa de micropropagación.

Variedad	Nro. Explantes	Desvió estándar S (mm)
Imilla Negra	135	8.1

5.2.4 Número de nudos (Nn₂).

Se cuantificó la variable de respuesta número de nudos de vitroplantas en la etapa de micropropagación, a través de observación y conteo directo en los tubos de ensayo. Durante la etapa de micropropagación, la variedad Imilla Negra alcanzo un promedio de 12.5 nudos por vitroplantas (Cuadro 16), óptimas para iniciar el proceso de tuberización *in vitro*.

Cuadro 16. Promedio de número de nudos por plántula etapa de micropropagación.

Variedad	Nro. Explantes	Promedio de Nro. De nudos por plántula
Imilla Negra	135	12.5

5.3 Etapa III inducción a tuberización *in vitro*.

La etapa de tuberización *in vitro*, iniciada a través de la siembra de explantes (segmentos uninodales) en un medio enriquecido con sacarosa y BAP (Bencilaminopurina), bajo diferentes niveles de concentración, a tres meses registró los siguientes resultados:

5.3.1 Altura final de la vitroplantas (Hfv).

El Análisis de Varianza (ANVA), para la variable de respuesta altura final de vitroplanta en la etapa de tuberización *in vitro* (Cuadro 17), muestra que no existen diferencias significativas entre los niveles de concentración de sacarosa ($P > 0.05$), sin embargo se establece que existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre los niveles de concentración de BAP y para la interacción de factores de variación Sacarosa x BAP se encontró efectos significativos ($P < 0.05$).

El coeficiente de variación (CV), refleja un porcentaje de 12.65%, estando dentro de los rangos de confiabilidad permitidos para este tipo de estudio.

Cuadro 17. Análisis de varianza para altura final de vitroplanta (Hfv).

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	264.23	264.23	2.28	0.1358	NS
Niveles de concentración BAP	3	78227.82	26075.94	224.59	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	1046.49	348.83	3.00	0.0359	*
Error Experimental	72	8359.64	116.11			
TOTAL	79	87898.18				

CV=14.84 %

NS= No Significativo; **** =** Altamente Significativo, ***** = significativo.

La prueba de comparación de promedios Duncan, para la fuente de variación niveles de concentración de sacarosa (Figura 20), a un nivel de significancia 5%, establece que el nivel de sacarosa 6%, obtuvo un promedio general de 74.45 mm de altura de vitroplanta, a si mismo el nivel de concentración de sacarosa al 8% presenta un promedio general en altura de 70.81 mm, determinándose que no existen diferencias significativas entre ambas concentraciones.

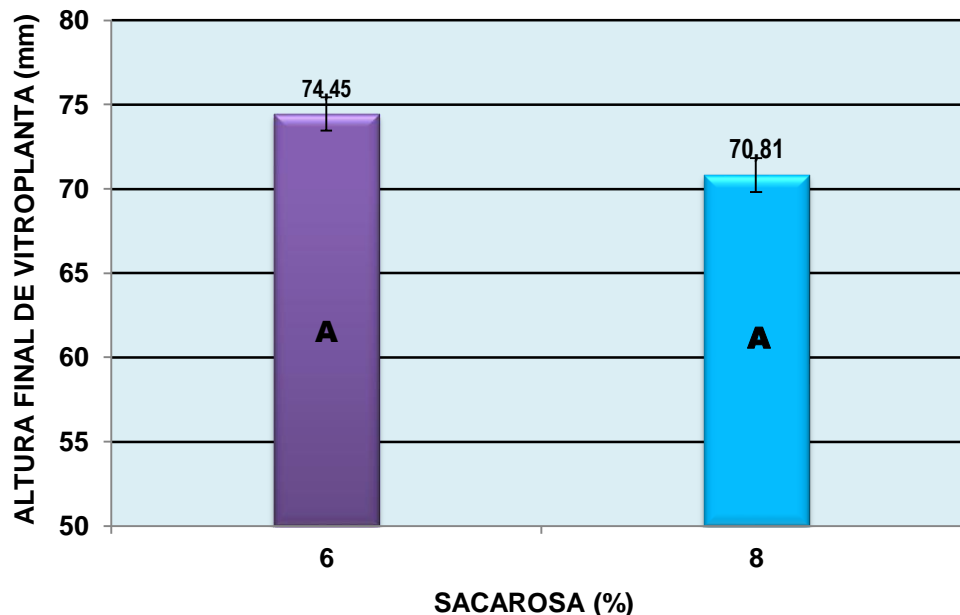


Figura 20. Prueba de promedios Duncan para altura final de vitroplanta (Hfv) por efecto de niveles de concentración de Sacarosa.

La prueba de promedios Duncan a un nivel de significancia 5%, para la variable de respuesta altura final de vitroplanta, por efecto de los niveles de concentración de BAP (Figura 21), establece diferencias significativas, determinándose cuatro estratificaciones de altura; el medio de cultivo formulado sin regulador de crecimiento BAP 0 mg/l, presento un promedio en altura de 115.16 mm; seguido por la concentración de BAP a razón de 2.5 mg/l con 85.59 mm; el tercer grupo identificado está determinado por nivel de concentración de BAP 5 mg/l, que presento 58.91 mm de altura y finalmente la concentración de BAP a 10 mg/l, obtuvo una expansión longitudinal de 30.84 mm, considerada la altura más baja.

Se obtiene buen desarrollo longitudinal en explantes de la variedad Imilla Negra, en un medio basal sin regulador de crecimiento BAP (0 mg/l), Se observó que la aplicación de BAP en sus concentraciones 5 a 10 mg/l limita el desarrollo longitudinal, debido a que promueve formaciones callosas en la parte basal de las vitroplantas, además que inhibe la formación de raíces. El medio de cultivo formulado con regulador de crecimiento BAP en nivel de concentración 2.5 mg/l, favorece el desarrollo longitudinal de la vitroplanta, además se observa desarrollo radicular optimo.

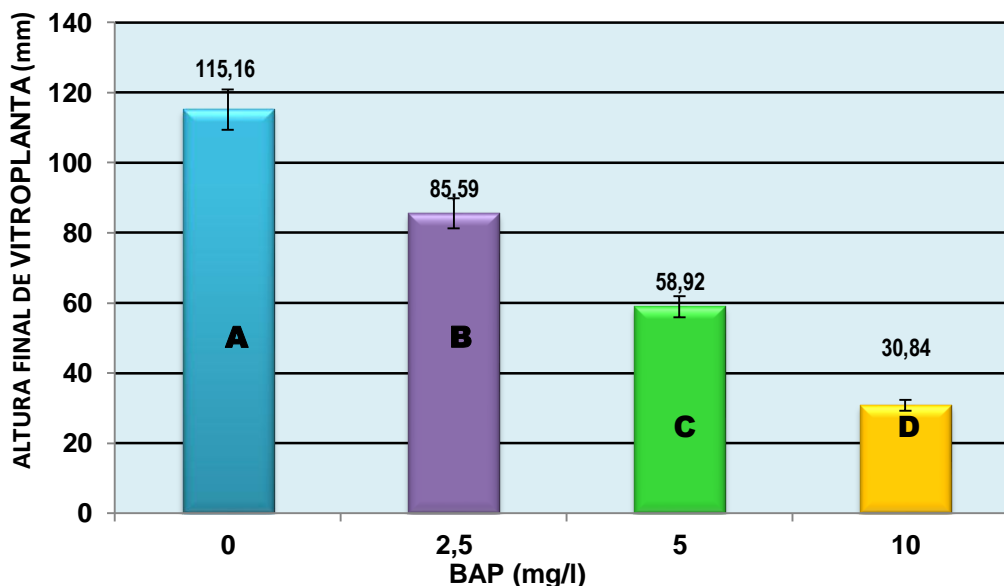


Figura 21. Prueba de promedios Duncan para altura final de vitroplanta por efecto de niveles de concentración de BAP.

En la figura 22, se observa la interacción niveles de concentración de sacarosa por niveles de concentración de BAP, donde se aprecia los tratamientos que presentaron mejores promedios de altura de vitroplanta, estuvieron determinados por el tratamiento 1 (6 % sacarosa x 0 mg/l BAP) con 118.34 mm; seguido por el tratamiento 5 (8% sacarosa x 0 mg/l BAP) que presentó 111.98 mm, consecuentemente el tratamiento 6 (8 % sacarosa x 2,5 mg/l BAP), fue la tercer combinación de factores considerado relativamente alto con 89.96 mm. Además del tratamiento 2 (6% sacarosa x 2.5 mg/l BAP), que ostentó una altura de 81.23 mm, Los promedios de altura de vitroplanta más bajos fueron dados por los tratamientos 3 (6% sacarosa x 5 mg/l BAP), tratamiento 7 (8% sacarosa x 5 mg/l BAP), tratamiento 4 (6% sacarosa x 10 mg/BAP) y tratamiento 8 (8% sacarosa x 10 mg/BAP), con 62.58; 55.25; 35.63 y 26.05 mm de altura respectivamente.

De acuerdo con los resultados se puede inferir, que empleando sacarosa en niveles de concentración de 6 y 8 % en el medio de cultivo, favorece un óptimo desarrollo longitudinal (altura final de vitroplanta), la combinación con el regulador de crecimiento BAP en concentración de 2.5 mg/l en el medio de cultivo, logra generar una altura promedio entre 81.23 y 89.96 mm, considerada relativamente alta, además que promueve la formación y proliferación de tubérculos *in vitro*. Sin embargo niveles de concentración de 5 y 10 mg/l del regulador de crecimiento BAP inducen a formaciones de masas de células desordenadas denominadas callos, afectando la parte basal del segmento nodal, limitando la elongación y la formación del sistema radicular.

Al respecto indica Mejía (1998), se permite un buen desarrollo de las plantas en presencia de una citocinina como la bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo, el cual promueve la elongación del tallo, utilizado en bajas concentraciones.

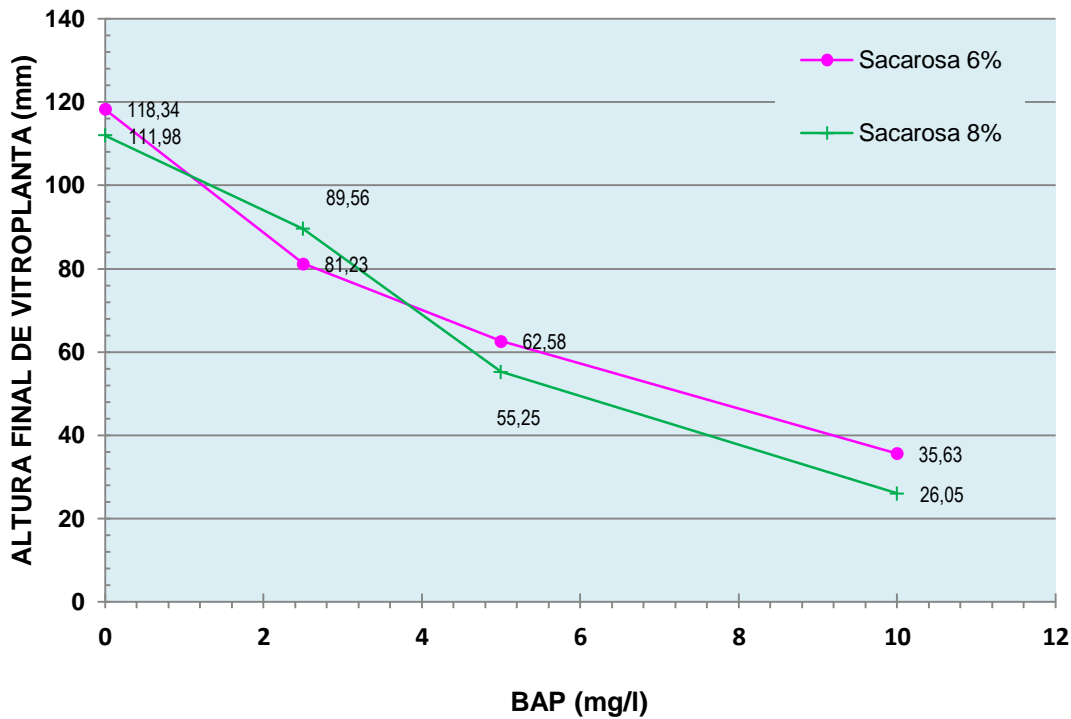


Figura 22. Variación de altura final de vitroplanta por interacción de niveles de concentración de Sacarosa y BAP.

5.3.2 Peso fresco de vitroplanta (Pfv).

El Análisis de Varianza (ANVA), para la variable de respuesta peso fresco de vitroplanta (Pfv), en la etapa de inducción a tuberización *in vitro* (Cuadro 18), no presenta diferencias significativas ($P > 0.05$) para los diferentes niveles de concentración de sacarosa, los resultados determinan que la aplicación de sacarosa (6 y 8%), como fuente de carbono en el medio de inducción a tuberización *in vitro* de explantes de la variedad Imilla Negra, no afecta la obtención de plántulas con buen peso fresco.

En cambio existen diferencias altamente significativas ($P < 0.01$), tanto para niveles del regulador de crecimiento BAP e interacción de factores de variación (Sacarosa x BAP). El Coeficiente de Variación (CV) es igual a 9.73%, refleja que los datos son confiables y el manejo del experimento ha sido relativamente bueno, por tanto se encuentra dentro del rango permitido para este tipo de estudio.

Cuadro 18. Análisis de varianza para peso fresco de vitroplanta (Pfv)

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	406.76	406.76	0.88	0.3512	NS
Niveles de concentración BAP	3	442239.52	147413.17	319.16	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	15845.58	5281.86	11.44	0.0001	**
Error Experimental	72	33254.82	461.87			
TOTAL	79	491746.68				

CV=9.73%

NS= No Significativo; ****** = Altamente Significativo, ***** = significativo.

La prueba de comparación de promedios Duncan, para la fuente de variación niveles de concentración de sacarosa (figura 23), a un nivel de significancia 5%, establece que el nivel de sacarosa 6%, obtuvo un promedio general de 223.08 mg de peso fresco de plántula, así mismo el nivel de concentración de sacarosa al 8% presentó un promedio general de peso fresco de plántula de 218.57 mg, determinándose que no existen diferencias significativas entre ambas concentraciones. Esto indica que aplicando al medio de cultivo sacarosa entre 6 y 8%, se obtiene pesos de vitroplantas casi similares.

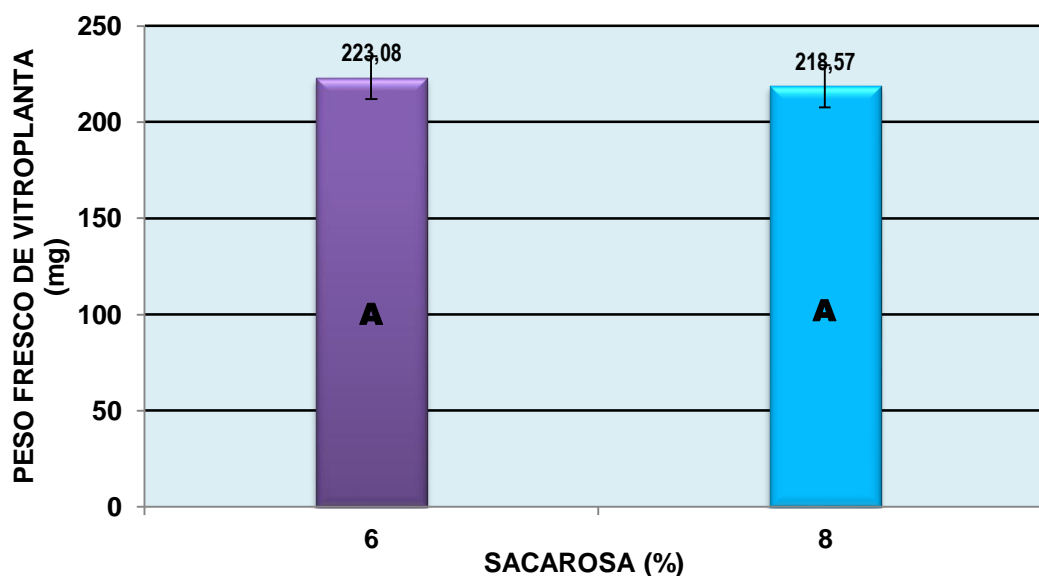


Figura 23. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de plántula (Pfv) por efecto de niveles de concentración de Sacarosa.

La prueba de rango múltiple de Duncan, para la variable de respuesta peso fresco de vitroplanta (Figura 24), por efecto de los niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP, establece cuatro estratificaciones, el medio de cultivo sin regulador de crecimiento BAP (0 mg/l) alcanzó un promedio de 326.98 mg de peso fresco, seguido por el medio de cultivo de cultivo que contenía 2.5 mg/l de BAP que alcanzó un promedio de 237.49 mg, la concentración 5 mg/l de BAP obtuvo un promedio en peso de 198.31 mg, finalmente el peso fresco más bajo se dio a una concentración de BAP al 10 mg/l que presentó un promedio de 120.54 mg .

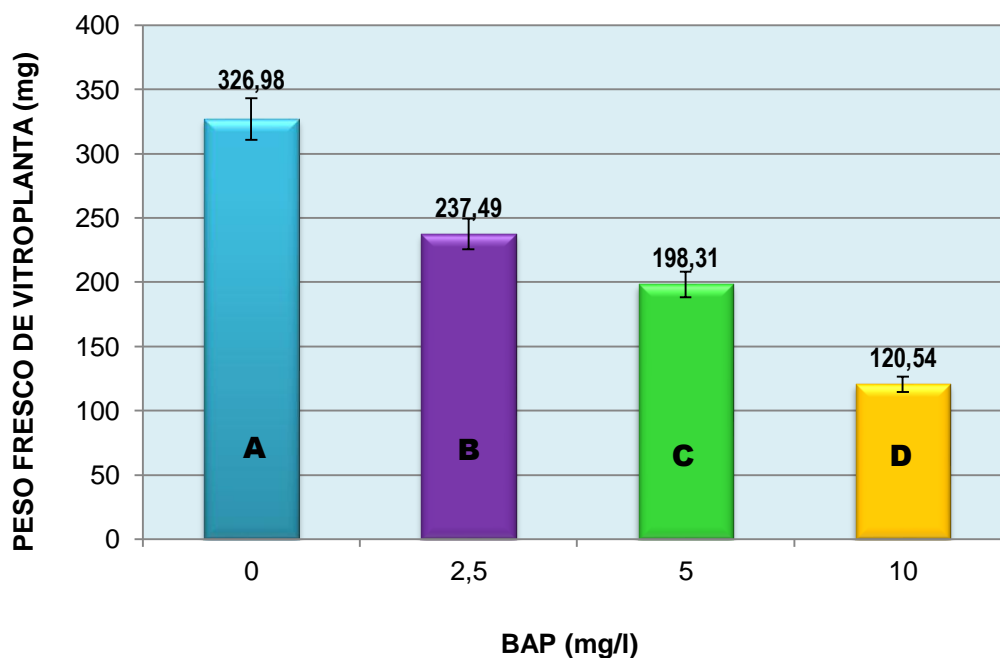


Figura 24. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de vitroplanta por efecto de concentraciones de BAP.

La figura 25, representa la interacción entre niveles de concentración de sacarosa y BAP, los tratamientos que presentan mejores promedios de peso fresco de vitroplanta (Pfv), están dados por el tratamiento 1 (6% sacarosa x sin BAP) con 349.5 mg y el tratamiento 5 (8% sacarosa x sin BAP) con 304.46 mg; consecuentemente el tratamiento 6 (8% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) presenta 247.48 mg, seguido por el tratamiento 2 (6% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) que alcanzó 227.50 mg y el tratamiento 7 (8% sacarosa x 5 mg/l BAP) con 210.05 mg de peso fresco considerados relativamente óptimos. En contra posición los promedio de peso fresco más bajos

fueron proveídos por los tratamientos 4 (6 % sacarosa x 10 mg/l BAP) que obtuvo 128.56 mg y el tratamiento 8 (8% sacarosa x 10 mg/l BAP) con 112.30 mg.

La formulación del medios de basal con 6 y 8% de sacarosa y sin regulador de crecimiento BAP, llega a proporcionar óptimo peso fresco de plántula, en contraposición la aplicación de BAP en sus niveles 5 y 10 mg/l al medio de inducción a tuberización *in vitro*, presentaron menor peso fresco, debido al a formación de callos en la parte basal de la plántula. La concentración óptima del regulador de crecimiento BAP es de 2.5 mg/l, que combinado con los niveles de sacarosa al 6 y 8% se logra obtener vitroplantas con buen peso y desarrollo longitudinal, además que se observa buena formación de raíces que favorecen la absorción de nutrimentos del medio de cultivo, que se manifiesta en la formación y proliferación de microtubérculos.

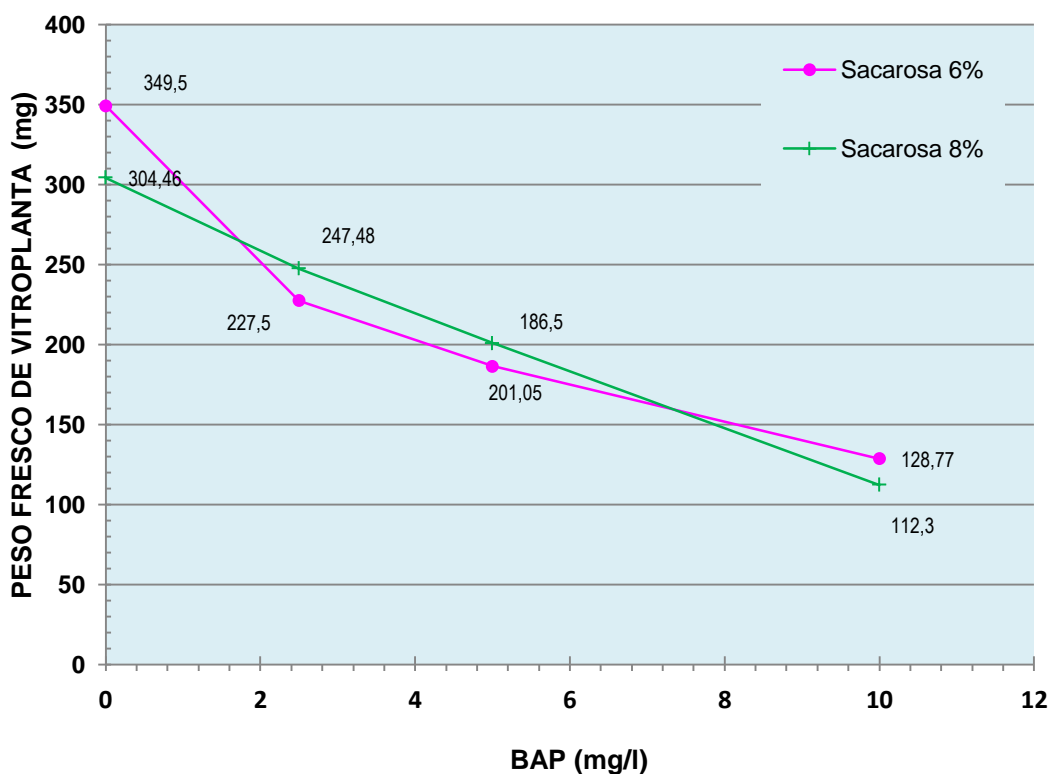


Figura 25. Variación de peso fresco de vitroplanta por interacción de niveles de concentración de sacarosa y BAP.

5.3.3 Números de tubérculos *in vitro* por frascos (Ntf).

El Análisis de Varianza (ANVA) para la variable de respuesta número de tubérculos *in vitro* por frasco (Cuadro 19), presenta diferencias altamente significantes ($P < 0.01$), tanto para los factores de variación niveles de concentración de sacarosa, niveles del regulador de crecimiento BAP y para la interacción de los factores. El coeficiente de variación (CV) de 9.47%, muestra que los datos han sido manejados de forma relativa y se encuentran dentro de los rangos permitidos para este tipo de estudio.

Cuadro 19. Análisis de varianza para número de tubérculos por frasco.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	1.5346	1.5346	38.51	0.0001	**
Niveles de concentración BAP	3	46.2063	15.4021	386.56	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	1.0352	0.3551	8.66	0.0001	**
Error Experimental	72	2.8688	0.0398			
TOTAL	79	51.6488				

CV=9.47 %

NS= No Significativo; ** = Altamente Significativo, * = significativo.

La prueba de comparación de promedios Duncan, para la fuente de variación niveles de concentración de sacarosa (Figura 26), expone dos grupos estadísticos identificados; el nivel de sacarosa 8% produce 4.75 tubérculos *in vitro* por frascos y el segundo rango estadístico está determinado por la concentración de sacarosa 6% que presenta un promedio general de 3.43 tubérculos por frasco. Siendo el nivel de concentración 8% de sacarosa que promueve eficientemente la tuberización *in vitro*.

Se ha establecido que las concentraciones 6 y 8% de sacarosa promueven la formación de microtubérculos, siendo el nivel 8% la más efectiva, se puede inferir que la aplicación de altas concentraciones de sacarosa inducen la microtuberización, sin embargo se ha identificando en el estudio que la formación de microtubérculo es tardía y afecta la proliferación en comparación a la combinación con el regulador de

crecimiento BAP en su nivel de 2.5 mg/l que favorece el tamaño, proliferación, peso y tiempo de formación.

Una de las limitantes de usar un medio enriquecido únicamente con altos niveles de sacarosa 6 y 8% en la tuberización *in vitro*, es el prolongado tiempo que requiere para formar tubérculos *in vitro*, los medio semisólidos formulados pierden disponibilidad de nutrimentos y se desecan a los tres meses de iniciado la etapa de inducción a tuberización *in vitro*.

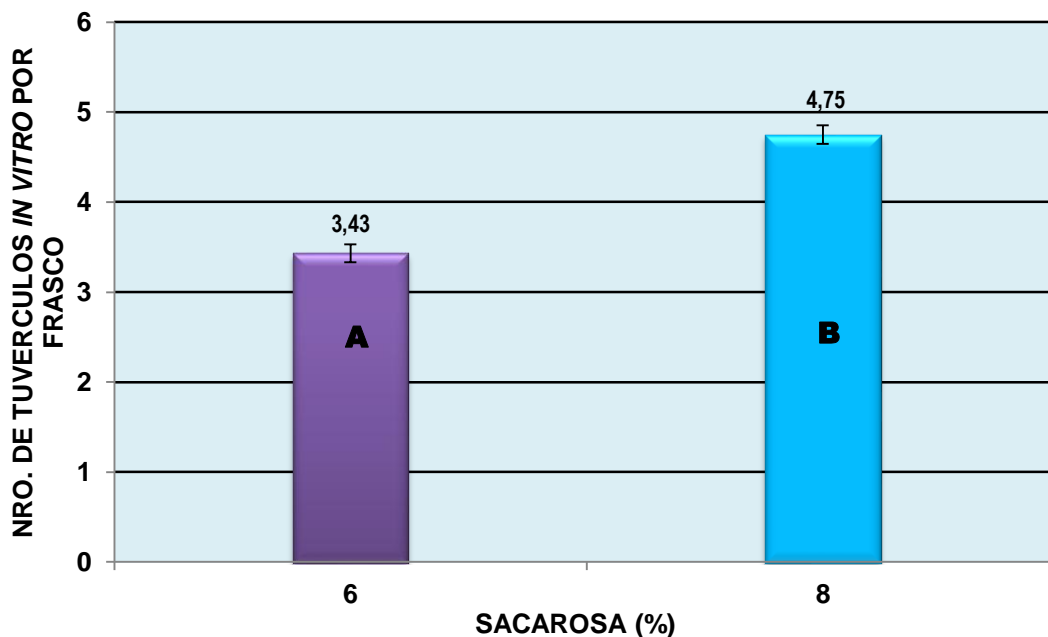


Figura 26. Prueba de promedios Duncan para número de tubérculos por frasco como efecto de niveles de sacarosa.

Al respecto Ibáñez (2000), indica que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de sacarosa y el número de formación de microtubérculos, en el que se aprecia que a mayor nivel de sacarosa, existe un mayor un número de microtubérculos formados, situación que puede deberse al efecto estresante que produce la sacarosa en el medio y por ende en la planta.

Morales (2006), demostró que la tuberización *in vitro* es altamente dependiente de la concentración de sacarosa y así mismo, demostró que en los medios con cantidades

pequeñas de sacarosa 1%, existen altos niveles de GA (inhibidor de la microtuberización) en las puntas de los estolones donde se forman los microtubérculos y en comparación con cantidades altas de sacarosa 8% el efecto es opuesto y por lo tanto la inducción de microtubérculos.

Pomar (2000), menciona que Okazawa reportó que trabajando bajo condiciones de esterilidad había obtenido tubérculos de papa y la formación de éstos parecía estar en relación con la concentración de sacarosa. Así mismo, indica que no había obtenido tubérculos *in vitro* a partir de las yemas apicales, pero sí de las yemas intercalares y la formación de los mismos tuvo relación inversa con la distancia de la yema apical.

Algunos autores han referido un doble papel de sacarosa en el desarrollo de microtubérculos. Además de ser una fuente de carbono adecuada y fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo del microtubérculo, la sacarosa, a una concentración de 80 g/l, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo (Kurhy y Moorby, 1995).

Para la variable de respuesta número de tubérculos *in vitro* por frasco, por efecto los niveles de concentración de BAP, la prueba de comparación de rango múltiple Duncan al 5% (Figura 27), establece cuatro estratificación, el primer grupo se compone por la concentración 2.5 mg/l de BAP que presenta el mayor promedio de número de tubérculos por frasco con un promedio general de 9.25 microtubérculos, seguida por la concentración 5 mg/l de BAP que ostenta una media de 4.85 microtubérculos por frasco; la tercera estratificación está representada por el nivel de concentración BAP 0 mg/l que expresa 1.75 microtubérculos por frascos respectivamente, finalmente con el nivel de concentración 10 mg/l de BAP en el medio de cultivo, se obtuvo 0.50 tubérculos *in vitro* por frasco.

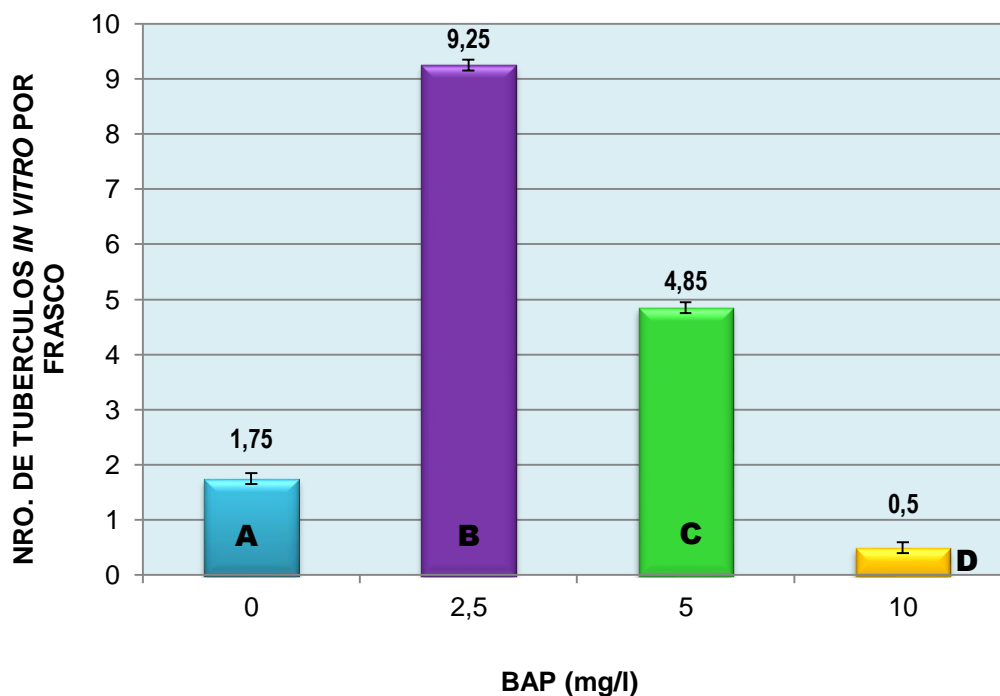


Figura 27. Prueba de promedios Duncan para número tubérculos por frasco como efecto del factor niveles de concentración de BAP.

Al respecto Pomar (2002), trabajando con tubérculos *in vitro* de papa explica que el BAP (Bencilaminopurina) tiene un efecto promovedor de tuberculillos, el cual es mayor en días cortos que en días largos. Si bien la tuberización es promovida menos efectiva por el CCC (cloruro de clorocolina) su aplicación refuerza los efectos del BAP induciendo a la formación temprana de tubérculos.

Además Pomar (2002), menciona que indujeron tubérculos *in vitro* en 22 genotipos de papa. Obtuvieron una mayor producción y peso en los tubérculos trabajando bajo condiciones de días cortos y bajas temperaturas que en días largos y temperaturas altas. La adición del BAP aumentó la producción bajo ambas condiciones. Así mismo, la oscuridad continua promovió la tuberización aunque tenían un menor número de ojos que aquellos producidos con luz.

Estrada *et al.* (1986) describen un método para la inducción de tubérculos *in vitro* de papa aplicable a un amplio rango de genotipos, estos tubérculos mostraron similitud con los producidos en campo. Utilizaron 5 mg/l de BAP + 500 mg/l de CCC + 80 g/l de

sacarosa en un medio MS (Murashige y Skoog) y en completa oscuridad. Indican que la dormancia de los tubérculos *in vitro* cuando son almacenados a 4°C es de 60 días si estos han sido inducidos bajo condiciones de días cortos, mientras que si fueron inducidos en completa oscuridad la dormancia fue de 210 días.

Se evaluó el efecto del 6 BAP en la tuberización *in vitro*, donde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Cuando se empleó la concentración de 1 mg/l, se logró mayor cantidad de microtubérculos, mientras que en los tratamientos con 3 y 5 mg/l se obtuvieron menor cantidad de microtubérculos (Montoya, 2008).

El mejor tratamiento inductor de tuberización, fue el tratamiento que contenía 5 mg/l de BAP + 500 mg/l de CCC y que permaneció en oscuridad después de las cuatro semanas de iniciación con cinco microtubérculos promedio por frasco (Jaramillo, 2003)

La figura 28, muestra la interacción entre niveles de concentración de sacarosa y BAP, para la variable de respuesta número de tubérculos *in vitro* por frasco, los tratamientos que expresaron mejores promedios son; el tratamiento 6 (8% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) con 10.9 tubérculos y el tratamiento 2 (6% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) con 7.6; consecuentemente el tratamiento 7 (8% sacarosa x 5 mg/l BAP) obtuvo 5.1, seguido por el tratamiento 3 (6% sacarosa x 5 mg/l BAP) que alcanzó 4.6 tubérculos *in vitro*. Los tratamientos que lograron menor número de tubérculos están establecidos por el tratamientos 5(8% sacarosa x 0 mg/l BAP) con 2.5, seguido por el tratamiento 1(6% sacarosa x 0 mg/l BAP) con un promedio general de 1, para los tratamiento 4 (6% sacarosa x 10 mg/l BAP) y tratamiento 8 (8% sacarosa x 10 mg/l BAP) se obtuvieron 0.5 tubérculos *in vitro*.

La aplicación de BAP en el medio de cultivo en su concentración 2.5 mg/l promueven eficientemente la formación de tubérculos *in vitro* en un medio enriquecido con altos niveles de sacarosa (6 y 8%), sin embargo la aplicación de concentraciones superiores a 5 mg/l promueve la formación de callos en la parte basal del explante. La formación de microtubérculos es promovida en yemas axilares y no así en las

yemas apicales, en un periodo de 3 meses, con un promedio de número de 1 a 3 tubérculos *in vitro* por planta.

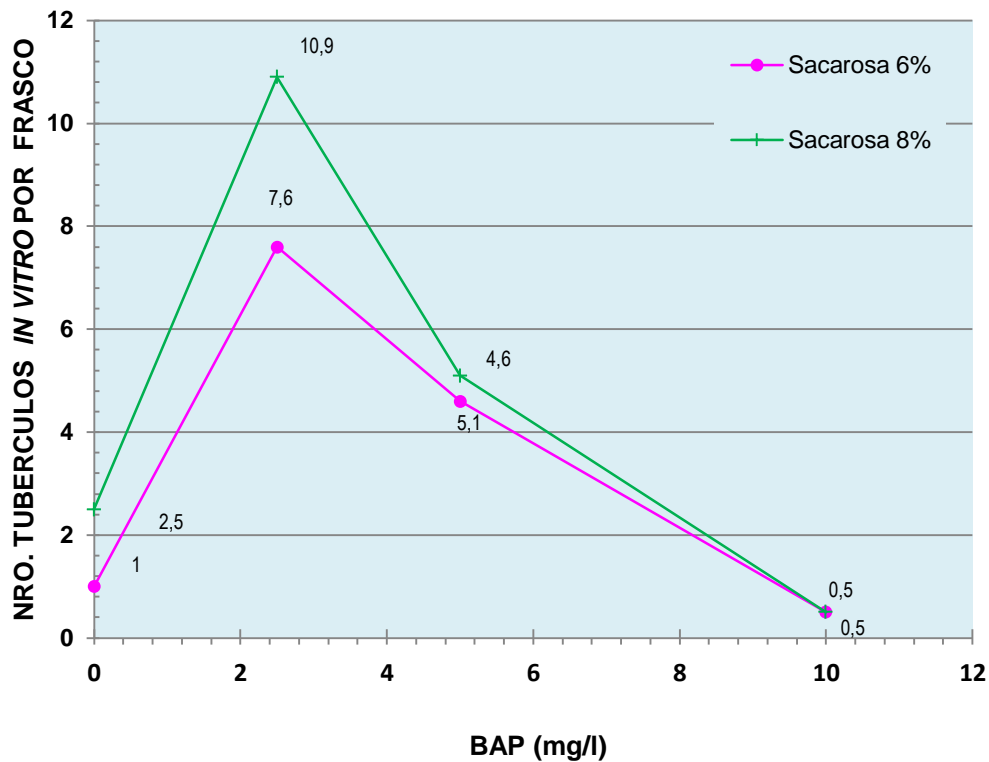


Figura 28. Variación de número de tubérculos *in vitro* en frascos por interacción de niveles sacarosa y BAP.

Al respecto Fuentes (s.f), las plántulas fueron capaces de producir microtubérculos en todos los tratamientos evaluados, después de diez semanas de incubación bajo condiciones de tuberización. La cinetina no mostró un efecto significativo desarrollo de los microtubérculos; sin embargo, la concentración de sacarosa si tuvo un efecto sobre el número de microtubérculos por frasco. La mayor producción de microtubérculos se obtuvo en los tratamientos con 8 % de sacarosa con una producción promedio de 1.0 a 1.16 microtubérculos por plántula.

Jara (2004), indica que se determinó que la respuesta de la microtuberización se encuentra fuertemente influenciada por el genotipo el fotoperíodo y la edad de la planta madre.

Morales (2006), indica que la promoción de la microtuberización es eficaz mediante una combinación de citocininas, sacarosa; días cortos y bajas temperaturas. Los resultados sobre la adición de cinetina al medio, mostraron un incremento en la producción de microtubérculos en los medios a una concentración de 2.5 mg/l y 8% sacarosa, después de los 60 días, en comparación con aquellos que no tienen esta hormona o con combinados con esta y con concentraciones bajas de sacarosa.

5.3.4 Diámetro de microtubérculos (Dti).

El Análisis de Varianza (ANVA), para la variable de respuesta diámetro de tubérculo *in vitro* (Cuadro 20), evidencia que no existe diferencias significativas ($P > 0.05$), entre los niveles de concentración de sacarosa, sin embargo se observan diferencias altamente significativa ($P < 0.01$) entre los niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP, en tanto para la interacción sacarosa por BAP, se observa efectos significativos ($P < 0.05$).

El Coeficiente de Variación CV es igual a 4.85%, indica que los datos son confiables y el manejo del experimento ha sido relativamente bueno, por encontrarse dentro del rango permitido para este tipo de estudio.

Cuadro 20. Análisis de varianza para diámetro de tubérculo *in vitro*.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	0.0035	0.0025	1.12	0.2945	NS
Niveles de concentración BAP	3	0.3868	0.1289	40.95	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	0.0272	0.0091	2.88	0.0419	*
Error Experimental	72	0.2267	0.0032			
TOTAL	79	0.6442				

CV=4.85%

NS= No Significativo; ** = Altamente Significativo, * = significativo.

La prueba de promedios Duncan a un nivel de significancia 5%, para la variable de respuesta diámetro de tubérculo *in vitro* (Figura 29), establece que no existen

diferencias significativas entre los niveles de concentración de sacarosa, el medio de cultivo formulado con 8% de sacarosa, ostento un promedio de 3.36 mm y el nivel de concentración 6% alcanzo un promedio de 3.34 mm de diámetro, siendo prácticamente similares.

Se asume que los niveles de concentración 6 y 8% de sacarosa, aplicados al medio de cultivo semisólido sin regulador de crecimiento, promueven la formación de tubérculos *in vitro* en explantes de la variedad Imilla Negra, sin embargo estas son de menor tamaño, escaso peso fresco y prorrogan mayor tiempo la formación de microtubérculos, en comparación de aquellos tratamientos combinados con el regulador de crecimiento BAP.

Reyes (2008), indica al respecto que se logró determinar que el medio de cultivo MS con 60 g/l y sin reguladores de crecimiento vegetal, se consiguió el mayor número de microtubérculos y con mayor volumen (diámetro). Debido a esto, se estima que para la microtuberización *in vitro*, las fitohormonas no aumentan de manera significativa el número de microtubérculos respecto al control.

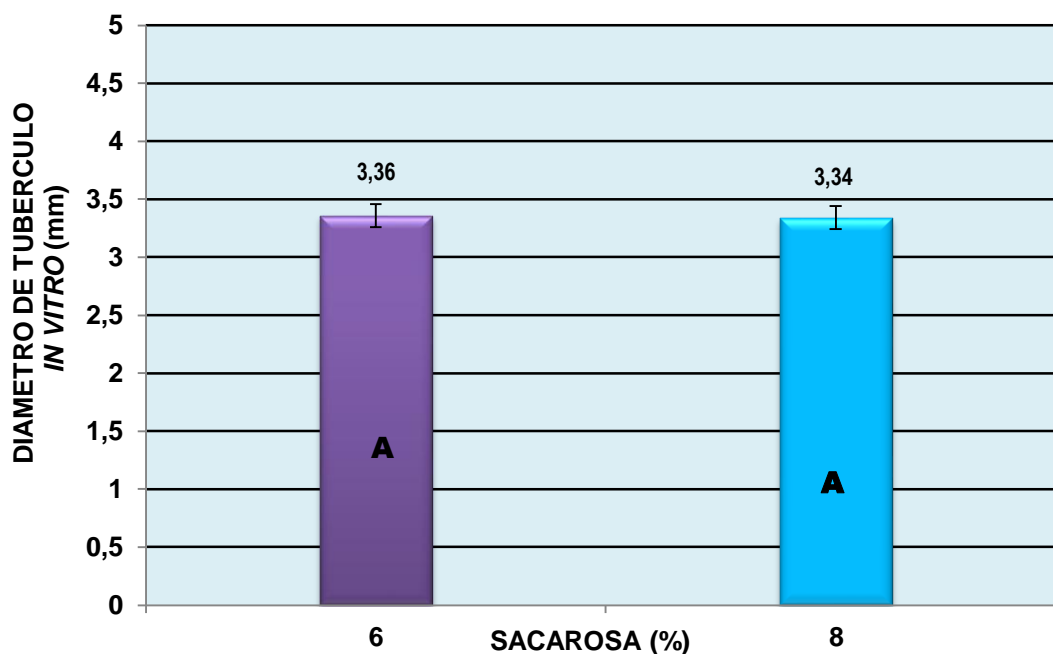


Figura 29. Prueba de promedio Duncan para diámetro de tubérculos *in vitro* por efecto de niveles de sacarosa.

La prueba de comparación de rango múltiple Duncan al nivel de significancia 5%, para la variable de respuesta diámetro de tubérculo *in vitro* (Figura 30), por efecto de los niveles de concentración de BAP, establece dos estratificaciones, el primer grupo se compone por las concentraciones 5 mg/l de BAP que presenta el mayor promedio de diámetro con 5.17 mm y seguida por la concentración 2.5 mg/l de BAP que ostenta una media de 5.07 mm siendo estadísticamente similares, el segundo grupo está dado por los niveles concentración 0 mg/l de BAP con un promedio de 2.23 mm y el medio formulado con 10 mg/l BAP obtuvo una media de 1.55 mm, siendo ambos los promedios más bajos en diámetro de tubérculos *in vitro*.

Brenes (2004), indica que fueron las concentraciones de 6-BAP entre 1 y 4 mg/l, las que más favorecieron la producción y el diámetro de los microtubérculos. Este efecto se vio favorecido por el fotoperíodo, ya que en general se incrementó el número y peso fresco de los microtubérculos en los tratamientos sometidos a condiciones día corto.

Jaramillo (2003), indica que el mejor tratamiento inductor de tuberización, fue el que contenía 5 mg/l de BAP + 500 mg/l de CCC y que permaneció en oscuridad después de las cuatro semanas de iniciación con cinco microtubérculos promedio por frasco. Al respecto indica Rivera (2008), según en investigaciones realizadas con *Solanum tuberosum* subespecie *andigena*, estas produjeron microtubérculos inferiores a 0.5 cm de diámetro.

Montoya (2008), menciona que el análisis en relación con el tamaño de los microtubérculos indica, con 1 mg/l de 6-BAP, el promedio de diámetro estuvo por encima de 0,8 cm, mientras que en los tratamientos con 3 y 5 mg/l los promedios de diámetro fueron más bajos respectivamente. La respuesta a la tuberización *in vitro* con el empleo de 6-BAP mostró que en la medida en que se disminuye la concentración, aumenta el número de microtubérculos.

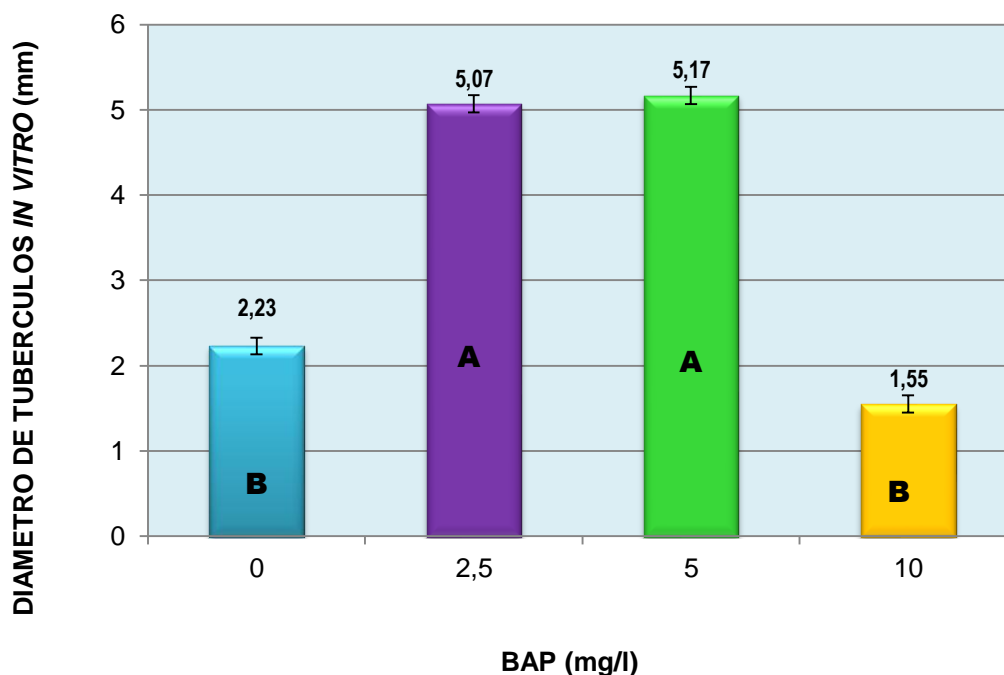


Figura 30. Prueba de promedios Duncan para diámetro de tubérculos *in vitro* por efecto de niveles sacarosa.

La figura 31, se observa el comportamiento de la interacción entre niveles de concentración de sacarosa y BAP, para la variable de respuesta diámetro de tubérculos *in vitro*, los tratamientos que expresaron mejores promedios son; el tratamiento 3 (6% sacarosa x 5 mg/l BAP) y el tratamiento 6 (8% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) con 5.7 mm de diámetro para ambos tratamientos; consecuentemente el tratamiento 7 (8% sacarosa x 5 mg/l BAP) obtuvo 4.6 mm, seguido por el tratamiento 2 (6% sacarosa x 2.5 mg/l BAP) que alcanzó 4.4 mm de diámetro. Los tratamientos que obtuvieron menor diámetro de tubérculos *in vitro* están establecidos por el tratamientos 1 (6% sacarosa x 0 mg/l BAP) con 2.6 mm, seguido por el tratamiento 4 (8% sacarosa x 0 mg/l BAP) con un promedio general de 1.9 mm, el tratamiento 5 (6% sacarosa x 10 mg/l BAP) y tratamiento 8 (8% sacarosa x 10 mg/l BAP) obtuvieron 0. 1.8 y 1.2 tubérculos *in vitro*.

La interacción niveles de sacarosa por niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP, establece que los medios de cultivo, enriquecido con altas concentraciones sacarosa de 6 y 8%, más la adición de BAP a una concentración de

2,5 mg/l favorece la obtención de tubérculos con mayor diámetro, asimismo se determino que medios de cultivos formulados con 5 mg/l de BAP, también lograron buenos promedios de diámetro, sin embargo se ha establecido que concentraciones superiores a la indicada producen la formación de callos

Al respecto indica Montoya (2008), en estudios se encontró que la adición de sacarosa al 8% produjo mayor cantidad de microtubérculos, y cuando se adicionó 6-bencil-amino-purina (6-BAP, 1,0 mg/l) mejoró la producción y el diámetro de los microtubérculos.

Al respecto Jaramillo (2003), indica que encontró trabajando con vitroplantas de accesiones andígenas, estas tuvieron mayor producción de microtubérculos inferiores a 0.5 cm , en un medio MS (100%), sacarosa (8%), 5 mg/l BAP, 500 mg/l CCC.

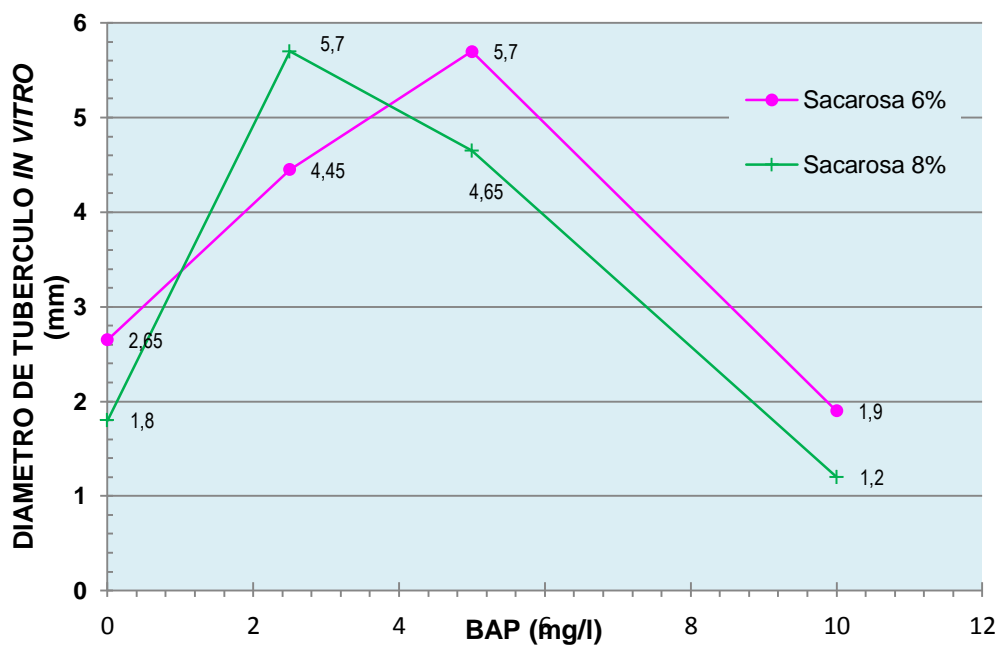


Figura 31. Variación del diámetro de tubérculos *in vitro* por interacción de niveles de sacarosa y BAP.

5.3.5 Peso fresco del tubérculo *in vitro* (Pft).

El Análisis de Varianza (ANVA), para la variable de respuesta peso fresco de microtubérculo (Cuadro 21), indica un coeficiente de variación de 26.26 %. Además se observa los efectos altamente significativos ($P < 0.01$), entre los factor de variación niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP, por el contrario para el factor niveles de concentración de sacarosa e interacción se observa que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$).

Cuadro 21. Análisis de varianza para peso fresco de microtubérculo *in vitro*.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	0.1066	0.1066	0.02	0.8832	NS
Niveles de concentración BAP	3	759.81	253.27	51.63	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	22.693	7.5639	1.54	0.2110	NS
Error Experimental	72	353.20	4.9056			
TOTAL	79	1135.8				

CV=26.26%

NS= No Significativo; ****** = Altamente Significativo, ***** = significativo

La prueba de rango múltiple Duncan al nivel de significancia 5% (Figura 32), muestra que no existe diferencias significativas entre las fuentes de variación niveles de concentración de sacarosa, los medios de cultivo enriquecido con altos niveles de sacarosa (6-8%), presentaron un peso promedio por tubérculo *in vitro* de 87,14 y 81,56 mg respectivamente.

Los resultados obtenidos en la investigación concuerdan y se aproximan a los rangos propuestos por Dodds *et al.* (1992), quien señala que para considerar a los tubérculos *in vitro* en un programa de multiplicación de semilla el tamaño del tubérculo debe fluctuar entre valores de 3 a 4 mm y el peso mayores de 45 a 50 mg respectivamente.

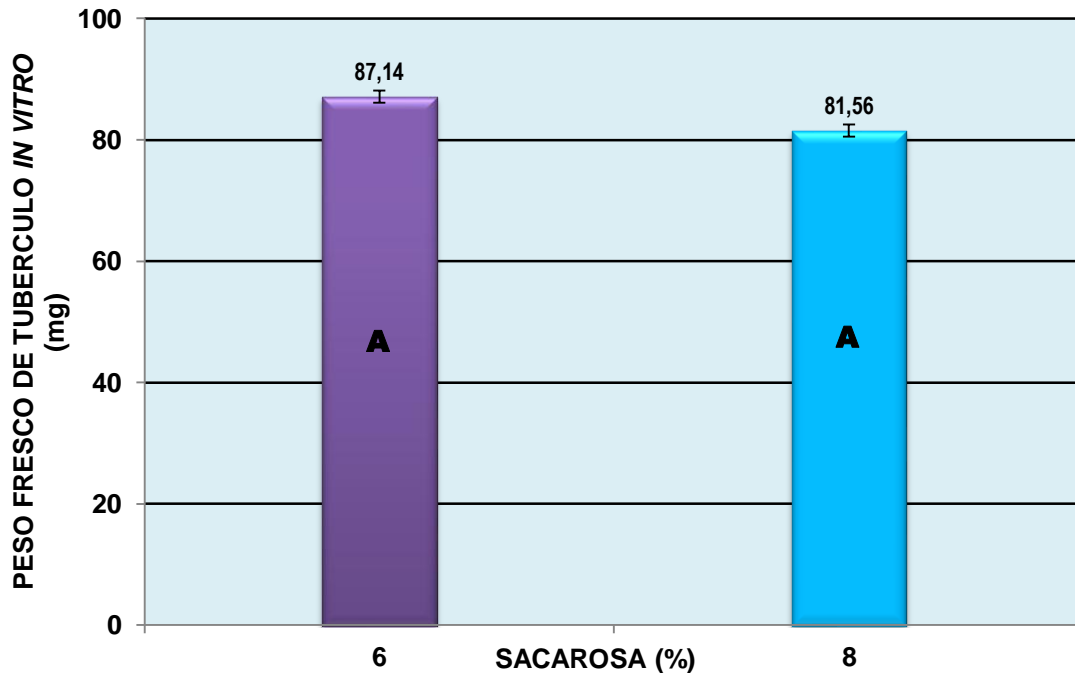


Figura 32. Prueba de promedio Duncan para peso fresco de tubérculos *in vitro* por efecto de niveles de sacarosa.

La prueba de promedio Duncan al nivel de significancia 5% (Figura 33), para peso fresco de tubérculo *in vitro* por efecto de los niveles de concentración de BAP, establece cuatro grupos, el medio de cultivo formulado con 2.5 mg/l de BAP alcanzó un peso fresco de 141.20 mg siendo el promedio más alto; mientras que la concentración al 5 mg/l de BAP obtuvo un 113.64 mg; seguido por el promedio de 57.77 mg a una concentración de 0 mg/l BAP y finalmente se observa un peso fresco de tubérculo *in vitro* de 24.77 mg a niveles de concentración de 10 mg/l de BAP, siendo el promedio más bajo.

Los datos obtenidos concuerdan con los expuestos por Jara (2004,) quien indica que la inducción de microtubérculos en medios sólidos adicionados con 5,0 mg/l de BAP, utilizando dos ciclos de luz, entregó microtubérculos con un calibre entre 1.8 a 3.7 mm y 11 - 28 mg de peso. Se determinó que la respuesta de la microtuberización se encuentra fuertemente influenciada por el genotipo, el fotoperíodo y la edad de la planta madre.

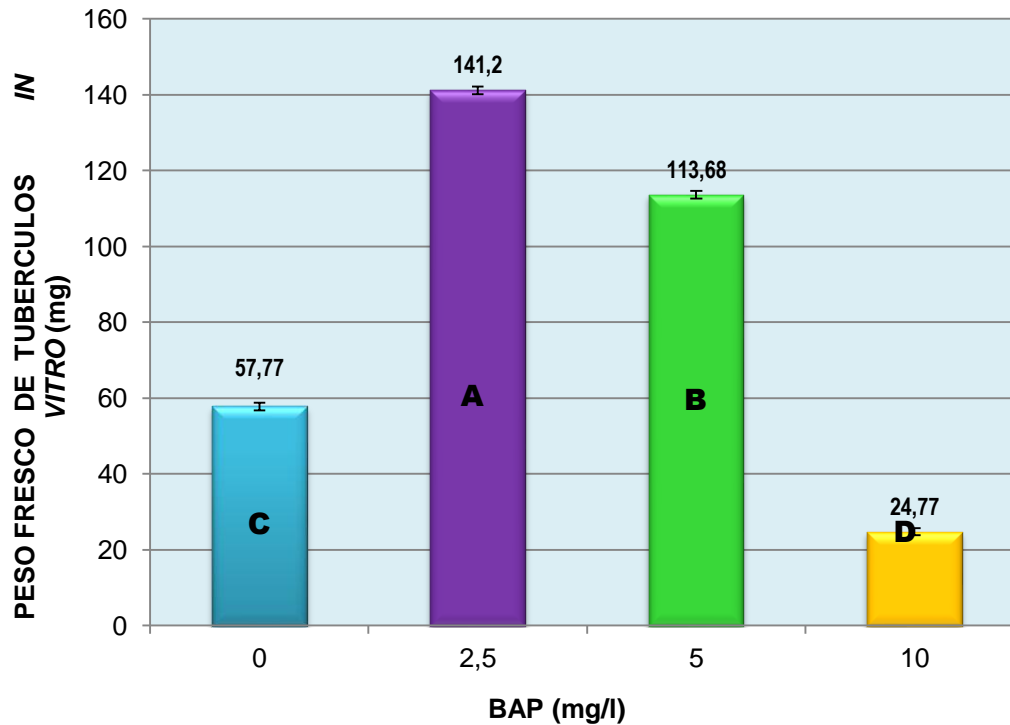


Figura 33. Prueba de promedios Duncan para peso fresco de tubérculos *in vitro* por efecto de niveles de BAP.

Al respecto Bremes (2004), en investigaciones realizadas el peso fresco microtubérculos se evaluó doce semanas después de inocular los segmentos nodales en el medio que contenía 6-BAP y sacarosa al 8%. Se observó un efecto positivo del 6-BAP sobre el número y peso de los microtubérculos en todos los tratamientos. Sin embargo, fueron las concentraciones de 6-BAP entre 1 y 4 mg/l las que más favorecieron la producción y el crecimiento de los microtubérculos. Este efecto se vio favorecido por el fotoperíodo, ya que en general se incrementó el número y peso fresco de los microtubérculos en los tratamientos sometidos a condiciones día corto.

5.3.6 Numero de raíces (Nr).

El cuadro 22, de análisis de varianza para numero de raíces en la etapa de inducción de tuberización *in vitro*, muestra efectos altamente significativos ($P < 0.01$) entre los niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP, además se establece que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los niveles de sacarosa; para la

interacción de factores de estudio se observa que no existe diferencias significativas ($P>0.05$).

El coeficiente de variación de 26.32%, es relativamente alto, sin embargo se encuentra dentro del parámetro permitido para este tipo de investigación, demostrando que los datos son confiables.

Cuadro 22. Análisis de varianza para número de raíces por vitroplanta.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Prob.	
Niveles de concentración Sacarosa	1	7.2000	7.2000	4.76	0.0325	*
Niveles de concentración BAP	3	240.45	80.150	52.94	0.0001	**
Interacción (sacarosa*BAP)	3	0.9000	0.3000	0.20	0.8973	NS
Error Experimental	72	109.00	1.5138			
TOTAL	79	357.55				

CV=26.32%

NS= No Significativo; ** = Altamente Significativo, * = significativo

La prueba de Duncan a un nivel de significancia 5% (Figura 34), muestra que existen diferencias en los números de raíces formados, con los dos niveles de concentración de sacarosa (6 y 8%), el medio de cultivo que contenía 6% de sacarosa obtuvo un promedio general de 4.97 raíces por vitroplanta, mientras tanto la concentración 8% de sacarosa expresó un promedio de 4.37 raíces por vitroplanta.

La sacarosa en sus niveles 6 y 8% aplicados al medio basal, sin regulador de crecimiento, favorece la abundante formación de raíces, además se observa que la aplicación al medio de cultivo del regulador de crecimiento BAP, limita el desarrollo de raíces promoviendo formaciones callosas en la parte basal.

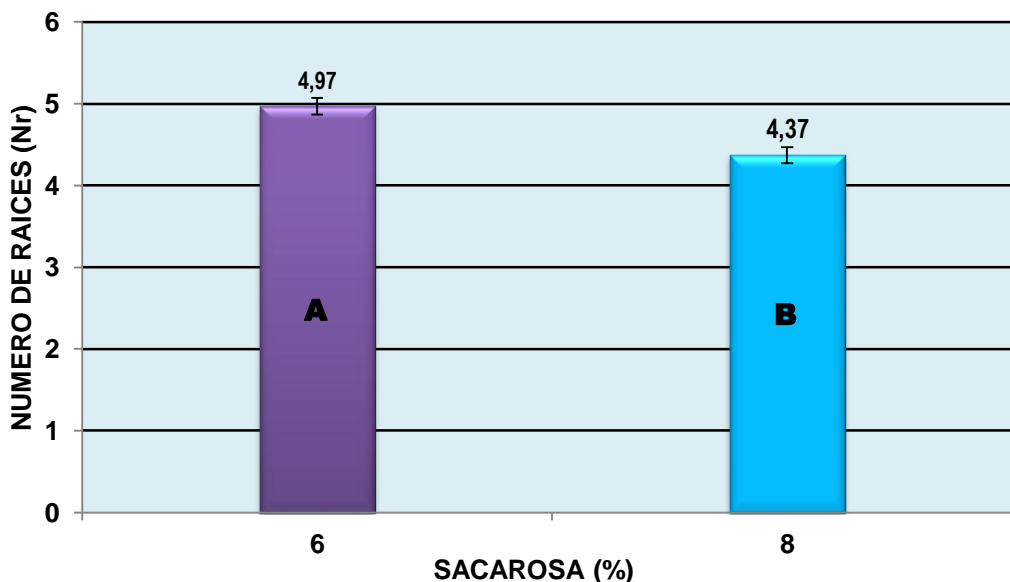


Figura 34. Prueba de promedio Duncan para número de raíces por efecto de niveles de sacarosa.

En la figura 35, según la prueba de Duncan (5%), se observa tres grupos estadísticamente diferentes, para la variable de estudio número de raíces por vitroplanta; donde en nivel de concentración del regulador de crecimiento BAP 0 mg/l obtuvo un promedio general de 6.65 raíces por cada vitroplanta, seguida por los niveles del regulador de crecimiento BAP 2.5 y 5 mg/l, que presentaron promedios generales de 5.3 y 4.85 raíces por vitroplantas respectivamente, por último el medio de cultivo formulado con BAP 10 mg/l, presentó 1.8 raíces por vitroplanta considerado el más bajo.

Para la variable de respuesta número de raíces por vitroplanta, existen diferencias considerables, según la formulación de medios de cultivo con regulador de crecimiento BAP en sus diferentes niveles de concentración. La tuberización *in vitro* fue favorecida por la formación de raíces, en medios de cultivos formulados con 2.5 y 5 mg/l de BAP. La ausencia de raíces no favorecen el proceso tuberización *in vitro*, esto se debe a la aplicación del regulador crecimiento BAP al medio de cultivo semisólido, en concentraciones superiores a 5 mg/l, que promueve la formación de callos en la parte basal de la vitroplanta.

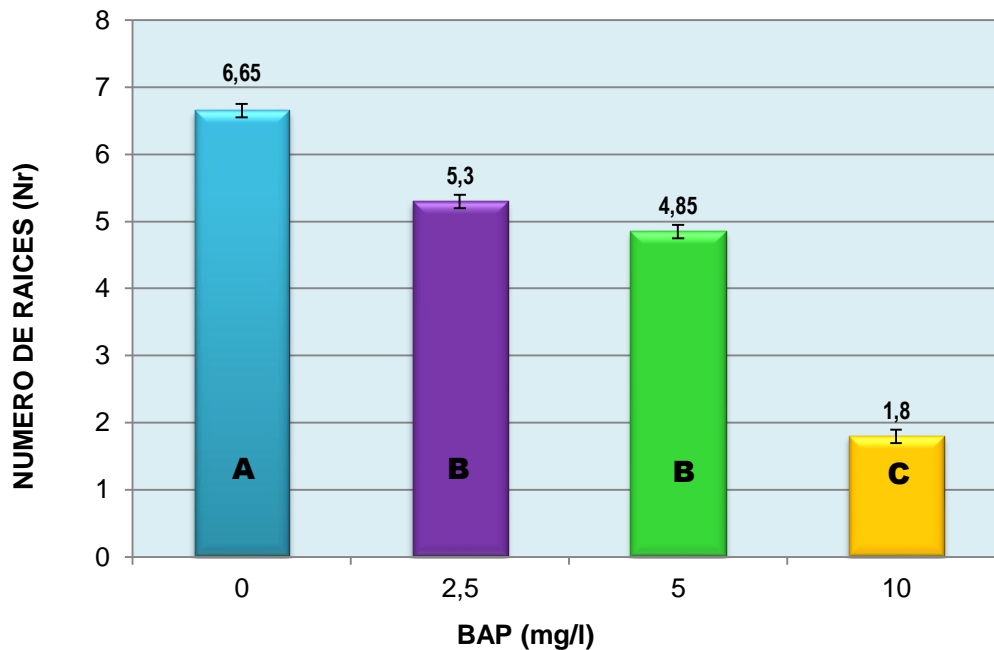


Figura 35. Prueba de promedios Duncan para numero de raíces por efecto de niveles de BAP.

Al respecto menciona Borda (2000), la formación de raíces varió dependiendo del medio de inducción; Cumarina, Daminozide y Kinetina indujeron el desarrollo de raíces en los segmentos nodales mientras que BAP/CCC no produjeron este efecto; asimismo se pudo observar una ligera formación callosa en la porción basal de éstos segmentos nodales, el inductor BAP/CCC no produjo raíces y formaron una ligera masa callosa en la parte distal del segmento nodal, se observó en este trabajo con BAP/CCC que a pesar de ser también una citoquininas inhibió el desarrollo de las raíces en medio sólido.

5.3.7 Grado de formación de callos (Gfc).

Para la variable de respuesta grado de formación de callos, existen diferencias considerables, según la aplicación de la concentración de regulador de crecimiento BAP.

La figura 36 muestra el grado de formación de callos en los diferentes tratamientos; T1 (6% de sacarosa x sin BAP), T2 (6% de sacarosa x 2.5 mg/l BAP) y T5 (8% de

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

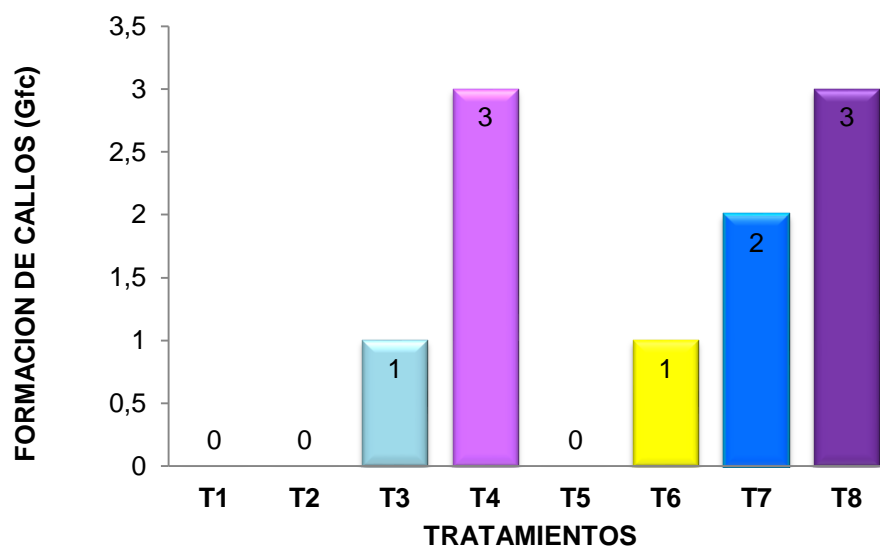


Figura 36. Grado de formación de callo de los diferentes tratamientos.

Se puede inferir que mientras se acrecienten los niveles de concentración de BAP, superior a 5 mg/l, en el medio de cultivo semí sólido se promueve la formación de callos en la parte basal de las vitroplanta.

Al respecto se menciona; cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo en las raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como los brotes, cuando la relación es intermedia se desarrollan tejidos de callos no diferenciados (Gómez, 1999).

5.4 Etapa IV Cosecha de microtubérculos *in vitro*.

A tres meses los microtubérculos fueron cosechados bajo condiciones asépticas retirando cada microtubérculo correspondiente a cada unidad experimental, para ello se elimino completamente el estolón con cortes de bisturí, los tubérculos *in vitro* se colocaron en placas petrí con papel absorbente y sellados con plastifilm.

Las placas petrí contenidas con microtubérculos fueron transferidos a refrigeración a 7 °C, sin embargo este procedimiento no fue optimo debido a que los microtubérculos sufrieron deshidratación, por tanto se opto por mantenerlos a condiciones de ambiente pero en completa oscuridad. Los microtubérculos que sufrieron mayor deshidratación fueron los que tuvieron menor desarrollo, tanto en peso, diámetro.

6. CONCLUSIONES.

Como resultado de la presente investigación, basado en la evaluación de diferentes niveles de concentración de sacarosa y BAP, en el proceso de tuberización *in vitro*, de acuerdo a resultados obtenidos y objetivos propuestos, se emite las siguientes conclusiones:

La variedad Imilla Negra expresa su totipotencia en un medio básico MS (sin reguladores de crecimiento), obteniendo un favorable desarrollo longitudinal, tanto para las etapas de establecimiento y micropropagación *in vitro*.

Existe un desarrollo longitudinal rápido de las vitroplantas de papa variedad Imilla Negra, durante las primeras dos semanas, debido a la disponibilidad de nutrimentos en el medio de cultivo semisólido, entre la tercera y cuarta semana la expansión longitudinal reduce considerablemente.

Las Vitroplantas de la variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), tiene gran capacidad producir tubérculos *in vitro*, en medios de cultivo MS enriquecido con altos niveles de sacarosa (6 y 8%), sin embargo estas se desarrollan en mayor tiempo y escaso tamaño.

El medio de cultivo MS formulado con el regulador de crecimiento BAP (2.5 mg/l) promueven la tuberización *in vitro*, pero niveles de concentración del regulador de crecimiento BAP (5 y 10 mg/l), producen la formación de callos en la parte basal de la vitroplanta, afectado la formación del sistema radicular.

La combinación de 8 % de sacarosa y 2,5 mg/l BAP (Tratamiento 6), resulto el mejor inductor de tuberización para vitroplantas de la variedad Imilla Negra (*Solanum tuberosum* ssp *andigena*), obteniendo un promedio de 10,90 tubérculos *in vitro* por frasco con 5.7 mm de diámetro.

El medio semisólido presenta limitaciones en la formulación de medios de inducción a tuberización *in vitro*, debido a la evaporación, desecación y disponibilidad de los nutrimentos.

La combinación de fotoperiodos favorece la microtuberización *in vitro*, debido a que la variedad Imilla Negra pertenece a *Solanum tuberosum* ssp *andigena* y esta es favorecida por días cortos.

La formación de tubérculos *in vitro*, es promovida en las yemas axilares de la vitroplantas y no así en las yemas apicales.

El almacenamiento de tubérculos *in vitro* en placas petrí y refrigeración, provocó la deshidratación, por tanto se deben almacenar en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente.

7. RECOMENDACIONES

En base a la combinación óptima de sacarosa y BAP (8% x 2, 5 mg/l BAP), se debe realizar pruebas de tuberización *in vitro*, con otras variedades de papas cultivadas nativas y silvestres.

Realizar estudios de inducción a tuberización *in vitro* en diferentes tipos de medios de cultivo (semisólido, líquido, semisólido-líquido), además se debe probar otros sistemas tales cultivos en agitación, birreactores o sistemas de inmersión temporal.

Realizar estudios sobre la influencia del fotoperiodos y temperaturas, sobre la tuberización *in vitro*.

Probar reguladores de crecimiento como citocininas (Kinetina) y otros inhibidores de ácido giberélico como el CCC en la tuberización *in vitro*.

El corte de puntas o meristemos apicales de la vitroplantas puede ser considerado como sistema mecánico, para inducción de tuberización *in vitro*.

Realizar estudios del medio de cultivo suplementado únicamente con sacarosa superiores al 3% en combinación de fotoperiodos de días cortos o escaso y bajas temperaturas.

Realizar pruebas de viabilidad de los microtubérculos *in vitro*, tanto en laboratorio y campo.

Realizar estudios sobre el almacenamiento y conservación de tubérculos *in vitro*, con la finalidad de mantenerlos viables.

Establecer el tiempo que los tubérculos *in vitro* se mantienen viables para su uso.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ascon B. y Talon. (1993), Fisiología vegetal de biología, Universidad de Barcelona– España.

Barba, A., 2001. Micropropagación de Plantas. Primera edición. México. Trillas. p.107.

Borda, C. 2000. Efecto de inductores de tuberización y fotoperiodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *IN VITRO*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cipotato.org>.(accedido 10 mayo 2010). CIP, Perú.

Bouzo, A. C. s.f. Cultivo de la papa en Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional del Litoral. [En línea]. Disponible en: <http://www.ecofisiohort.com.ar/wp-content/uploads/2009/04/cultivo-de-papa-en-argentina.pdf>. (Accedido 15 octubre 2012). Argentina.

Brenes, A. (2004). Efecto del ácido jásmonico, el 6-BAP y el fotoperíodo sobre la microtuberización in vitro de dos variedades de papa. Suplemento revista latinoamericana de la papa. [En línea]. Disponible en: http://www.conpapa.org.mx/files/congress/2012/technical_scientific/produccion_in_vitro_microtuberculos_papa_cv_alpha.pdf. (Accedido 20 agosto 2011). México.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. A. Abdelnour; J. Vincent (Eds.). Costa Rica. p. 30.

CIAT (Centro Internacional de Agronomía Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. M. W. Roca; L. A. Mroginski, (Eds.) Cali, Colombia. p. 970.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 2001. Perspectivas tecnológicas en el uso del germoplasma de papas nativas, Eds. M. Moral. Departamento de Capacitación y Comunicaciones CIP, Lima, Perú. p. 36-37.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1998. Manual de capacitación cultivo de tejidos manejo de plántulas *in vitro* en la producción semilla de papa.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1997. Tuberización, tamaño de la semilla y corte de los tubérculos. Departamento de Capacitación y Comunicaciones CIP, Lima, Perú, 19 p.

Choque, M. J. 2009. Evaluación de embriones de haba (*Vicia faba L.*) en diferentes medios de cultivo *in vitro* y efectos de sustratos, para la obtención de semilla de alta calidad. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de san Andrés. La Paz, Bolivia. 105 p.

CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). 2000. Manual Técnico Manejo integrado del cultivo de la papa. Produmedios. Bogotá, Colombia. 78p.

Dodds, J.H; Silva Rodriguez, D. Y Tovar, P. 1992. Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum L.*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. [En línea]. Disponible en: http://www.conpapa.org.mx/files/congress/2012/technical_scientific/produccion_in_vitro_microtuberculos_papa_cv_alpha.pdf. (Accedido 20 agosto 2011). México.

Egúsquiza B, R. 2000. La papa producción, transformación y comercialización. Lima, Perú. Cimagraf.

- Estrada R,N. 2005.** La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa, Centro de información para el desarrollo – CID. La Paz, Bolivia. 53 p.
- Estrada, R; Tovar, P; Dodds, J. 1986.** Inducción of in Vitro Tubers in a Broad Range of Potato Genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 7. p 3 – 10.
- Estrella E, J. 1990.** Producción de Microtubérculos *in vitro* de Tres Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004.** Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación.
- Fuentes, G. C. s.f.** Producción in vitro de microtubérculos de papa cv. Alpha. Facultad de ciencias Químico - Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. [En línea]. Disponible en: http://www.conpapa.org.mx/files/congress/2012/technical_scientific/produccion_in_vitro_microtuberculos_papa_cv_alpha.pdf. (Accedido 20 agosto 2011). México.
- Gopal, J; Minocha, L; Dhaliwal, S. 1998.** Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant cell Reports*, 17. p. 794-798.
- Gómez, K. R., 1999.** Cultivo *in vitro*. En curso de Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de las plantas y en la producción de semillas. Modulo 1.p.102.
- Gutiérrez, Q. D. 2009.** Comportamiento morfológico y conservación *in vitro* de diez genotipos comerciales de papa (*Solanum sp.*)Procedentes de las provincias: Aroma, Ingavi y los Andes. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de san Andrés. La Paz, Bolivia. 73 p.

- Herrera, J. Alizaga; R. Guevara; E. Jiménez, V. (2006).** Geminación y crecimiento de la plantas. E. Villalobos (Eds.). Universidad de Costa Rica. San José. p. 83-84.
- Hurtado, D. y Merino, M., 1997.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Tercera reimpresión. México, D.F. Editorial Trillas 225p.
- Hussey, G; Stancey, N. 1984.** Factors Affecting the Formation of In vitro Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* 53. p. 565-578.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2010.** Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Levitus, G. Echenique, V. Rubinstein, C. Hoop, E. Mroginski L. (Eds.). Argentina. 643 p.
- Jara, M. 2004.** Microtuberización de cultivares comerciales de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes. Suplemento revista latinoamericana de la papa. [En línea]. Disponible en. (Accedido 10 septiembre 2012). Chile.
- Jaramillo, A. 2003,** Microtuberización *In Vitro* de cuatro variedades de papa. (*Solanum tuberosum* L). [En línea]. Disponible en: <http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/ecologia/microtuber.pdf>. (Accedido 10 mayo 2010). México.
- Koda, Y; Okasawa, Y. 1983.** Influences of Environmental, Hormonal and Nutritional Factors on Potato Tuberization *in vitro*. *Japan. Jour. Crop Sci.* [En línea]. Disponible en: <http://mitochon.gs.dna.affrc.go.jp:81/csdb/jc/jc52/52582.pdf>. (Accedido 10 mayo 2010). Japón.
- Khuri, S; Moorby (1995).** Investigation into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Ann Bot* 75:295-303.

López, P., 1990. Medios de Cultivo: Fundamento Teórico-Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales. Estudio de la F.A.O. (Organización de Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación). (Rosell y Villalobos). Roma, Italia. p. 15-16.

Lugo, G. (2009). Efecto del intercambio gaseoso sobre el crecimiento y tuberización de vitroplantas de papa. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado. [En línea]. Disponible en: <http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/julioseptiembre2009/v26n3a2009325339.pdf>. (Accedido 10 septiembre 2012). Venezuela.

Marza M, F. s.f. Biotecnología vegetal. Universidad Mayor de San Andrés – Facultad de Agronomía. s.p.

Mejía, R. 1998. Cultivo *in vitro* de plantas de papa, Manual de Laboratorio, Programa de investigación en papa, Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. Año 1/Nº 1, Perú.

Mendoza, V., H. 2007. Biotecnología Vegetal y su Aplicación en la Agricultura. Primera Edición, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. Bolivia. p.35.

Monroy Q, 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 Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de san Andrés. La Paz, Bolivia. 149 p.

Montaldo, A. (1984). Cultivo y mejoramiento de la papa. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola IICA. San José de Costa Rica. 706 p.

- Montoya P,N. (2008).** Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum L.*), variedad Diacol Capiro, en birreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. Universidad Católica de Oriente. [En línea]. Disponible en: <http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/julioseptiembre2009/v26n3a2009325339.pdf>. (Accedido 10 septiembre 2012). Venezuela.
- Morales D, F. (2006).** Transformación genética de plantas de papa (*Solanum tuberosum L.*) con el gen que codifica para el inhibidor de cisteín proteinasas de origen humano; cistatina c. Tesis de Doctorado. Área de Biotecnología, Universidad de Colima. México.
- Ochoa M, C. 1990.** Las papas de Sudamérica Bolivia. Dr. D. Ugant (Trads). Cambridge University. Plural editores/CID. p. 400-465.
- Ovando M, I. (s.f.).** Manual de tejidos vegetales para ingenieros biotecnólogos, . [En línea]. Disponible en: <http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/julioseptiembre2009/v26n3a2009325339.pdf>. (Accedido 10 septiembre 2012). Venezuela.
- Ovidi, A.; Mamani, P. 2001.** Características de la cadena alimentaria de la Papa y su industrialización en Bolivia. Proyecto papa andina (CIP- COSUDE), Fundación PROINPA. Cochabamba-Bolivia. p. 15-25.
- Parsons M, D. (2003).** Papas, Manual para la educación agropecuaria serie producción vegetal N°17. México. Trillas. p. 10-11.
- Pérez, P. 1998.** Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. 400p.

- Pierik, R., 1990.** Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. España. 326 p.
- Pomar V, G. 2002.** Tuberización *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol. “Oca” como una alternativa para la producción de tubérculos semilla. Tesis de grado. Universidad nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú .117p.
- Pozo C, M. 1999.** Tuberización, tamaño de la semilla y corte de tubérculos. O, Hidalgo (Eds.). Centro Internacional de la Papa (CIP). Manual de Capacitación. Lima, Perú. Fascículo 2.3.
- Quispe C, E. 2009.** Evaluación agronómica de tres genotipos de vitroplantas de papa nativa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* L.) bajo tres diferentes sustratos hidropónicos para la producción de semilla pre-básica en invernadero. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de san Andrés. La Paz, Bolivia. 79 p.
- Reyes C,M. 2008.** Microtuberización in vitro de la papita de monte (*Solanum cardiophyllum*), Unidad Académica Agronomía-Universidad Autónoma de Zacatecas. [En línea]. Disponible en: buscar (Accedido 10 septiembre 2012). Venezuela.
- Roca, W y Mroginski 1991.** Cultivo de tejidos en la agricultura CIAT s. e. Colombia. 970p.
- Rodríguez, M. 1999.** Morfología y Anatomía Vegetal Ed. 3° Rev. Los Amigos del Libro Cochabamba Bolivia. 514p.
- Smith, O.E.; y Palmer, C.E. 1970.** Cytokinin-Induced Tuber Formation on Stolons of *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, Vol. 23. p. 599-606.

Sandoval, J., 2001. Biotecnología aplicada para la micropropagación de banano y plátano. Manual Básico. P. 28.

Toledo, J; Espinoza, N; Golmirzaie, A. 1998. Cultivo de tejidos manejo de *in vitro* en la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Manual de capacitación. Lima, Perú. 46 p.

Ugarte, ML; Iriarte V. 2005. Papas bolivianas catalogo de cien variedades nativas. Cochabamba, Bolivia. Polygraf.

Weaver, J., 1996. Reguladores del crecimiento de las plantas en La Agricultura. Reimpresión. México. Trillas. p. 622.

ANEXOS

ANEXO N° 1. Componentes de las soluciones stock para medio MS al 100%.

Solución A Macronutrientes para 10 l de medio.

Reactivos	Fórmula	Concentración	Fórmula	Concentración
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	16500 mg		
Nitrato de potasio	KNO_3	19000 mg		
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	1700 mg		
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3700 mg	MgSO_4	1807 mg

Solución B Micronutrientes para 10 l de medio.

Reactivos	Fórmula	Concentración	Fórmula	Concentración
Yoduro de Potasio	KI	8,3 ml		
Acido bórico	H_3BO_3	62 mg		
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223 mg	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169 mg
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	86 mg		
Molibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 ml		
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 ml		
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 ml		

Solución C – Cloruro de Calcio para 10 l de Medio.

Reactivos	Fórmula	Concentración	Fórmula	Concentración
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	CaCl_2	332,2

Solución D – Quelatos de hierro para 10 l de Medio

Reactivos	Fórmula	Concentración	Fórmula	Concentración
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278 mg		
EDTA Disódico	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372,6 mg		

Solución E – Vitaminas y Aminoácidos para 10 l de Medio

Reactivos	Fórmula	Concentración
Tiamina -HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_5\text{HCl}$	1 ml
Piridoxina - HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	5 ml
Ácido Nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	5 ml
Myo-inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1000 ml
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	20 ml

ANEXO N° 2. Preparación de soluciones stock para el medio Murashige y Skoog (1962) para cultivo de tejidos.

La preparación de soluciones stock y medios de cultivo son fundamentales para el cultivo de tejidos vegetales por lo que este trabajo debe realizarse con precisión.

Preparación de soluciones stock para el Medio Murashige y Skoog 10 l. Todos los reactivos descritos en el anexo 1, son empleados en la preparación de soluciones stock para litros de medio de cultivo.

Metodología para la preparación de cada solución Stock.

Solución A: Macronutrientes

Se debe pesar en una balanza de precisión uno a uno todos reactivos de la lista mencionada. Luego en un vaso de precipitado se debe colocar 50 ml de agua destilada previamente esterilizada. En el vaso de precipitado se debe añadir uno a uno los reactivos esperando a que se disuelva por completo en el agua cada uno de ellos antes de agregar el siguiente reactivo.

Solución B: Micronutrientes

Los reactivos yoduro de potasio, molibdato de sodio, sulfato de cobre y cloruro de cobalto deben prepararse en soluciones uno a uno de forma separada. Por ejemplo se pueden pesar 50 mg de cada reactivo y diluirlo en 50 ml de agua destilada previamente esterilizada.

El ácido bórico, Sulfato de manganeso y Sulfato de zinc deben ser pesados y diluidos uno a uno en 50 ml de agua destilada previamente esterilizada, a esta solución agregar alícuotas de los 4 reactivos previamente diluidos según las proporciones que se indica para 10 l de Medio de Cultivo. Una vez añadidos los 7 reactivos a la solución, esta debe completarse a 100 ml con agua destilada previamente esterilizada. Rotular el frasco previamente autoclavado con la Proporción de uso Ej. 100 ml → 10 l.

Solución C: Cloruro de Calcio

Se debe pesar y diluir en 10 ml de agua destilada esterilizada. Rotular el frasco previamente autoclavado con la porción de uso Ej. 100 ml →10 l.

Solución D: Quelatos de hierro

Pesar Sulfato ferroso y EDTA disódico. Luego en vaso de precipitado se debe colocar 50 ml de agua destilada previamente esterilizada. Anadir cada uno de los reactivos separadamente esperando a que se disuelva por completo en el agua. La solución debe complementarse a 10 ml con agua destilada. Rotular el frasco ámbar previamente autoclavado con la porción de uso Ej. 100 ml →10 l.

Solución E: Vitaminas y Aminoácidos

Los reactivos tiamina, piridoxina, ácido nicotínico y glicina deben prepararse en soluciones uno a uno de forma separada. Por Ej. Se puede pesar 50 mg de cada reactivo y diluir en 50 ml de agua destilada estéril. De esta forma se extraerá alícuotas de cada solución para preparar la solución stock de vitaminas y aminoácidos completando a 10 ml con agua destilada previamente esterilizada. Rotular el frasco ámbar previamente autoclavado con la porción de uso Ej. 100ml → 10 l. las soluciones preparadas por separado deben ser debidamente rotuladas y conservadas bajo refrigeración en frasco ámbar.

ANEXO Nº 3. Preparación del medio de introducción condiciones *in vitro*.

1. Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) en 600 ml.
2. agregar 3 de sacarosa (azúcar comercial) agitar.
3. enrazar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir el pH y ajustar a 5.7(elevar con KOH 1N, bajar con HCL 1N)
5. Agregar 3.5 de agar.
6. Disolver el agente gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos), agitar hasta que el agente gelificante se disuelva, evitando que hierva.
7. Distribuir 3 ml en cada tubo de ensayo de 14x100 mm.
8. Esterilizar por autoclave a 121 °C y 15 libras de presión, por un lapso de 15 minutos.
9. Retirar la bolsa contenida de medio de cultivo y conservar en refrigeración.

ANEXO Nº 4. Preparación del regulador de crecimiento bencilaminopurina (bap).

Solución concentrada de BAP:

1. Pesar 50 mg de BAP y disolver bien con algunas gotas de NaOH 1N.
2. Añadir 50 ml de agua destilada.
3. Guardar en un frasco ámbar debidamente rotulado y conservar en refrigeración.

BAP puede ser autoclavado junto con el medio de cultivo, sin embargo, es posible que pierda actividad.

USO: Un **ml** de la solución concentrada contiene un **mg** reactivo.

ANEXO Nº 5. Medios de tuberización *in vitro*.

MÉTODO PROPUESTO POR EL CIP

1. Disolver un sobre de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 80 g de sucrosa, 5 ml de BAP y 500 mg de CCC. Agitar.
3. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir pH y ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1N, bajar con CHI 1N)
5. Repartir en botellas.
6. Autoclavar a 121 °C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
7. Retirar las botellas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la inducción.

*Uso opcional de acuerdo al genotipo.

ANEXO Nº 6. Desinfección superficial de explantes de brotes para la variedad imilla negra.

Compuesto químico	Concentración	tiempo
Etanol (alcohol)	70%	Inmersión rápida
NaOCl (hipoclorito de sodio)	2%	9-10 minutos

Lavar los explantes de brotes con agua corriente, con la finalidad de eliminar restos de materia orgánica.

Seccionar los brotes en tamaños de 6 cm.

Introducir los brotes en etanol al 70%, simple inmersión.

Sumergir los explantes en NaOCl al 2% por un tiempo de 9-10 minutos.

Realizar tres enjuagues sucesivos, preferiblemente en agitación con el propósito de eliminar restos de los compuestos químicos.

Retirar los explantes a una placa petrí y seccionar los segmentos uninodales.

ANEXO Nº 7. Frasco de cultivo con medio de inducción a tuberización *in vitro*.



ANEXO Nº 8. Desarrollo de vitroplantas.



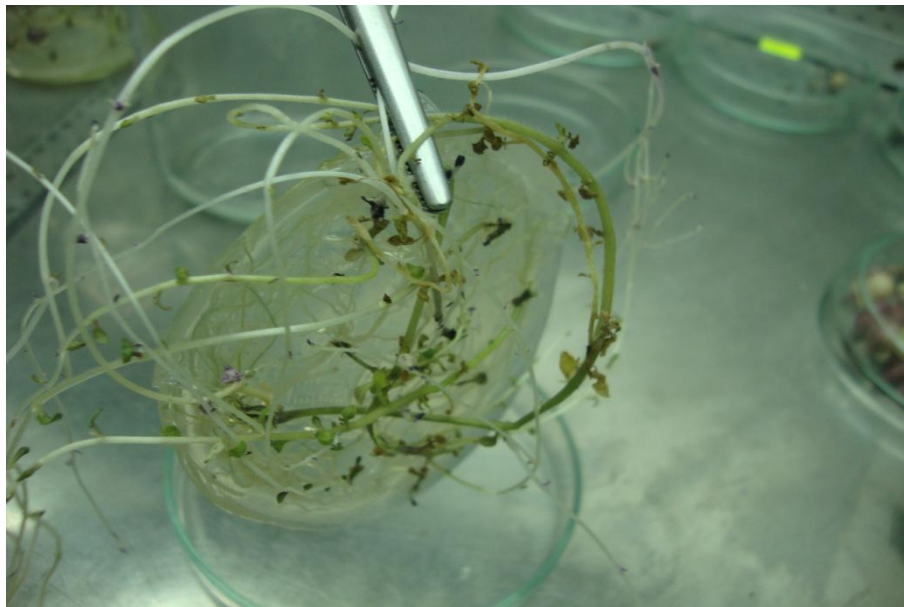
ANEXO Nº 9. Numero de tubérculos *in vitro* por frascos.



ANEXO Nº 10. Formación de callos en la parte basal de las vitroplantas.



ANEXO Nº 11. Deseccación del medio de cultivo semí-sólido a tres meses en la etapa de inducción a tuberización *in vitro*.



ANEXO Nº 12. Formación de microtubérculo.



ANEXO Nº 13. Escaso desarrollo longitudinal y formación de callos, efecto de BAP a un nivel de concentración de 10mg/l.



ANEXO Nº 14. Efecto de aplicación de BAP superiores a 5 mg/l, en medios de cultivo.



ANEXO Nº 15. Escasa formación de raíces por las vitroplantas.



ANEXO Nº 16. Microtubérculos *in vitro* cosechados.



ANEXO Nº 17. Preparación de medios de cultivo.



ANEXO Nº 18. Irradiación de materiales e instrumental con rayos ultra violeta (uv).

