

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



TESIS DE GRADO

**EFFECTO DE TRES TIPOS DE EXPLANTES EN EL DESARROLLO DE
OLLUCO (*Ullucus tuberosus* Loz.) EN CONDICIONES *IN VITRO***

Emma Yana Ali

La Paz- Bolivia

2012

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

**EFFECTO DE TRES TIPOS DE EXPLANTES EN EL DESARROLLO DE
OLLUCO (*Ullucus tuberosus* Loz.) EN CONDICIONES *IN VITRO***

Tesis de grado presentado como requisito
parcial para optar el título de
Ingeniero Agrónomo

Emma YANA ALI

Asesor:

Ph. D. Félix Marza Mamani

.....

Tribunal calificador:

Ing. Félix Rojas Ponce

.....

Ing. Rafael Murillo García

.....

Ing. Víctor Hugo Ledezma Vera

.....

APROBADA

Presidente:

Tribunal examinador

.....

2012

2

DEDICATORIA

A mi mama Juana Ali Rojas quien con su apoyo y cariño estuvo siempre a mi lado dándome ánimos para seguir adelante.

A DIOS por darme la vida, sabiduría, y las fuerzas para recorrer un camino con cada etapa, como la culminación de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento:

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, por abrirme sus puertas, y sus docentes por las enseñanzas y formación profesional impartida.

A Dios Nuestro Padre, por su infinita providencia y permitirme llegar al término de este ciclo de profesionalización.

Un especial agradecimiento a mi asesor Dr. Felix Marza de quien he recibido su valiosa orientación teórica y metodológica, así como el asesoramiento, sugerencia, revisión y corrección en la realización y redacción del presente documento.

Al Tribunal de Revisores: Ing. Félix Rojas Ponce, Ing. Rafael Murillo e Ing. Víctor Hugo Ledezma Vera, por las observaciones y sugerencias realizadas.

A toda mi familia Yana, Ali en especial a: mis padres Francisco Yana y Juana Ali, mi hermano Oscar por su cooperación y apoyo incondicional que me han brindado.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii

	Pág.
I. INTRODUCCION.....	13
II. OBJETIVOS	15
<hr/>	
II.1. Objetivo general	15
II.2. Objetivos específicos	15
II.3. Hipótesis.....	15
III. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	16
<hr/>	
III.1. El cultivo de Olluco (<i>Ullucus tuberosus</i> Loz.)	16
III.1.1. Origen	16
III.1.2. Descripción Botánica	16
III.1.3. Descripción Morfológica.....	17
III.1.4. Variedades	20
III.1.5. Situación de la producción de Olluco en Bolivia	20
III.1.6. Valor nutricional del cultivo de olluco.....	21
III.1.7. Uso e importancia económica del cultivo de Olluco	21
III.1.8. Factores que favorecen la producción del Olluco.....	24
III.1.9. Factores limitantes del cultivo de Olluco.....	24
III.2. Cultivo <i>in vitro</i>	25
III.2.1. Métodos de propagación vegetativa <i>in vitro</i>	26
III.2.2. Factores que afectan la propagación vegetativa <i>in vitro</i>	27
III.2.3. Medios de cultivo	32

III.2.4. Condiciones ambientales para la incubación.....	33
III.2.5. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i>	34
III.3. Vitroplanta	35
III.3.1. Crecimiento y desarrollo	35
III.4. Cultivo <i>in vitro</i> de Olluco.....	36
III.5. Conservación <i>in vitro</i> de Olluco.....	37
IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	39
IV.1. Localización del Experimento.....	39
IV.2. Material Experimental.....	40
IV.2.1. Material Vegetal	40
IV.2.2. Materiales de Laboratorio	40
IV.3. Metodología.....	41
IV.4. Análisis estadístico.....	46
IV.4.1. Modelo lineal aditivo.....	46
IV.4.2. Variables de respuesta	46
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	49
V.1. Estadística descriptiva de las variables en estudio	49
V.2. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para NH, AP y LR.	51
V.3. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para DTB, DTM y DTA.....	55
V.4. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para DEB, DEM y DEA.	58
V.5. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para PHB, PSB, PHR y PSR.	61
V.6. Análisis de los componentes principales.....	64
VI. CONCLUSIONES.....	67
VII. RECOMENDACIONES	70
VIII. BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de la superficie, producción y rendimiento del cultivo de Olluco, a nivel nacional y por departamentos, durante la campaña de verano del año 2008, más las estimaciones de la campaña de invierno del año anterior.....	21
Tabla 2. Estadística descriptiva para variables de respuesta: numero de hojas (NH); altura de planta (AP); diámetro de tallo en la parte basal (DTB); diámetro de tallo en la parte medial (DTM); diámetro de tallo en la parte apical (DTA); peso húmedo de biomasa (PHB); peso seco de biomasa (PSB); longitud de raíz (LR); peso húmedo de biomasa radicular (PHR); peso seco de biomasa radicular (PSR); distancia entre entrenudos en la parte basal (DEB); distancia entre entrenudos en la parte medial (DEM); y distancia entre entrenudos en la parte apical (DEA), evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.....	50
Tabla 3. Análisis de varianza para las variables numero de hojas (NH); altura de planta (AP); longitud de raíz (LR) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.	52
Tabla 4. Análisis de varianza para las variables diámetro de tallo en la parte basal (DTB); diámetro de tallo en la parte medial (DTM); diámetro de tallo en la parte apical (DTA) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.....	56
Tabla 5. Análisis de varianza para las variables distancia entre entrenudos en la parte basal (DEB); distancia entre entrenudos en la parte medial (DEM); y distancia entre entrenudos en la parte apical (DEA) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.....	59

Tabla 6. Análisis de varianza para las variables peso húmedo de biomasa (PHB); peso seco de biomasa (PSB); peso húmedo de biomasa radicular (PHR); peso seco de biomasa radicular (PSR) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA. 62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de ulluco con pétalos, androceo y gineceo, pétalos púrpura rojizos.	1
Figura 2. Biodiversidad de Olluco cultivado en la zona andina de Bolivia.....	19
Figura 3. Productos de ulluco: adelante ulluco envasado en salmuera, atrás hojuelas deshidratadas.	23
Figura 4. Dinámica del desarrollo del meristemo apical del tallo que muestra el destino de la progenie de las células troncales de la zona central (ZC). El flujo de células hacia la zona periférica (ZP) y medular (ZM) se indican con flechas.....	30
Figura 5. Movimiento de los reguladores de crecimiento en la planta. (Tanimoto, 2005)	31
Figura 6. Tubérculos con presencia de brotes, colectados de la localidad de Achacachi, durante la campaña 2009-2010, mismos que constituyen el material genético para el presente estudio.	41
Figura 7. Flujo de los procedimientos empleados en el presente experimento.....	44
Figura 8. Identificación del tipo de explante de acuerdo a su posición en la vitroplanta	45
Figura 9 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables número de hojas, altura de planta y longitud de raíz evaluadas en la fase de desarrollo	53
Figura 10 Vitroplantas de Olluco, micropropagadas a partir de tres tipos de explantes: apical, medial y basal.....	55
Figura 11 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables diámetro de tallo en la parte basal, diámetro de tallo en la parte medial, diámetro de tallo en la parte apical, evaluadas en la fase de desarrollo.....	57
Figura 12 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables distancia entre entrenudos en la parte basal, distancia entre entrenudos en la parte medial y distancia entre entrenudos en la parte apical evaluadas en la fase de desarrollo.	60

Figura 13 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables peso húmedo de biomasa, peso seco de biomasa, peso húmedo de biomasa radicular y peso seco de biomasa radicular evaluadas en la fase de desarrollo. 63

Figura 14. Biplot de dos componentes principales para las variables de respuesta evaluadas en función a tres tratamientos identificadas como, tipos de explantes apropiados para la propagación *in vitro* de Olluco. Los números (1, 2, 3 y 4) representan al explante apical; (5, 6, 7 y 8) al explante medial y (9, 10, 11 y 12) al explante basal.. 65

RESUMEN

El cultivo de Olluco (*Ullucus tuberosus* Loz.), presenta múltiples cualidades, por su gran capacidad de adaptación a las condiciones adversas tales como la, helada, sequia y salinidad del suelo lo cual permite la producción en los departamentos de: Chuquisaca, La Paz, Cochabamba, Oruro, Potosí, Tarija y Santa Cruz. El principal problema para una buena producción de este tubérculo es la restricción en producción de semilla bajo el sistema formal (prebásica, básica, registrada, certificada), a causa de la proliferación de plagas, virus y enfermedades. Siendo una alternativa de mejorar esta situación, el cultivo de tejidos vegetales de Olluco, sin embargo se tiene muy poca información de este tema, por lo que se debe realizar algunos trabajos al respecto como la identificación del los tipos de explantes adecuados para distintos objetivos que se persigan. A través del presente trabajo se describió las características morfológicas de tres tipos de explantes (apical, medial y basal), en la fase de multiplicación, para lo cual se empleo brotes de tubérculos del ecotipo Achacachi, el cual fue recolectado del mismo lugar, posteriormente se realizo el establecimiento *in vitro*, para obtener vitroplantas para la fase de multiplicación, en la que se realizaron los cortes en la sección apical, medial y basal, para luego sembrarlas en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), las cuales fueron desarrollando nuevas vitroplantas. El desarrollo de vitroplantas de cada uno de estos explantes presentaron diferencias morfológicas como: las vitroplantas originadas a partir de los explantes apicales obteniendo mayor número de hojas, los explantes mediales y basales desarrollaron mejor las características de altura de planta y longitud de raíz.

ABSTRACT

Olluco's cultivation (*Ullucus tuberosus* Loz.), you present multiple attributes, for his great capability of adaptation to the adverse conditions such like her, freeze, drought and salinity of the ground which enables the production at the apartments of: Chuquisaca, La Paz, Cochabamba, Oruro, Potosí, and Santa Cruz. The principal problem for a good production of this tuber is the restriction in production of low seed the formal system (pre-basic, basic, registered, certified), because of the proliferation of plagues, virus and diseases. Being an alternative to improve this situation , Olluco's cultivation of vegetable textiles , however it is had very not much information of this theme , which is why some works must be accomplished with regard to this matter like the identification of the types of adequate explants stops several objectives that be pursued. You described the morphologic characteristics of three types of explants (apical , medial and basal) , in the phase of multiplication , for which through the present work himself I use tuber sprouts of the ecotipo Achacachi , which was recollected of the same place , at a later time himself I sell off the establishment *in vitro* , in order to get vitroplantas for the phase from multiplication , in the one that the cuts in the apical , medial and basal section accomplished themselves , stops next sowing in between cultivation Murashige and Skoog (1962) , which went developing news vitroplantas. Morphologic differences presented vitroplantas's development out of every one of these explants like: The vitroplantas originated as from the apical explants getting bigger number from sheets, the medial and basal ex-stoppages developed better the characteristics of height from the beginning and length by the roots.

I. INTRODUCCION

En Bolivia, el Olluco (*Ullucus tuberosus* Loz.) constituye un rubro importante dentro del sistema de producción tradicional de los agricultores asentados entre los 2000 a 4000 m.s.n.m., por ser fuente de alimentación y de ingresos económicos. Sin embargo, existen limitantes que afectan la producción y conservación de este tubérculo, llegando paulatinamente a causar su marginación e incluso reemplazo por otros cultivos más rentables, como algunas variedades comerciales de papa, favoreciendo así al monocultivo que tiene consecuencias negativas para la biodiversidad de los sistemas de producción andinos.

El Olluco es apreciado por la población andina por ser una especie tolerante a factores abióticos adversos, tales como: helada, sequía y salinidad, frente a otros tubérculos andinos. Además, este cultivo tiene una productividad de 15.532 t año y además constituye un alimento básico sobre todo durante las épocas de escasez de papas por causas de heladas y sequía.

Según Caicedo, *et al.* 2004, uno de los factores limitantes para la producción y la expansión del cultivo de Olluco es el uso de tubérculos-semilla de baja calidad, que presentan hongos, bacterias, virus y enfermedades que son diseminados por las semillas, lo cual incide en rendimientos bajos y la desaparición de valiosos genotipos en el campo. También este parece ser el caso general para otros cultivos andinos.

En general el Olluco está considerado como un cultivo rústico, con poca atención respecto a su mejoramiento genético, agronómico y de semillas. El cultivo de Olluco, tiene un gran potencial de transformación en productos procesados. Sin embargo, en la actualidad los países productores no han realizado avances significativos en estudios relativos a conocer su potencial para obtener productos con características excepcionales. Desde el punto de vista nutritivo, el Olluco se constituye en una gran fuente de carbohidratos, proteínas y vitaminas. Las hojas contienen altos niveles de proteína, calcio y caroteno, el valor nutritivo de los tubérculos, descansa principalmente en el contenido de proteínas que a su vez son fuente de aminoácidos el cual contiene seis de los ocho aminoácidos esenciales en la dieta humana.

Una alternativa promisorio para la resolución de estos problemas es la aplicación en esta especie, las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la Biotecnología Vegetal. En la actualidad, la técnica más usada en este campo es la llamada micropropagación, misma que consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Según Romero, G. 2008, las ventajas que ofrece la micropropagación con respecto a los métodos convencionales es que: se trata de un sistema de propagación clonal, es decir, que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado; debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambiente controlado, se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas, por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales el número de plantas que se puede obtener mediante la micropropagación es por su naturaleza prácticamente cuantioso; el espacio que se requiere es mínimo, y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto; las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides, favoreciendo el incremento del índice de productividad en beneficio del agricultor.

El nivel de avances en la generación de conocimiento de micropropagación en Olluco es limitado, razón por la cual se realizó el presente estudio que consiste en la multiplicación de vitroplantas a partir de diferentes tipos de explantes y su implicancia en el desarrollo de las vitroplantas.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Evaluar la potencialidad de tres tipos de explantes en el proceso micropropagación de Olluco que permita incrementar su productividad y consecuentemente contribuir a la mejora de la calidad de vida de los pequeños y medianos agricultores.

II.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el desarrollo morfológico de los tres tipos de explantes.
- Identificar el explante adecuado para la micropropagación de Olluco.

II.3. Hipótesis

H_a: existe diferencias estadísticamente significativas en las características del desarrollo morfológico en los tres tipos de explantes.

H_a: existe diferencias estadísticamente significativas entre explantes y su adecuación para la micropropagación, identificándose el explante apropiado para la micropropagación del Olluco.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

III.1. El cultivo de Olluco (*Ullucus tuberosus* Loz.)

III.1.1. Origen

Tapia, M. 1997, señala que es difícil establecer el área de origen de esta especie, según la variación genética actual podría indicarse que la región de los Andes colombianos sería el centro de origen primario del Olluco.

III.1.2. Descripción Botánica

Según Robles, E. 1981, el Olluco pertenece a la familia Basellaceae y consta de 4 géneros diferenciados morfológicamente. El género cuyo mayor número de especies se ubican en la Región Andina Central; *Tournomía*, que es monotípico (que tiene una sola especie); *Bassella*, dentro de este género sobresale la especie *Basella alba* que se cultiva por sus hojas comestibles, conocidas como espinaca de Nueva Zelanda y el género *Ullucus* que está relacionado lejanamente con los tres anteriores y es el único que produce estolones tuberosos, y tiene una sola especie, que puede ser dividida en dos subespecies:

Subespecie *tuberosus*, las plantas pueden ser de hábito erecto o rastrero, sus tallos alcanzan hasta 80 cm de altura, generalmente con ramas basales, que producen estolones aéreos; esta es la subespecie cultivada.

Subespecie *aborígeneus*, las plantas son siempre de hábito rastrero, con longitud de tallo de 1 m o más, con pocas ramas y a lo largo producen numerosos estolones aéreos que pueden formar tubérculos; esta subespecie es silvestre.

Patiño, F. (1998), indica que la especie en estudio pertenece taxonómicamente al: orden, Solanales; familia, Basellaceae; género, *Ullucus*; especie, *Ullucus tuberosus* y Subespecies, *Ullucus tuberosus aborígeneus*, *Ullucus tuberosus tuberosus*.

El Olluco presenta distintos nombres comunes dependiendo a las regiones o lugares donde se lo conoce como: Olluco, ulluku, papalisa en Perú y Bolivia; melloco en

Ecuador; chigua en Colombia; ruba en Venezuela; papa verde en Jujuy, Argentina (Tapia y Fries, 2007).

III.1.3. Descripción Morfológica

Arbizu, C. 2004, indica que el cultivo de olluco puede ser descrito visualmente a través de ciertos caracteres de la planta y de los tubérculos:

El porte de la planta de Olluco es erecto o rastrero. La altura de planta varía aproximadamente de 25 a 35 centímetros en las variedades de Olluco cultivado en los Andes Centrales, junto con el vigor y color del follaje dependiendo de la fertilidad del suelo y de la infección de enfermedades viróticas.

Alargamiento de los tallos: en algunos cultivares suelen presentar alargamiento de los tallos, cuando las plantas se encuentran en plena floración, el cual puede presentar cuatro variantes: ausente, tallos alargados erectos, alargados decumbentes, y tallos alargados rastreros (Cadima, X. 2006).

Color y aspecto de los tallos: el color de los tallos varía de verde amarillento claro a rojo grisáceo y es común encontrar tallos verdes con pigmentaciones rosadas o bien tallos rojos con pigmentaciones verdes.

Cárdenas, M. 1989, describió que existe cierta correspondencia entre el color de los tallos y los tubérculos. Cadima, X. 2006, corroboró lo anterior con lo observado en la colección de Olluco de Bolivia, donde se han encontrado plantas de tallos rojos grisáceos nacidas de tubérculos rojizos y púrpuras, así como plantas de tallo verde nacidas de tubérculos amarillos. Además, observo que de un mismo tubérculo amarillo con rojo pueden generarse tallos rojos nacidos de ojos rojos y tallos verdes nacidos de ojos amarillos. Es común también encontrar tubérculos normales y adventicios, estos últimos que brotan por encima de la tierra y son más pequeños que los normales.

Color del follaje: aunque el color del follaje puede estar influenciado por la fertilidad del suelo, humedad, y presencia de enfermedades viróticas, este carácter sin embargo,

presenta tres colores de fácil identificación en el campo: verde-amarillento claro, verde-amarillento, y verde-amarillento oscuro.

Forma de la lámina: es una excelente característica que ayuda a identificar cultivares, pues no se modifica por la influencia de factores bióticos y abióticos. Como lo indican varios autores (Cárdenas 1989, IPGRI/CIP 2003, Barrera *et al.* 2004), las hojas de la Olluco son anchas y simples, pueden presentar cuatro formas ovada, cordada, deltoide y semi-reniforme; de ápice obtuso o redondeado con el pecíolo de 2.5 - 7.5 cm de longitud y lámina de 2.5 - 7.5 x 5 cm.

Hábito de floración: el hábito de floración sin embargo, no es muy importante para identificar una variedad de Olluco porque las inflorescencias que emergen de la base del tallo hacia el ápice y las flores que también se abren de abajo hacia arriba, son relativamente de difícil observación porque casi siempre están cubiertas por el follaje.

Otro indicador taxonómico está dado por el color de los pétalos los cuales pueden ser verde-amarillentos, verde-amarillentos con ápice púrpura-rojiza, verde-amarillento con ápice y borde púrpura-rojizo y púrpura-rojizo con fondo amarillo naranja.



Figura 1. Flor de ulluco con pétalos, androceo y gineceo, pétalos púrpura rojizos.

Inflorescencia o raquis: una variación importante del Olluco se presenta en el eje de la inflorescencia, el mismo que puede ser recto, o en zig-zag. El color del eje de la inflorescencia también es importante en la variación morfológica del ulluco por ser una

buena característica taxonómica, pudiendo ser de color verde-amarillento claro, verde-amarillento con púrpura-rojizo, y púrpura-rojizo.

Color de los sépalos y pétalos: el color de los sépalos también constituye un buen indicador taxonómico y puede variar de verde-amarillento a púrpura-rojizo y pasando por el púrpura-rojizo claro.

Color de la superficie de los tubérculos: el color de los tubérculos presenta una gran variación (Figura 2). De acuerdo a los descriptores estándar (IPGRI/CIP. 2003), existen 12 estados que van desde el blanco amarillento hasta el púrpura rojizo, pasando por una gran gama de colores intermedios como el verde amarillento, amarillo, amarillo oscuro, amarillo grisáceo, amarillo naranja, naranja pálido, naranja, naranja rojizo, rojo claro (rosado) y rojo.



Figura 2. Biodiversidad de Olluco cultivado en la zona andina de Bolivia.

Forma de los tubérculos: de acuerdo a los descriptores morfológicos estándar del IPGRI/CIP (2003), solo se tienen cuatro formas de tubérculo en Olluco: redondo, cilíndrico, semifalcado y retorcido. Sin embargo, es común ver en las colecciones de los países (Ecuador, Bolivia y Perú) también tubérculos ovoides. Los descriptores estándar no hacen referencia a los ojos, seguramente porque no son parámetros de descripción de la variabilidad de la especie, sin embargo los ojos del Olluco se caracterizan porque son muy superficiales y sin brácteas (Cadima, X. 2006).

Aunque la forma de los tubérculos puede ser influenciada en suelos compactos y por la edad de la planta, este carácter sin embargo, también constituye un factor importante para identificar cultivares.

III.1.4. Variedades

Según Tapia y Fries, (2007) se pueden diferenciar dos grupos mayores según el porte:

Plantas de tipo rastro: con tallos ligeramente coloreados de color rojo, hojas pequeñas y tubérculos alargados de color rojo púrpura. Son más propias de los Andes norte y de Colombia.

Plantas erectas: con hojas grandes en la base y de color verde intenso, con tubérculos de diferentes colores; comunes en Perú y Bolivia. Según la coloración de la cáscara y pulpa del tubérculo, en Bolivia se pueden encontrar las siguientes variedades:

- Janco, tubérculos de color blanco y pulpa amarilla,
- Quellu, de cáscara y pulpa amarilla,
- Larama, de cáscara morada y pulpa amarilla,
- Huila, de cáscara roja y pulpa amarilla,
- Chiteque, de cáscara amarilla con pintas rojas y pulpa amarilla.

III.1.5. Situación de la producción de Olluco en Bolivia

En Bolivia, el Olluco se cultiva en siete de los nueve departamentos (Chuquisaca, La Paz, Cochabamba, Oruro, Potosí, Tarija y Santa Cruz), según el INE. 1999, a nivel nacional y por un período de 15 años entre 1983-84 y 1997-98, este cultivo alcanzo una superficie cultivada de 3.166 has y la producción total 10.404 (t). En el mismo período los rendimientos promedio llegaron a 2.892 kg/ha siendo los más bajos de la región andina. Los departamentos donde el Olluco rinde más de acuerdo a la misma fuente en 15 años, son Cochabamba, Santa Cruz, Tarija y La Paz, con 3.825, 3.637, 3.084 y 2.816 kg·ha⁻¹ respectivamente.

El INE/ENA. 2008, indican que los datos resientes de la superficie cultivada, producción y rendimientos del cultivo de Olluco se lo presenta en la tabla 1. En el cual se observa el incremento de la producción de este cultivo siendo mayor a la de los años entre 1983-84 y 1997-98 y se lo relaciona directamente al incremento de la superficie cultivada.

	Superficie	Producción	Rendimiento
	----- ha -----	----- t -----	-----Kg·ha ⁻¹ -----
Bolivia	4,104	15,532	3,785
Cochabamba	1,917	7,819	4,079
Chuquisaca	870	2,437	2,801
La Paz	638	2,108	3,304
Potosí	372	1,929	5,185
Santa Cruz	230	1,046	4,548
Oruro	55	114	2,073
Tarija	22	79	3,591

Tabla 1. Datos de la superficie, producción y rendimiento del cultivo de Olluco, a nivel nacional y por departamentos, durante la campaña de verano del año 2008, más las estimaciones de la campaña de invierno del año anterior.

III.1.6. Valor nutricional del cultivo de olluco

Los tubérculos de Olluco son una buena fuente de carbohidratos. Los tubérculos frescos tienen alrededor de 85% de humedad, 14% de almidones y azúcares y entre 1% y 2% de proteínas, generalmente tienen alto contenido de vitamina C (Barrera *et al.* 2004). Lescano, 1994, menciona también que el Olluco contiene importantes cantidades de proteínas (10.8–15.7%), que a su vez son fuente de seis aminoácidos de los ocho aminoácidos esenciales en la dieta humana como: Isoleucina 41.0, leucina 56.5, lisina 58.0, Treonina 6.7, Triptofano 46.0, y Valina 37.0 mg·g⁻¹ (Ayala, G. 2004). Las hojas pueden contener niveles altos de proteína, calcio y caroteno.

III.1.7. Uso e importancia económica del cultivo de Olluco

En Ecuador el cultivo de la Olluco es el segundo tubérculo en importancia, después de la papa cultivada, a altitudes entre 2.500 y 3.800 m.s.n.m., con rendimiento promedio de 3.5 t/ha (Barrera *et al.* 2004). En Bolivia y Perú ocupa una menor importancia que la papa y la oca. En el Perú, la sierra central es la principal zona productora, pues participa con el 35% de la producción nacional y registra un promedio de rendimiento de 4-5 t/ha (López, G. 2004). En Bolivia, el Olluco se cultiva en siete de los nueve

departamentos, pero la mayor superficie cultivada y producción se encuentra en las zonas altas de Cochabamba y Chuquisaca.

Usos tradicionales: Cadima, X. 2006, indica que el sabor del olluco es agradable sin ser muy pronunciado sin embargo algunas variedades contienen mucílagos por lo que requieren varios lavados previos. Por su contenido de agua, es de textura menos harinosa que la oca o la mashwa y por lo tanto es considerado como alimento fresco.

En Bolivia se consume Olluco en sopas, también en un plato típico llamado sajta que es un guiso con charque o carne secada al sol y ají picante; otro preparado no muy común es como ensalada cocida, revuelta con huevo y maní. En Perú se prepara un plato típico llamado olluquito con charqui y también se elabora chuño de Olluco. Barrera *et al.* (2004) reportaron que en el Ecuador se prepara la sopa de Olluco; también se consume en forma de ensaladas; guiso cocinado sazonado, con refrito, leche y maní, acompañado de sal y/o ají y en combinación simple con otros productos cocidos, como habas o papas.

Recientemente se reportó el uso de la Olluco para espesar sopas y estofados, proporcionando una consistencia suave a ciertas preparaciones culinarias (Repo y Kameko 2004). Las hojas son también usadas en ensaladas y sopas o para reemplazar a la espinaca. En Ecuador se reporta también el uso del follaje del Olluco para alimentación del ganado vacuno (Caicedo *et al.* 2004).

Usos Agroindustrial: De acuerdo a Repo, R. y Kameko, J. 2004, en Bolivia se ha desarrollado un proceso para obtener harina de ulluco a partir de hojuelas secas. Las operaciones de este proceso son: selección, lavado, cortado en hojuelas de 2 mm de espesor, escaldado a 90 °C por tres minutos, secado en un secador de bandeja, primero a 38 °C por cinco horas y luego a 68 °C por una hora y media; molienda y envasado (García, W. y Cadima, X. 2003). Esta harina se usa en panadería y pastelería ya que es factible sustituir la harina de trigo en estos productos, hasta en 10 %, también se ha estudiado la deshidratación de ulluco en trozos para el uso en platos típicos (Prog. Col. Biodiv. RTAs, 1996). En Perú se han hecho estudios de deshidratación y se ha obtenido una crema envasada de ulluco. El proceso de obtención de la crema es el

siguiente: los tubérculos son seleccionados y lavados y luego escaldados a una temperatura de 95 °C por tres y medio minutos para luego enfriarlos en agua fría.

Después los tubérculos son triturados hasta obtener la consistencia de crema. La crema es luego colocada en envases de hojalata que son sellados al vacío. El tratamiento térmico se hace en una autoclave a 121 °C durante 90 minutos (Salas, 1998). En Ecuador se han desarrollado mermeladas de ulluco con mora utilizando 40 % de ulluco y 60 % de mora (Cruz y Tobar, 1998).

Conservas de Olluco: Se han desarrollado dos tipos de conservas: Olluco envasado entero en salmuera y Olluco encurtido.

- **Envasado en salmuera:** La conserva en salmuera consiste en envasar y llenar manualmente frascos de vidrio resistente con el tubérculo de Olluco. La solución de cubierta (salmuera) está constituida por agua y sal a una concentración del 2 % dicha solución de cubierta se vierte en el frasco que contiene los tubérculos. La operación de evacuado se realiza en un túnel de vapor (“exhauster”) donde se asegura un vacío adecuado, se cierran los frascos herméticamente con una tapa. El tratamiento térmico se realiza en una autoclave a 121 °C por 23 minutos. Los frascos son enfriados a temperatura ambiente.



Figura 3. Productos de ulluco: adelante ulluco envasado en salmuera, atrás hojuelas deshidratadas.

- **Envasado en encurtido:** Se llaman encurtidos a la conserva de Olluco por acidificación. Esto puede lograrse mediante la adición de ácido acético o vinagre

al tubérculo. El encurtido permite conservar el productos vegetales durante mucho tiempo porque el ácido acético previene el desarrollo de microorganismos que podrían descomponer el producto. Los encurtidos pueden ser dulces, picantes o agridulces. Se recomienda que el vinagre empleado en la elaboración de encurtidos sea de 5 % de acidez acética, como mínimo.

III.1.8. Factores que favorecen la producción del Olluco

Cadima *et al.* 2003. Indica que los factores que favorecen a la producción de este cultivo son:

Factores socioculturales: La alimentación tradicional es parte de la cultura del país y por lo tanto el consumo, en este caso del Olluco, es uno de los factores favorables a su producción.

Factores socioeconómicos: El Olluco es parte de la dieta alimenticia de los agricultores y su producción constituye una fuente de ingresos económicos.

Otros de los factores que favorecen la producción de Olluco es el bajo costo de producción (3100-3600 Bs/ha) en relación de la papa (5900 y 8500 Bs/ha), ya que el uso de insumos como fertilizantes y productos fitosanitarios es menor.

Factores medioambientales: Las condiciones medioambientales de las zonas productoras son favorables a la producción de Olluco, es decir son húmeda-frías (humedad relativa >70%), con temperaturas que fluctúan entre 4°C min. y 17°C máx. y las precipitaciones anuales sobrepasan los 800 mm. Asimismo, en las zonas productoras las altitudes que más favorecen el cultivo del Olluco son aquellas que varían de 2900 a 3600 m.s.n.m.

III.1.9. Factores limitantes del cultivo de Olluco

Según Condori *et al.* 2003, los factores que afectan la producción y conservación del Olluco, causan su creciente marginación e incluso su reemplazo por otros cultivos más rentables; favoreciendo así al monocultivo con consecuencias negativas para el sistema

de producción. A fin de revertir esta tendencia y proponer alternativas viables de solución, es importante conocer los factores que originan la marginación de este cultivo:

Limitantes socioeconómicas: Los agricultores de zonas productoras de Olluco señalan que la comercialización es el limitante más importante, debido a los bajos precios de venta de este cultivo por la poca promoción y demanda en el mercado.

Limitantes bióticas: Un problema limitante prioritario en la producción y conservación del Olluco es la mala calidad de la semilla por incidencia de: Virus como el **PLRV** (*Potato leafroll virus*), **UVC** (*Ullucus virus C*), **PapMV-U** (*Papaya mosaic virus, ulluco strain*) y **UMV** (*Ullucus mosaic virus*) mencionados por Fuentes y Chuquillanqui (2004); Enfermedades como el “muckuru” (*Fusarium* sp.), la roya (*Aecidium ulluci*), la “q’aracha” (*Rhizoctonia* sp.) y Manchado del tubérculo (*Thielaviopsis* sp.); Enfermedades bacterianas como la pudrición bacteriana (*Erwinia carotovora subsp. carotovora* Jones) mencionados por Ames, T. 2004, generalizados con diferentes grados de importancia en las diferentes zonas productoras.

Limitantes abióticas: La erosión y degradación paulatina de la fertilidad de los suelos principalmente en los lugares donde se hace una agricultura intensiva, es un problema general a nivel de todas las zonas productoras del Olluco. Así también las heladas, exceso de lluvias o sequías que afectan considerablemente la producción.

III.2. Cultivo *in vitro*

Según Pierik, 1999, el cultivo *in vitro* se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. Las células de las plantas que se encuentran ya diferenciadas están determinadas y normalmente no se dividen. La división y dediferenciación de estas células puede inducirse si se colocan porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios.

El cultivo *in vitro* se utiliza para la: obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, la selección *in vitro*, para la introducción de nuevas

características en las plantas mediante ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas (George, 2000).

La micropropagación es una alternativa importante a la propagación de plantas convencional. Implica la producción de plantas utilizando explantes como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz o protoplastos, en condiciones asépticas (libre de microorganismos) en un recipiente donde se pueden controlar las condiciones ambientales y los nutrientes. Las plantas resultantes son en principio idénticas a los parentales de los que proceden. La técnica de micropropagación *in vitro* de plantas es empleada eficientemente en muchos cultivos como: horticolas, ornamentales, raíces, tubérculos y en especies leñosas (Kozai, T.1999).

III.2.1. Métodos de propagación vegetativa *in vitro*

Razdan, M. 2003 indica que los métodos de propagación vegetativa que se seleccionen en la multiplicación *in vitro* dependen de la planta que se vaya a multiplicar y de los objetivos finales, se debe elegir el tejido del que se quiere partir para la micropropagación. La mejor opción no es siempre la que mayor número de brotes produce. En este contexto, los métodos que dan lugar a plantas pasando por una fase de callo no se consideran ideales, ya que habitualmente se cree que se producen alteraciones genómicas en los regenerantés, durante la formación de los callos.

Los métodos de propagación vegetativa en función del tejido que se ponga en el cultivo se pueden clasificar en:

Cultivo de plantas intactas: siembra de una semilla *in vitro*, obteniéndose primero una plántula y finalmente una planta.

Cultivo de embriones: cultivo de embriones aislados después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.

Cultivo de callo: cultivo de tejido desdiferenciado *in vitro* formándose órganos adventicios o embriones somáticos.

Cultivo de células: aisladas de un tejido, un callo o un tejido en suspensión, obtenidas con la ayuda de enzimas o mecánicamente.

Cultivo de meristemos y yemas terminales o laterales: el término cultivo de meristemos, por lo general, no es correctamente empleado, ya que en la mayoría de los casos se siembra el domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares. El domo es una estructura de menos de 0,1 mm de diámetro muy difícil de extraer con éxito en forma aislada, y de la cual resulta con frecuencia complicado obtener plantas completas (Conci, V. 2010).

Para ello es necesario un medio de cultivo con una concentración de nutrientes muy equilibrada y condiciones ambientales muy estrictas. Por consiguiente los resultados en ese sentido han sido muy pobres. Por esta razón, en la mayoría de los casos, se utiliza el domo acompañado de uno ó más primordios foliares. Tal vez lo más aconsejable sería utilizar el término cultivo de (yema), o (brote), o (tallo).

III.2.2. Factores que afectan la propagación vegetativa *in vitro*

Varios factores pueden afectar el buen desarrollo *in vitro* de una planta a partir de un meristemo u otro tipo de explante: el medio de cultivo empleado, el estado fisiológico del explanto, la concentración de hormonas endógenas del explanto, las contaminaciones internas o externas producidas durante el desarrollo del cultivo, el tamaño, localización del explanto, etc.

Asepsia: Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus).

Según Perla, H. 2007. La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito.

Para establecer cultivos asépticos es necesario: trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivo; desinfectar superficialmente los explantes, para liberarlos de microorganismos exógenos y Manejar adecuadamente las normas de asepsia (L. Mroginski *et al.* 2010).

Es generalizado el uso de etanol (70 % v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 %, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [Ca (OCl)]², del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio (HgCl₂) del 0.1 al 1.5 %. Posteriormente es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril. En este último punto hay que tener cuidado de usar agua destilada estéril de reciente preparación, dado que está demostrado que el almacenaje prolongado del agua estéril puede ser la causa de contaminaciones con bacterias (Perla, H. 2007).

Explante: la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento exitoso del cultivo *in vitro*; dicha elección estará en función de:

La planta donante: esta preferentemente debe estar en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable evitar el uso de «explantes sucios» (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos (L. Mroginski *et al.* 2010).

Edad fisiológica: este es un aspecto de gran influencia, se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemos apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies.

Localización del explante: frecuentemente se utilizan meristemos apicales y axilares con buenos resultados en la obtención de plantas libres de virus. Sin embargo es aconsejable el uso de yemas terminales ya que tienen un mayor crecimiento potencial que las yemas laterales. En general, los meristemos más jóvenes se desarrollan mejor que los viejos y producen mayores cantidades de plantas libres de virus que las yemas

laterales, probablemente porque tienen un crecimiento más activo que las axilares. No obstante, también es posible la obtención de plantas sanas a partir de yemas axilares (Conci, V. 2010).

Tamaño del explante: el cultivo de meristemas tiene una serie de requerimientos nutricionales para cumplir sus funciones de autoperpetuación y de generar células para formar tejidos definidos. Por lo tanto, al ser retirado de la planta debe ser sembrado en un medio de cultivo apropiado, así rápidamente desarrolla en una planta completa.

Según Conci, V. 2010, cuanto más pequeño sea el meristemo (explante) más difícil será encontrar el medio de cultivo adecuado que permita un buen desarrollo. Se ha observado que sembrar sólo el domo meristemático, en general no da buenos resultados, en algunos casos no se desarrolla una planta, sólo produce callo que luego puede, o no, regenerar plantas.

El tamaño del explante, así como el número de primordios que deba poseer, dependerá, en cada caso, del objetivo que se persiga y la especie vegetal que se trate. En términos generales, cuanto más grande sea el explante, mayor será la posibilidad de regenerar plantas, pero menor la posibilidad de obtener plantas libres de virus.

Existe un gradiente de incremento en la concentración de virus desde el domo meristemático hacia los sucesivos primordios foliares coincidiendo con el grado de diferenciación. Esto significa que la probabilidad de obtener plantas libres de virus es inversamente proporcional al tamaño del explante utilizado. Explantes de entre 0,2 y 0,5 mm son los que más frecuentemente producen plantas libres de virus (Conci, V. 2010).

Según Mroginski y Roca, 1993. A mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.

- Zonas de crecimiento, meristemo apical: el meristemo apical del tallo es una estructura muy dinámica en la que constantemente se está produciendo crecimiento y la formación de órganos. El meristemo cuenta con tres regiones: la Zona central (ZC), situada en el extremo distal, la zona periférica (ZP), que flanquea la ZC y la zona medular (ZM) situada en la base del meristemo ver figura 4.

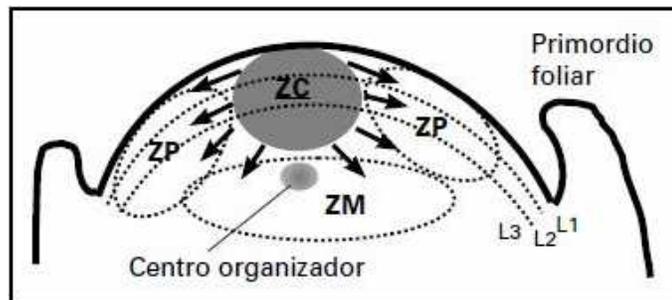


Figura 4. Dinámica del desarrollo del meristemo apical del tallo que muestra el destino de la progenie de las células troncales de la zona central (ZC). El flujo de células hacia la zona periférica (ZP) y medular (ZM) se indican con flechas.

Segura, J. 2000, indica que además de autopropagarse, los meristemos apicales del tallo forman órganos laterales (primordios foliares) que se originan en la ZP. Investigaciones recientes demuestran que las auxinas ejercen un papel fundamental tanto en la iniciación de los primordios foliares como en la determinación de la posición a la que emerge de la ZP. La iniciación de un nuevo primordio viene siempre precedida por la acumulación relativamente elevada de auxinas en la ZP del meristemo. Los primordios existentes actúan como potentes sumideros que (roban) las auxinas a las células vecinas, provocando una distribución heterogénea de la hormona en la ZP del meristemo por ello, los nuevos primordios solo pueden iniciarse a una cierta distancia mínima de los preexistentes, en puntos donde se produzca suficiente acumulación de auxinas.

- Reguladores naturales de crecimiento: el desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción de factores externos e internos. Dentro de los factores internos se incluye las hormonas vegetales, las cuales se define como, compuesto orgánico sintetizado en un lugar de la planta y trasladado a otra parte donde, en concentraciones muy bajas, produce una respuesta fisiológica. El control hormonal lo

realiza cinco grupos principales: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico (Azcón y Talón, 2000).

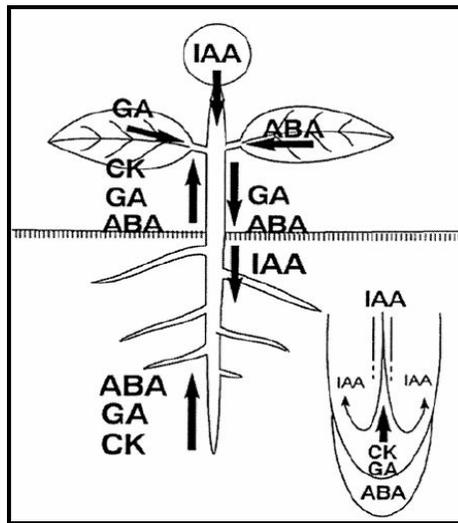


Figura 5. Movimiento de los reguladores de crecimiento en la planta. (Tanimoto, 2005)

La actividad de estos reguladores sigue una dinámica de regulación intrínseca y un movimiento dentro de la planta (Figura 5), establecido en base a estudios clásicos, desde el sitio de producción y transporte de cada regulador (Tanimoto, E. 2005).

Auxinas: Se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas, con mayores concentraciones en los meristemos caulinares, laterales, yemas en actividad, órganos en activo crecimiento. Las auxinas están implicadas en el control de diversas funciones en las plantas, como por ejemplo:

Tropismo, son curvaturas de los órganos vegetales que pueden explicarse sobre la base de concentraciones diferenciales de auxinas en distintas partes; Dominancia apical, es la inhibición o control del crecimiento que ejerce la yema apical sobre las yemas axilares o ramificaciones laterales. Otras funciones que también desempeñan las auxinas en las plantas son: favorecen el crecimiento en longitud de la planta; activan al cambium para producir xilema y floema, por lo que favorecen el crecimiento en grosor del tallo; provocan la aparición de raíces en los esquejes de los tallos; facilitan el cuajado de los frutos e inducen a la producción del etileno (M. Acosto *et al.* 2000).

Citoquininas: Se producen en los ápices de las raíces y viajan hasta el tallo y las ramas por el xilema. Su actividad a nivel celular resulta de su estimulación del proceso de división celular, por lo que: estimulan el crecimiento longitudinal de la planta; favorecen el desarrollo de las yemas axilares para producir ramas y de los brotes tras el periodo invernal, en los bulbos y tubérculos; detienen la caída de las hojas; retrasan el envejecimiento y la muerte de los órganos que las poseen, por lo que se conocen como hormonas de la juventud (Purves *et al.* 2002).

Giberelinas: estas hormonas son producidas en los meristemos y ápice del tallo, hojas jóvenes y son conducidas por el floema a todos los demás órganos de la planta, su actividad consiste en: el alargamiento de las células a nivel de los entrenudos del tallo, aumentando la distancia entre dos nudos y así producen el crecimiento en longitud de las plantas, esta difiere al alargamiento producida por la auxina; estimula la formación de las flores y su transformación posterior en frutos; aumentan el tamaño de las hojas y de las flores en algunas plantas; inducen la actividad del cambium en algunos árboles de los climas templados para que broten en primavera; son las responsables de la germinación de las semillas (Azcón y Talón, 2000).

Ácido abscisíco: Esta hormona se sintetiza en las hojas, tallos el cual es transportado a los meristemos apicales a través del floema. Se trata de un inhibidor del crecimiento de las plantas, su acción inhibidora también impide la germinación de las semillas y el desarrollo de los brotes.

III.2.3. Medios de cultivo

Básicamente, los medios de cultivo están constituidos por compuestos que suministran:

Fuente de carbono: Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa (azúcar), en concentraciones de 2 al 5%, es el más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa, maltosa o galactosa.

Nutrientes minerales: El medio de cultivo debe proveer macro y micronutrientes a los explantes. La composición de minerales varía según la especie vegetal, el tipo de

explante y los resultados esperados. Entre los medios de cultivos más usados están: MS=Murashige et al., 1962; B5=Gamborg et al., 1968; N6=Chu et al., 1975; Wh = Chite, 1943 (Perla, H. 2007).

Sustancias vitamínicas: En general los medios de cultivo contienen varias vitaminas, siendo esencial la incorporación de tiamina.

Agente gelificante: En los medios semisólidos comúnmente se adiciona agaragar (0.6 al 1.0 %). También pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel» (2,0-2,60%), «Phytigel» (0,25- 0,40%), agarosa (0,80-0.90%) y «Gelrite» (0,10-0,20%) (S. Rojas *et al.* 2004).

Sustancias reguladoras del crecimiento: En algunos casos se obtienen en los cultivos de tejidos vegetales la respuesta deseada usando solamente el medio basal (MB), sin embargo en la mayoría de los casos se hace necesario agregar sustancias reguladoras del crecimiento del tipo auxinas, citocininas y giberelinas.

Las auxinas más empleadas son: 2,4-D, ANA, AIA y AIB. Mientras que las citocininas más comunes son: KIN, BAP y ZEA. En el caso de las giberelinas han demostrado ser necesarias para el cultivo de ápices de meristemas o para la elongación de brotes (L. Mroginski *et al.* 2010).

Otros compuestos: En algunos medios de cultivos se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15%), jugo de tomate y puré de banana.

III.2.4. Condiciones ambientales para la incubación.

S. Rojas *et al.* 2004, indica que la incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica e higiene. Es recomendable que

los cultivos sean incubados a temperatura constante de 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8horas y humedad atmosférica de (80- 90%).

III.2.5. Etapas de la micropropagación *in vitro*

Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

Etapa 0: Preparación de la planta madre

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente al principal problema que afectan al establecimiento del cultivo, que es la contaminación con microorganismos. Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben clasificar el explante con: un nivel nutricional, condiciones fisiológicas y fitosanitarias adecuadas (H. Hertmann *et al.* 1997).

Etapa 1: Establecimiento del explante

Las plantas donadoras de explantes deben someterse a una desinfección superficial, con productos químicos que sean tóxicos para los microorganismos, puesto que si no se eliminan podrían competir con el crecimiento y desarrollo del explante en condiciones *in vitro*.

Durante la etapa de establecimiento, el explante pasa por un periodo inicial, donde se estabiliza después del estrés producido por el aislamiento de la planta donadora y por los tratamientos de desinfección. De esta manera se espera que ocurra un crecimiento resultado de la división y elongación celular.

Etapa 2: Multiplicación de los brotes

Según S. Olmos *et al.* 2010. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.).

Etapa 3: Enraizamiento *in vitro*

Esta etapa se da cuando se tiene los subcultivos necesarios para garantizar una cantidad determinada de plántulas *in vitro* o vitroplantas. Los explantes ya propagados se dejan crecer, formar hojas por un período de tiempo según sea la especie y posteriormente son cambiados a un nuevo medio de cultivo en el cual cambiar el balance hormonal favorece a las auxinas, con el fin de inducir la formación y desarrollo de raíces (S. Rojas *et al.* 2004).

Etapa 4: Aclimatación del material obtenido *in vitro*

Es la etapa conocida como endurecimiento, proceso mediante el cual las plantas obtenidas en condición *in vitro* se transfieren gradualmente a un ambiente *ex vitro*. Para obtener éxito en los resultados se debe reducir gradualmente la humedad relativa que rodea a la planta, con el objeto de lograr que la planta controle la transpiración y pueda adaptarse a un sustrato en condiciones de campo (H. Hartmann *et al.* 1997).

III.3. Vitroplanta

Según Flores y Brenes. s.f. Las vitroplantas son plántula producida bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y reguladores del crecimiento, las vitroplantas producidas en el laboratorio, para ser trasladadas al invernadero deben estar: certificadas como libres de virus, deben presentar un tamaño mínimo de 4 cm. y un sistema radical significativo con el fin de que soporten esta etapa.

III.3.1. Crecimiento y desarrollo

El conjunto de eventos que contribuye a la progresiva formación del cuerpo de la planta y que le permite obtener alimento, reproducirse y adaptarse a su ambiente se define como desarrollo o morfogénesis, este involucra dos procesos:

El crecimiento: (se manifiesta por cambios cuantitativos), es un incremento irreversible en tamaño y volumen, que está dado por la combinación de expansión y división celular, (Raven *et al.* 1999). El control de la división celular radica en el ciclo celular, que

se define como la secuencia de eventos bioquímicos y morfológicos que llevan a la generación de células nuevas a partir de una célula madre (Azcón y Talón, 2000).

Diferenciación celular: para que el cuerpo de la planta se desarrolle es necesario un proceso de diferenciación celular, en el que las células se especializan para ser estructural y funcionalmente diferentes unas de otras. Este proceso depende básicamente de la expresión diferencial del material genético, estas células tendrán toda la información necesaria para formar una nueva planta. Este fenómeno se conoce como totipotencia celular (Azcón y Talón, 2000). Las zonas de crecimiento (meristemas) que se mantienen en constante división presenta la mayor proporción de células totipotentes (Taiz y Zeiger, 1998).

III.4. Cultivo *in vitro* de Olluco

Izquierdo y Roca (1999) evaluaron los problemas y necesidades de investigación y las aplicaciones de la biotecnología a raíces y tubérculos Andinos, incluyendo tecnologías como el cultivo de tejido, para la conservación y manejo de recursos genéticos así como para el mejoramiento genético. El Olluco es un cultivo que dispone de limitada información técnica, sobre todo en el ámbito biotecnológico, por lo que es necesario adaptarla de otros cultivos, como la papa.

Una de los primeros estudios realizados en el Olluco, fue el cultivo de meristemas, en concentraciones de 1 y 10 mg/l de ácido giberélico (GA), en el cual no presentó ninguna diferencia en el porcentaje de supervivencia y tasa de crecimiento (Estrada, R. 1986).

Una de las aplicaciones, de la biotecnología en el cultivo de Olluco destaca la aplicación de tecnologías en el CIP que han permitido la organización de un banco de germoplasma clonal *in vitro* de 1600 accesiones de Olluco, Así mismo, el CIP ha iniciado un programa de erradicación de virus, con miras a facilitar su distribución a los países de la región, como para la recuperación del rendimiento y calidad de este cultivo en el campo del agricultor (Izquierdo y Roca 1999).

III.5. Conservación *in vitro* de Olluco

La conservación *in vitro* es el respaldo de seguridad de las colecciones en campo y el proceso por el cual se limpian las accesiones de sus enfermedades y se re-juveniliza la semilla para llevarla nuevamente a campo. Para esta conservación se priorizaron accesiones en cuanto a variabilidad y con peligro de perderse bajo otras condiciones de mantenimiento (en campo, almacén o invernadero), debido a factores de baja adaptabilidad y/o semilla degenerada por problemas viróticos u otros patógenos.

En 1993-94 se inició la conservación *in vitro* de Olluco a mediano plazo, se introdujeron cinco accesiones de Olluco para su escisión y cultivo de meristemas después de 3 a 4 semanas de su introducción. Para la conservación se probaron retardantes como manitol y sorbitol a la temperatura de $\pm 8^{\circ}\text{C}$, siguiendo los protocolos del CIP y Departamento de Recursos Fitogenéticos (INIAP) del Ecuador. En esa primera experiencia las cinco accesiones de Olluco tuvieron un comportamiento similar y aceptable en cuanto a sobrevivencia en temperaturas de 8°C y con el retardante Mannitol.

Las temperaturas altas (22°C) desfavorecieron la sobrevivencia de las plántulas de Olluco aún se hayan aplicado retardantes para su conservación, con esta combinación de condiciones (Mannitol + 22°C) los niveles de sobrevivencia del Olluco fueron los más bajos (Cadima, 1996).

Un estudio posterior determinó que el Olluco se conserva más adecuadamente utilizando Sorbitol como retardante de crecimiento en combinación con bajas temperaturas (8°C), en estas condiciones las plántulas se mantuvieron adecuadamente durante 10 meses. La aplicación sólo de bajas temperaturas (8°C) como retardante de crecimiento, también ha sido efectiva para la conservación *in vitro* de Olluco, sin embargo las plántulas se degeneraron más rápidamente respecto a las que estuvieron en medio con Sorbitol y por lo tanto requirieron ser transferidas con anticipación a condiciones de crecimiento normal (Cadima y Ugarte, 1996).

Según Cadima *et al.* 2003, una vez conformadas las mejores condiciones de conservación *in vitro*, se procedió a la introducción gradual de accesiones priorizadas de Olluco, para su limpieza por termoterapia y cultivo de meristemas. En 2000-01, se introdujeron 10 accesiones de Olluco a condiciones *in vitro*, todas pasaron por el proceso de limpieza viral (termoterapia y meristemas) para pasar posteriormente a condiciones de conservación. En la campaña 2001-02 se continuaron manteniendo *in vitro* 78 accesiones.

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

IV.1. Localización del Experimento.

El presente experimento se desarrolló en los ambientes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en los predios de la carrera de ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), ubicada en la calle Héroes del Acre N° 1543, de la ciudad de La Paz, Bolivia.

El laboratorio de Biotecnología Vegetal, cuenta con cuatro áreas de trabajo, que permiten un flujo de trabajo adecuado.

Área de lavado y recepción de materiales: es el área de recepción del material vegetal para propagar en el laboratorio, se anotan los datos de procedencia de los explantes. En esta, se realiza la limpieza externa del material vegetal quitando rastros de tierra u otros; así mismo en esta área, también se procede con el lavado de la cristalería necesaria para las etapas subsiguientes.

Área de preparación de medios: en esta área, se prepara los medios de cultivo y se almacena toda la cristalería, reactivos y desinfectantes. Todos los medios de cultivo, así como el instrumental a utilizar en la siembra, que es autoclavado por 15 minutos a 121 °C, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada, para conseguir una efectiva esterilización

Área de Transferencia: en esta se lleva a cabo el trabajo de disección y transferencia de explantes a los medios de cultivo. Para proceder a la transferencia se utiliza la cámara de flujo laminar. Esta cámara permite la esterilización del aire, con una efectividad de hasta en un 99 %, mediante el paso a través de un filtro tipo HEPA (high efficiency particle air, partículas de aire de alta eficiencia), la cual garantiza un trabajo en un entorno completamente estéril, evitando la contaminación durante el proceso de transferencia del explante a condiciones de *in vitro*

Área de Crecimiento: es el área a la que se transfiere el material propagado (sembrado en el medio de cultivo) a una temperatura promedio de 20°C ± 2°C,

iluminación de 1000 lux y 70 % de humedad relativa. El fotoperiodo es de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

IV.2. Material Experimental

IV.2.1. Material Vegetal

El material vegetal empleado en el presente estudio, fue el Olluco (*Ullucus tuberosus*, Loz.), ecotipo Achacachi, material sobresaliente por su aptitud productiva y amplia disseminación y uso en el área de colección. El ecotipo mencionado fue colectado durante la campaña 2009-2010, el cual presento características sobresalientes en el color de la superficie de los tubérculos, siendo este de color amarillo con coloración secundaria rojo-pálido sobre los ojos, la coloración de la pulpa de este tubérculo es amarilla y la forma del tubérculo es cilíndrica, estas características presentada por este ecotipo es el más aceptado en el mercado sobre todo en la ciudad de La Paz, por lo que los pobladores de esta zona pueden comercializarlo con mucha facilidad y aun buen precio, además lo emplean para su propio consumo. El material fue conservado en condiciones adecuadas hasta el momento de introducción a condiciones de *in vitro*.

IV.2.2. Materiales de Laboratorio

Equipos: los equipos empleados para la realización del presente estudio fueron los siguientes; autoclave, cámara de flujo laminar de aire, estereoscopio, balanza de precisión, refrigerador, microondas, pHmetro, termómetros de máximas y mínimas, vernier digital y mufla.

Instrumentos: se requirió los siguientes instrumentos; pinzas de punta fina y punta gruesa, mangos de bisturí, hojas de bisturí # 11 y espátulas.

Cristalería: los materiales utilizados fueron; pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml; cajas petri; tubos de ensayo; probetas de 10, 50 y 250 ml; vasos de precipitados de 100, 250, 400 ml, Matracas erlenmeyer de 250 y 500 ml y varilla de vidrio.

Implementos: se utilizó los siguientes; papel aluminio y periódico, picetas, Atomizador, marcadores indelebles, cerillos, algodón, magetas, mechero para alcohol, lapicero y otros.

Material químico: en el presente estudio se emplearon los siguientes materiales; sales del medio basal Murashige y Skoog (1962), sacarosa, agar-agar, reguladores de pH (Ácido Clorhídrico y Cloruro de Sodio), Alcohol al 70 y 96 %, Hipoclorito de Sodio y Agua destilada.

IV.3. Metodología

Fase 1. Preparación del material experimental

El material genético colectado, fue seleccionado, se tomó en cuenta solo tubérculos sanos, descartando aquellos con presencia de daño mecánico o necrosados. El mismo, fue lavado con agua destilada, con el propósito de quitar restos de tierra u otros. Inmediatamente se procedió al secado respectivo de los tubérculos, exponiéndolos directamente a la radiación solar durante 2 horas. Los tubérculos seleccionados, lavados y secos fueron cubiertos con papel periódico, para luego depositarlos en un lugar seco, proporcionándole condiciones de oscuridad, durante 15 días, tratamiento que fue adoptado para facilitar y estimular la brotación.



Figura 6. Tubérculos con presencia de brotes, colectados de la localidad de Achacachi, durante la campaña 2009-2010, mismos que constituyen el material genético para el presente estudio.

Fase 2. Preparación y esterilización del medio de cultivo (MC)

Preparación de los ambientes de trabajo: para efectos de asegurar un adecuado proceso de establecimiento, se procedió con la esterilización y desinfección de los equipos y materiales necesarios de las salas de: preparación de medio de cultivo, transferencia y crecimiento.

Preparación y distribución del medio de cultivo: el medio de cultivo que se utilizó en este estudio fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se lo preparó de forma convencional (Anexo 1), suplementado con fuente de carbono para lo cual se empleo la sacarosa al 3%, posteriormente se ajusto el pH, del medio de cultivo (a un rango de 5.6 a 5.8), luego se añadió Agar-agar como material de soporte, en una proporción de 0.60% p/v. La solución preparada se distribuyó en tubos de ensayo en un volumen de 3 ml/ tubo y se procedió a sellarlos con papel aluminio para evitar el ingreso de algún microorganismo que se pudiese encontrar en el ambiente.

Esterilización de los materiales: para la esterilización se utilizó el Autoclave, en el cual se introdujo; el medio de cultivo anteriormente preparado; implementos y cristalería necesaria como mangos de bisturí, pinzas, cajas petri y otros, para el efecto de esterilizado el autoclave alcanzo una temperatura de 121°C y 15 psi de presión.

Fase 3. Desinfección del material vegetal

Se procedió a seccionar los brotes del tubérculo de Olluco, los cuales fueron previamente lavados con jabón desinfectante 3 veces, más agua destilada operación que se realizó fuera de la cámara de flujo laminar.

Para la desinfección del material vegetal, se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 3% y alcohol al 70%, los mismos fueron localizados en la plataforma de trabajo de la cámara de flujo laminar. En este mismo espacio, se situó materiales para la siembra (bisturí, mechero, pizas, caja petri, tres vasos con agua estéril, algodón, plastifilm, encendedor y otros). Todo el material dispuesto en la cámara de flujo laminar, fue irradiado con luz U.V. durante 15 minutos para su respectiva esterilización antes de la desinfección del material vegetal.

Se desinfectó el material vegetal en alcohol al 70% por 45 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 3% por 20 minutos, a continuación se enjuago en agua destilada estéril en tres ocasiones (en cada uno por un lapso de 5 min.). Una vez desinfectado el material vegetal, este se mantuvo en condiciones de completa asepsia.

Fase 4. Establecimiento de los brotes a condiciones *in vitro*

Luego de la desinfección superficial, se realizó la siembra de las yemas que se disponían en los brotes cortándolos con el bisturí sobre la caja petri en tamaños de 5 mm tratando de no dañarlas y usando la pinza se sembró en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), un explante por tubo de ensayo, luego se flameó el contorno del tubo de ensayo con el explante sembrado y se sello con plastifilm, una vez concluido este procedimiento, se rotuló los tubos con los siguientes datos: repetición y fecha de siembra, posteriormente se los traslado a la sala de crecimiento a 20 ± 2 grados centígrados, 70% de humedad y 16 horas luz a una intensidad lumínica de 1000 lux, por el espacio de 45 días.

Fase 5. Multiplicación *in vitro*

Preparación de los ambientes y material de trabajo

Para tal efecto se realizo las mismas actividades de la fase 1.

Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del MC se efectuó el mismo procedimiento de la fase 2.

Propagación *in vitro* de los tipos de explantes

Una vez obtenidas las vitroplantas a partir de los brotes en la etapa de establecimiento *in vitro*, se procedió a la multiplicación de la misma, diferenciando tres tipos de explantes:



Figura 7. Flujo de los procedimientos empleados en el presente experimento

Explanete Apical: para la siembra de este explanete se tuvo mucho cuidado ya que el meristemo apical de las vitroplantas son muy pequeñas, por lo cual se realizo el corte de la misma con la ayuda de un estereoscopio, primero se realizo cortes eliminando los primordios foliares mas las hojas existentes alrededor del meristemo apical, luego se procedió al corte de 0.5 cm aproximados desde el meristemo obteniendo el tipo de explanete apical, este se lo sembró en un tubo de ensayo que contenía MC, luego se flameo el contorno de dicho tubo y se sello, finalmente se lo rotulo y se lo llevo a la sala de crecimiento.

Explanete Medial: para la obtención de este tipo de explanete, se conto el número de hojas de la vitroplanta, teniendo en cuenta la formación de yemas primarias en las

axilas de las hojas, posteriormente se identifico tres yemas localizadas en el centro de la vitroplanta (explantes mediales), una vez realizado esto, se procedió al corte con un bisturí No. 11 y pinzas estériles, las hojas fueron eliminadas y al tallo se le realizaron cortes diagonales, extrayendo trozos de 0.5 cm aproximados de largo que incluían una yema axilar (nudo), las cuales fueron sembradas en tubos de ensayo con MC, para luego flamearlas, sellarlas con plastifilm, rotularlas y llevarlas a la sala de incubación.

Explante Basal: la obtención de este explante se realizo cortando las dos primeras yemas ubicadas en la base de la vitroplanta de tamaño de 0.5 cm aproximados, el corte se lo realizo con el cuidado de no maltratar estas yemas, ya que son muy frágiles y pequeñas. Luego se procedió a la siembra en MC de este explante, posteriormente se flameo y se sello, todo este trabajo se lo realizo dentro de la cámara de flujo laminar, seguidamente se rotulo los tubos con los siguientes datos: tratamiento, repetición y fecha de siembra.

Posteriormente fueron traslado a la sala de crecimiento, a 20 ± 2 grados centígrados, 70% de humedad y 16 horas luz a una intensidad lumínica de 1000 lux, por el espacio de 60 días.

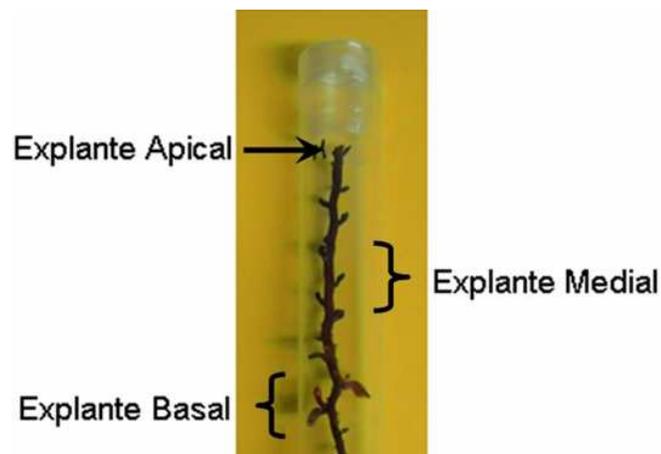


Figura 8. Identificación del tipo de explante de acuerdo a su posición en la vitroplanta

IV.4. Análisis estadístico

El presente estudio se realizó en laboratorio y se empleó el tipo de diseño experimental. Diseño Completamente al Azar, con 10 repeticiones como mínimo por cada tratamiento.

IV.4.1. Modelo lineal aditivo

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

Donde:

Y_{ij} = Una observación cualquiera

μ = Media general

α_i = Efecto del i -ésimo tipo de explante

ϵ_{ij} = Efecto aleatorio del Error experimental

Tratamientos

T1 = Explante 1: Corte de la sección apical

T2 = Explante 2: Corte sección medial

T3 = Explante 3: Corte sección basal

IV.4.2. Variables de respuesta

Numero de hojas (NH): Se contó el número total de hojas de cada vitroplanta durante toda la fase de multiplicación.

Altura de vitroplanta (AP): La altura de vitroplantas se registró, midiendo desde el cuello (límite entre el tallo y la raíz) hasta la parte terminal (apical) de la vitroplanta, esta evaluación se realizó en los tres tipos de explantes.

Diámetro de tallo en la parte apical (DTA): El diámetro de tallo en la sección apical se registró en milímetros, a los 45 días después de su siembra.

Diámetro de tallo en la parte medial (DTM): Se registro el diámetro de tallo, con la ayuda de un vernier digital, en la parte central de la longitud total del tallo de la vitroplanta.

Diámetro de tallo en la parte basal (DTB): El diámetro de tallo basal se registró en milímetros, en la sección basal de la vitroplanta.

Peso húmedo de biomasa (PHB): se corto la vitroplanta por el cuello y se peso la parte verde total (Fresco) en mg.

Peso seco de biomasa (PSB): se procedió al secado de la biomasa de vitroplanta, con la ayuda de la mufla, para luego registrar los pesos secos en mg.

Longitud de raíz (LR): la longitud de raíz fue determinada, midiendo en mm desde el cuello (separación de la planta y raíz) de la vitroplanta hasta la punta de las raíces.

Peso húmedo de biomasa radicular (PHR): para registrar este dato se procedió a pesar las raíces de cada vitroplanta en una balanza de precisión obteniendo el PHR en mg.

Peso seco de biomasa radicular (PSR): se registro el peso de las raíces, que previamente fueron secadas en la mufla.

Distancia entre entrenudos en la parte apical (DEA): se midió en milímetro, las distancias de separación de cada nudo en el tallo de la vitroplanta, ubicadas en la sección apical.

Distancia entre entrenudos en la parte medial (DEM): Se registro, las distancias de separación entre nudos en la sección medial de la vitroplanta.

Distancia entre entrenudos en la parte basal (DEB): se realizo la medición con la ayuda de un vernier digital, de la separación entre nudos en la sección basal.

Color de Hoja (CH): considerando que esta variable es cualitativa, se designo valores de cuantificación para el análisis de tonalidades, tomando en cuenta la siguiente escala de valores:

Verde claro = 1

Verde intermedio = 2

Verde oscuro = 3

Color de tallo (CT): es una variable cualitativa, por lo que se designo valores de cuantificación para el análisis de tonalidades de los tallos, tomando en cuenta la siguiente escala de valores:

Verde = 1

Rojo grisáceo predominante con verde = 2

Rojo grisáceo = 3

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. Estadística descriptiva de las variables en estudio

El comportamiento de las variables en términos de estadística descriptiva (Tabla 2), destaca que el NH y la AP promedio general de vitroplantas fue de 18.83 unidades y 83.67 mm respectivamente, con una variación promedio de ± 2.44 y ± 13.1 mm respectivamente. En ambas variables, se puede apreciar que el comportamiento en términos de función en la distribución (normalidad), se encuentra cerca de los parámetros permisibles, fortaleciendo la operacionalización de las mismas a través del empleo de un análisis paramétrico. La dispersión absoluta de las variables se encuentra dentro el marco de lo esperado, donde un margen del 10% es reportado para experimentos de la naturaleza del presente.

En la misma tabla podemos observar que las variables DTA, DTM y DTB obtuvieron un promedio de 1.28, 1.73 y 1.27 mm respectivamente, los cuales presentan una variación promedio de ± 0.19 , ± 0.13 y ± 0.23 mm respectivamente. En estas variables, se puede notar que el comportamiento en función de la distribución normal, se encuentran en los rangos válidos, optimizando los cálculos de dichas variables con el empleo de un análisis paramétrico.

En la tabla 2, podemos observar que las variables DTA, DTM y DTB obtuvieron un promedio de 1.28, 1.73 y 1.27 mm respectivamente, los cuales presentan una variación promedio de ± 0.19 , ± 0.13 y ± 0.23 mm respectivamente. En estas variables, se puede notar que el comportamiento en función de la distribución normal, se encuentran en los rangos válidos, optimizando los cálculos de dichas variables con el empleo de un análisis paramétrico.

Las variables DTA, DTM y DTB (tabla 2) obtuvieron un promedio de 1.28, 1.73 y 1.27 mm respectivamente, los cuales presentan una variación promedio de ± 0.19 , ± 0.13 y ± 0.23 mm respectivamente. En estas variables, se puede notar que el comportamiento en función de la distribución normal, se encuentran en los rangos válidos, optimizando los cálculos de dichas variables con el empleo de un análisis paramétrico.

Tabla 2. Estadística descriptiva para variables de respuesta: número de hojas (NH); altura de planta (AP); diámetro de tallo en la parte basal (DTB); diámetro de tallo en la parte medial (DTM); diámetro de tallo en la parte apical (DTA); peso húmedo de biomasa (PHB); peso seco de biomasa (PSB); longitud de raíz (LR); peso húmedo de biomasa radicular (PHR); peso seco de biomasa radicular (PSR); distancia entre entrenudos en la parte basal (DEB); distancia entre entrenudos en la parte medial (DEM); y distancia entre entrenudos en la parte apical (DEA), evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.

ID	Variables	Promedio	Mediana	DE	Sesgo	Curtosis	Rango	Mín.	Máx.
1	NH	18,83	18,00	2,44	1,53	2,92	9,00	16,00	25,00
2	AP [†]	83,67	87,00	13,11	-0,08	-1,60	36,00	66,00	102,00
3	DTB [†]	1,27	1,25	0,23	-0,27	-0,85	0,74	0,85	1,59
4	DTM [†]	1,73	1,73	0,13	-0,13	-1,45	0,39	1,52	1,91
5	DTA [†]	1,28	1,32	0,19	-0,06	-1,85	0,49	1,03	1,52
6	PHB [‡]	231,73	243,75	38,76	-1,54	3,38	153,60	133,70	287,30
7	PSB [‡]	47,57	48,35	6,94	-1,03	1,51	24,90	31,50	56,40
8	LR [†]	112,71	111,40	25,15	0,15	-1,31	71,80	79,90	151,70
9	PHR [‡]	59,27	61,60	13,52	0,56	0,62	49,40	39,10	88,50
10	PSR [‡]	10,64	10,35	2,36	0,41	0,24	8,40	7,00	15,40
11	DEB [†]	4,63	4,58	0,85	0,19	-0,83	2,62	3,40	6,02
12	DEM [†]	3,77	3,68	0,80	-0,02	-0,34	2,68	2,31	4,99
13	DEA [†]	5,01	5,44	1,18	-0,35	-1,16	3,32	3,35	6,67

[†] mm

[‡] mg

Las variables de PHB y PSB, presentan un promedio de 231.73 y 47.57 mg respectivamente, con una variación promedio con respecto a la media de ± 38.7 y ± 6.94 mg. La operacionalización a través de un análisis paramétrico se ve adecuado por los indicadores de normalidad, mismos que se encuentran entre los rangos de permisibilidad, exceptuando el coeficiente de curtosis de la variable PHB, que se presenta ligeramente distante de la distribución ideal, aspecto que puede deberse a las características de la muestra manipulada para efectos de su cuantificación, tomando en cuenta que los explantes apicales dada su constitución morfológica fueron de menor tamaño. La dispersión absoluta para las variables indicadas se encuentra dentro de los rangos esperados.

El análisis de las variable LR, PHR y PSR muestran los siguientes promedios generales, 112.71 mm, 59.27 y 10.64 mg respectivamente, con una variación promedio de ± 25.1 mm, ± 13.5 y ± 2.36 mg respectivamente. Estas variables presentan valores de sesgo y curtosis que se encuentran en el rango permisible en la distribución de la función normalizada, aspecto que favorece la continuidad del análisis de estas variables y presentan una dispersión absoluta, dentro de un rango del 10% esperado.

En la tabla 2, asimismo observamos que las variables DEA, DEM y DEB presentan un promedio general de 5.01, 3.77 y 4.63 mm respectivamente, los cuales presenta una variación de ± 1.18 , ± 0.80 y 0.85 mm respectivamente. La sistematización a través de un análisis paramétrico se ve adecuado por los indicadores de normalidad que son el sesgo y la curtosis, mismos que se encuentran entre los rangos permitidos en función a la normalidad.

V.2. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para NH, AP y LR.

En el estudio, se formuló una prueba de hipótesis con un error de Tipo I (α) que implica “rechazar hipótesis nula cuando hipótesis nula es verdad”. La operacionalización de las variables en función a la hipótesis antes mencionada, se presenta en la tabla 3. La comparación entre explantes para la variable NH, presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0059$) que denota un efecto diferencial del tipo de explante en la manifestación morfológica de número de hojas. El coeficiente de variación alcanza al 8.11%, aspecto que fortalece la inferencia de la misma respecto al factor en estudio. Así mismo, indicar que el coeficiente de determinación proyecta una explicación de la varianza en función de los factores en estudio del presente en un 68%, dejando un margen de influencia de factores no contemplados en el estudio del 32%.

El promedio y dispersión correspondiente a las variables número de hojas se presenta en la fig. 9, en la misma se acompaña la prueba de promedio de rango múltiple de Duncan, donde la comparación secuencial de número de hojas promedio para los tres tipos de explante respecto a la amplitud mínima significativa (AMS) viene representada

por letras minúsculas, que denotan que promedios unidos por la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 3. Análisis de varianza para las variables numero de hojas (NH); altura de planta (AP); longitud de raíz (LR) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.

Fuentes de Variación	Cuadrado Medio						
	GL	NH	p^{\dagger}	AP	p^{\dagger}	LR	p^{\dagger}
Explante	2	22.33	0.0059	675.58	0.0035	5011.94	0.0032
Dentro de Explantes	27	2.33		59.94		215.93	
Coef. Variación. (C.V)		8.11		9.25		13.04	
Coef. Determinación. (R^2)		68.00		71.46		72.00	

$^{\dagger} p > F$

Por lo anteriormente mencionado, se infiere que el numero de hojas proporcionado por el tipo de explante “apical” es significativamente mayor que el numero de hojas proporcionada por los explantes de tipo medial y basal. El resultado anterior puede atribuirse a que el meristemo apical es un potente formador de primordios foliares, juntamente con la concentración elevada de la hormona vegetal auxina la cual influye en la iniciación de primordios foliares de los cuales se van formando las hojas como indica (Segura, J. 2000).

Se debe tomar en cuenta que en el meristemo apical se sintetizan de forma natural la hormona vegetal auxinas por lo cual se puede decir que este tipo de explante apical contiene una mayor cantidad de auxinas a diferencia del medial y basal.

El análisis en la variable AP, presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0035$) que expresa la diferencia entre los tipos de explantes en la expresión morfológica, altura de planta. El coeficiente de variación alcanzo un 9.25 %, aspecto que afirma los resultados de la misma respecto a la los tipo de explante. Así mismo, indicar que el coeficiente de determinación proyecta una explicación de la varianza en función de los factores en estudio del presente en un 71%, dejando un margen del 29% a otros agentes no contemplados en el estudio.

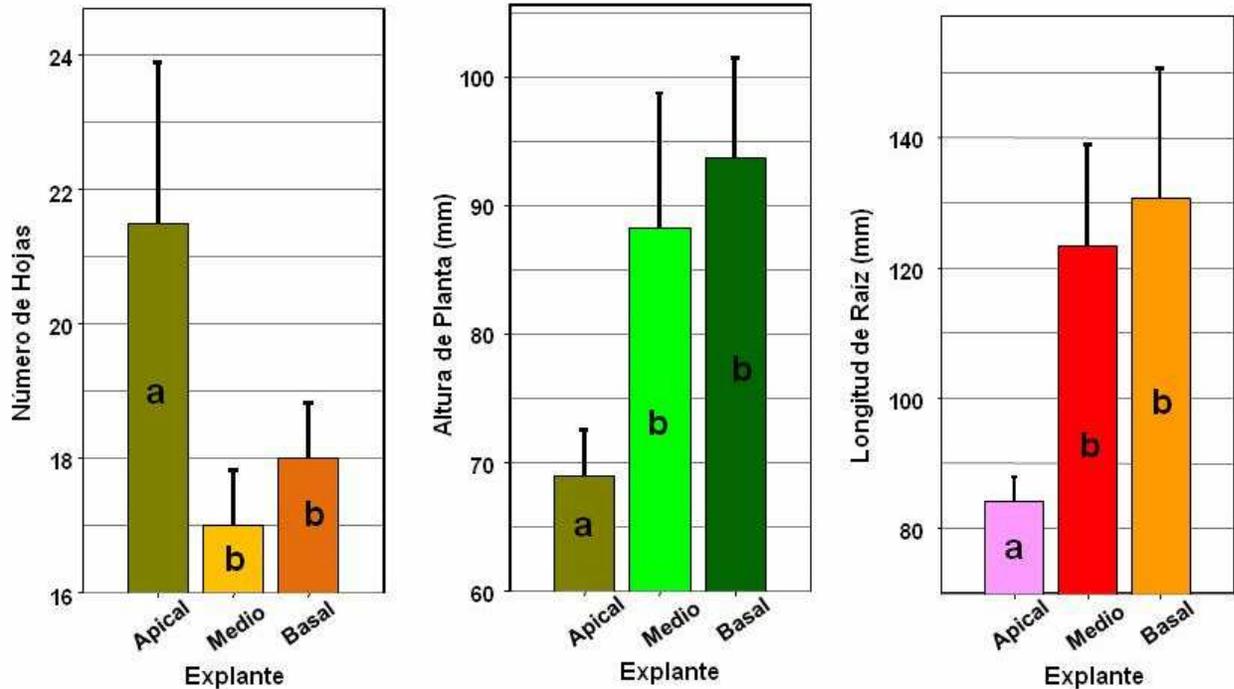


Figura 9 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables número de hojas, altura de planta y longitud de raíz evaluadas en la fase de desarrollo

La variable AP muestra una dispersión y promedio que se presenta en la fig. 9, donde la comparación secuencial de AP promedio para los tres tipos de explante respecto a la AMS viene representada por letras minúsculas, que indican que promedios unidos por la misma letra no son significativamente diferentes. Por lo anteriormente mencionado, se observa que la altura de planta, en los tipos de explante "Medial y Basal" son mayores a comparación del explante apical este resultado puede atribuirse a la concentración de hormonas endógenas de los explantes Medial y Basal, puesto que la parte de la planta que fueron extraídos generalmente presentan mayor cantidad de citoquinina, las cuales estimulan el proceso de división celular, incitando el crecimiento longitudinal de la planta. Para corroborar lo indicado anteriormente debemos mencionar que la citoquininas es producida en los ápices de las raíces y se translocan hasta el tallo por el xilema, por lo cual podemos exteriorizar que los explantes Basales y Mediales pueden presentar mayor concentración de esta hormona.

En cuanto al explante apical se observa que tiene un menor desarrollo de altura de planta con respecto a los explantes Medial y Basal, este aspecto puede ser fácilmente atribuido al tipo de corte que se realizó, puesto que en el presente estudio se eliminó los primordios foliares y se empleó un medio de cultivo (MS) al cual no se suplementó ningún tipo de hormona sintética.

Según Conci, V. 2010, cuanto más pequeño sea el meristemo (explante) más difícil será encontrar el medio de cultivo adecuado que permita un buen desarrollo, además se ha observado que sembrar sólo el domo meristemático, en general no da buenos resultados en su desarrollo. Por lo anteriormente mencionado, se puede afirmar que el explante apical presenta menor desarrollo en la característica morfológica AP, además en los meristemas apicales se tiene mayor concentración de auxinas, y en algunos casos se tiene la presencia de la hormona, ácido abscísico que es un inhibidor del crecimiento, lo cual podría haber influido en la característica mencionada.

El análisis de la (tabla 3) presenta una diferencia estadística significativa de ($p > 0.0032$) en la variable LR, que denota un efecto diferencial del tipo de explante en la longitud de raíz. El coeficiente de variación alcanza al 13.04%, aspecto que fortalece la inferencia de la misma respecto al factor en estudio. Así mismo, indicar que el coeficiente de determinación proyecta una explicación de la varianza en función de los factores en estudio del presente en un 72%, dejando un margen de influencia de factores no contemplados en el estudio del 28%.

El promedio y dispersión correspondiente a las variables longitud de raíz se presenta en la fig. 9, donde la comparación secuencial de longitud de raíz promedio para los tres tipos de explante respecto a la (AMS) viene representada por letras "a" y "b" que indica que promedios unidos por la misma letra no son significativamente diferentes, letras diferentes indican diferencia significativa. En la figura se observaba que el promedio de la LR del explante apical está representada por la letra "a" y "b" representa la longitud de raíz de los explantes medial y basal. Por lo anteriormente mencionado, se indica que la longitud de raíz de los explantes medial y basal presenta mayor longitud, a diferencia del explante apical que tiene menor desarrollo de LR.

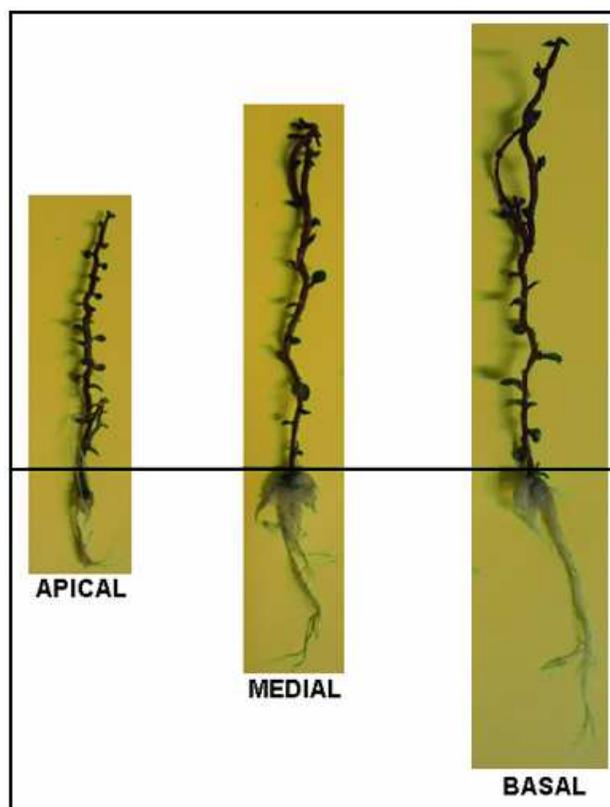


Figura 10 Vitroplantas de Olluco, micropropagadas a partir de tres tipos de explantes: apical, medial y basal

Este resultado puede atribuirse a que las raíces en cultivo *in vitro* son adventicias, y que en los explantes extraídos de la parte basal y medial, presentaban una iniciación de pequeñísimas raíces las cuales se desarrollaron una vez que estos explantes fueron cultivados en el medio de cultivo (MS) obteniendo mayor desarrollo en la característica morfológica longitud de raíz, a diferencia del explante apical que se encuentra en la parte superior del tallo, esta no presenta raíces adventicias por lo que la formación y desarrollo de sus raíces se da en mayor tiempo el cual explica su menor desarrollo como se muestra en la figura 10.

V.3. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para DTB, DTM y DTA.

El análisis del variable diámetro de tallo en la parte basal DTB, se presenta en la tabla 4. En la que la comparación entre explantes para la variable DTB, presenta una

diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0028$) que indica un efecto diferencial del tipo de explante en la manifestación morfológica DTB. El coeficiente de variación alcanza al 10.45%, aspecto que fortalece la inferencia de la misma respecto al factor en estudio. Así mismo, indicar que el coeficiente de determinación proyecta una explicación de la varianza en función de los factores en estudio del presente en un 73%, dejando un margen de influencia de factores no contemplados en el estudio del 27%.

Tabla 4. Análisis de varianza para las variables diámetro de tallo en la parte basal (DTB); diámetro de tallo en la parte medial (DTM); diámetro de tallo en la parte apical (DTA) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.

Fuentes de Variación	Cuadrado Medio					
	DTB	p^{\dagger}	DTM	p^{\dagger}	DTA	p^{\dagger}
Explante	0.214	0.0028	0.062	0.0089	0.138	0.0065
Dentro de Explantes	0.017		0.007		0.015	
Coef Variación. (C.V)	10.45		4.99		9.52	
Coef. Determinación. (R^2)	73.00		65.00		67.37	

$^{\dagger} p > F$

El estudio de la variable DTB en función al promedio y dispersión se lo presenta en la (figura 11), la misma cuenta con la prueba de promedio de rango múltiple de Duncan, donde la comparación secuencial del diámetro de tallo basal, promedio para los tres tipos de explante respecto a la amplitud mínima significativa (AMS) viene representada por las letras “a” y “b” minúsculas, que indican que promedios unidos por la misma letra no son significativamente diferentes y promedios con diferentes letras presentan una diferencia significativa. Por lo anteriormente mencionado, se deduce que el diámetro de tallo basal proporcionado por el tipo de explante “basal y medial” es significativamente mayor que el diámetro de tallo proporcionado por el explante apical.

El análisis en la variable DTM, presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0089$) que expresa la diferencia entre los tipos de explantes en la expresión morfológica, diámetro de tallo medial, con un coeficiente de variación de 4.99 %. Así mismo, indicar que el coeficiente de determinación proyecta una explicación del 65% de la varianza en función de los factores, tipos de explantes presentados en el estudio,

dejando un margen del 35 % a otros factores que pudieron influenciar y que no son contemplados en presente estudio.

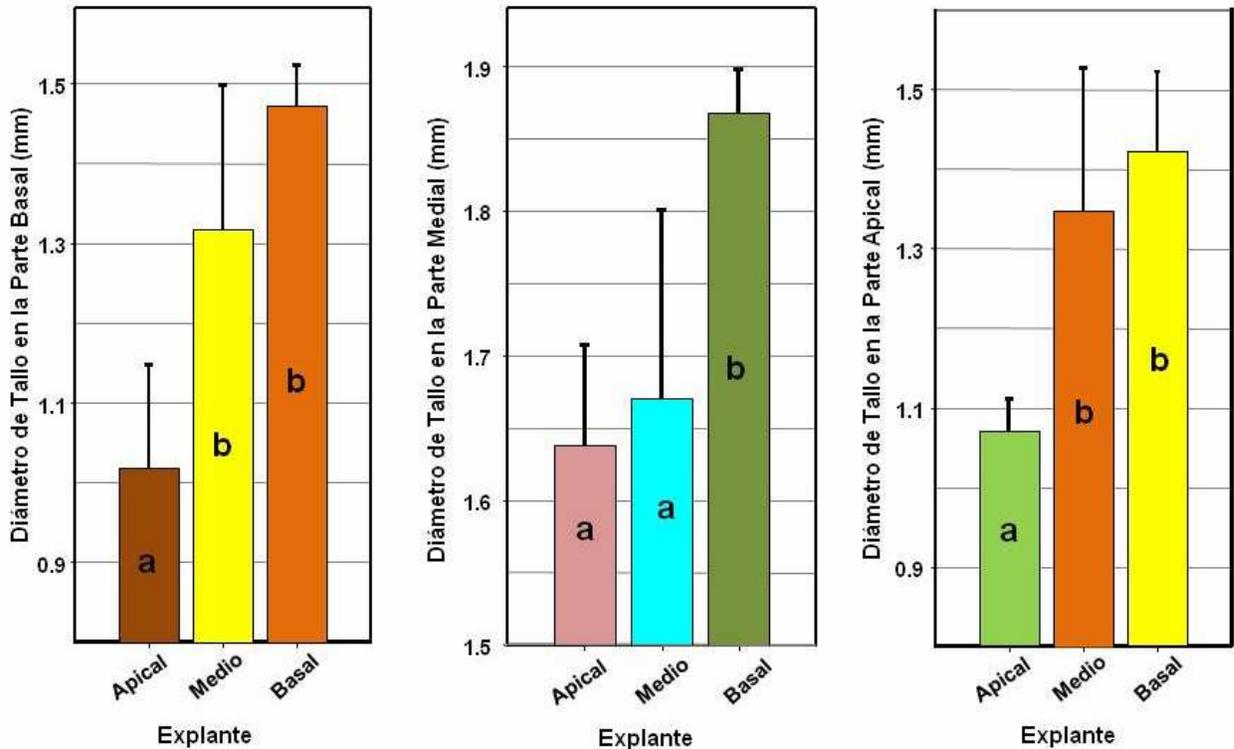


Figura 11 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables diámetro de tallo en la parte basal, diámetro de tallo en la parte medial, diámetro de tallo en la parte apical, evaluadas en la fase de desarrollo

En la figura 11 se observa el promedio y dispersión correspondiente al variable diámetro de tallo en la parte medial DTM, de las vitroplantas obtenidas a partir de tres tipos de explantes, en la misma se acompaña la prueba de promedio de rango múltiple Duncan, donde la comparación secuencial del diámetro de tallo medial, promedio para los tres tipos de explantes, viene representada por letras minúsculas, que denotan que promedios con diferente letra son significativamente diferentes, por lo cual se identifica al explante basal, con mayor diámetro de tallo en la parte medial a diferencia de los explantes apical y medial que obtuvieron menor diámetro de tallo en su desarrollo morfológico.

El análisis en la variable DTA, presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.0065$) que enuncia la diferencia entre los tipos de explantes en la característica diámetro de tallo apical, el mismo presenta un coeficiente de variación de 9.52 % aspecto que fortalece los resultados presentados por la variación existentes entre los tipos de explantes, a si mismo se indica el coeficiente de determinación que proyecta una explicación de la varianza en función a los tipos de explantes presentados en el estudio con un 67.37%, dejando un margen del 32.63 % a otros factores que no fueron contemplados en el estudio.

El promedio y dispersión correspondiente a las variables diámetro de tallo en la parte apical(DTA) se lo presenta en la (figura 11), donde la comparación secuencial de diámetro de tallo apical promedio para los tres tipos de explante, están representada por barras de diferentes colores, donde la barra amarillo y naranja representan el desarrollo del DTA de las vitroplantas a partir de los explantes medial y basal respectivamente y la barra de color verde representa al desarrollo de la vitroplanta apical. Por lo anteriormente mencionado, se identifica a los explantes medial y basal los cuales obtuvieron mayor desarrollo en la variable DTA, a diferencia del explante apical que presenta menor desarrollo en su DTA. Este resultado es efecto de los tipos de explantes, ya que el explante apical generalmente es pequeño en todas sus dimensiones, es por eso que presenta menor desarrollo del diámetro de tallo en esta región, sin embargo los explantes mediales y basales son extraídas de yemas axilares de las hojas, siendo una de sus funciones la formación de tallos, las cuales presentan mayor desarrollo en su grosor.

V.4. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para DEB, DEM y DEA.

En la (tabla 5) se presenta el análisis de las variables DEB, DEM y DEA la cual presenta los siguientes resultados:

En la variable distancia entre nudo basal (DEB), la comparación entre explantes presento una diferencia estadísticamente significativa de ($p > 0.021$) que indica una diferencia de los tipos de explantes, en la variable morfológica distancia entre nudo

basal con un coeficiente de variación de 13.23%, aspecto que afirma lo indicado al respecto del factor en estudio, en la misma tabla se indica, el coeficiente de determinación manifestando una explicación de la varianza en función de los tipos de explantes en un 57.56%, dejando un margen de influencia de los factores no contemplados en el estudio con el porcentaje restante.

En esta misma variable se realizó el análisis de promedio y dispersión presentado en la (figura 12), la cual indica que el desarrollo morfológico de DEB de los tres tipos de explantes están representados por letras minúsculas, y que explantes con la misma letra no presentan una diferencia significativa, por lo que se puede observar que la variable DEB de los explantes medial y basal no presentan una diferencia significativa y presentaron mayor distancia entre nudos basal, al comparar con el explante apical se observa que este presenta menor desarrollo de la variable en estudio. Aspecto que puede estar influenciado por la distribución de hormonas vegetales, existentes en cada sección de la vitroplanta empleada para la obtención de los tres tipos de explantes. Tomando en cuenta que la hormona vegetal giberelinas son las que determinan la formación de los nudos.

Tabla 5. Análisis de varianza para las variables distancia entre entrenudos en la parte basal (DEB); distancia entre entrenudos en la parte medial (DEM); y distancia entre entrenudos en la parte apical (DEA) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.

Fuentes de Variación	Cuadrado Medio					
	DEB	p^{\dagger}	DEM	p^{\dagger}	DEA	p^{\dagger}
Explante	2.28	0.0211	2.67	0.0017	6.77	0.0001
Dentro de Explantes	0.37		0.19		0.21	
Coef Variación. (C.V)	13.23		11.56		9.17	
Coef. Determinación. (R^2)	57.56		76.00		88.00	

$^{\dagger} p > F$

El análisis de la variable distancia entre nudo medial (DEM), muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los tipos de explantes, de ($p > 0.0017$), que denota un efecto diferencial de los tratamientos planteados en el presente estudio en la variable

de DEM, siendo su coeficiente de variación de 11.56%, este valor fortalece lo anteriormente mencionado y el coeficiente de determinación alcanzo un 76.00%, el cual indica el porcentaje de explicación de la varianza en función de los tipos de explantes planteados en el estudio.

En la figura 12 podemos observar el promedio y dispersión correspondiente a la variable DEM, en el cual los tipos de explantes están representados por letras minúsculas y barras de distinto color, siendo la barra de color rosa la que obtuvo mayor distancia entre nudo en la parte medial, esta barra representa al desarrollo de la vitroplanta obtenida a partir del explante basal, y las barra con la letra minúscula “a” no son representativamente diferentes, las cuales presentaron menor distancia entre nudo en la parte medial, estas barras representan a los explantes apical y medial.

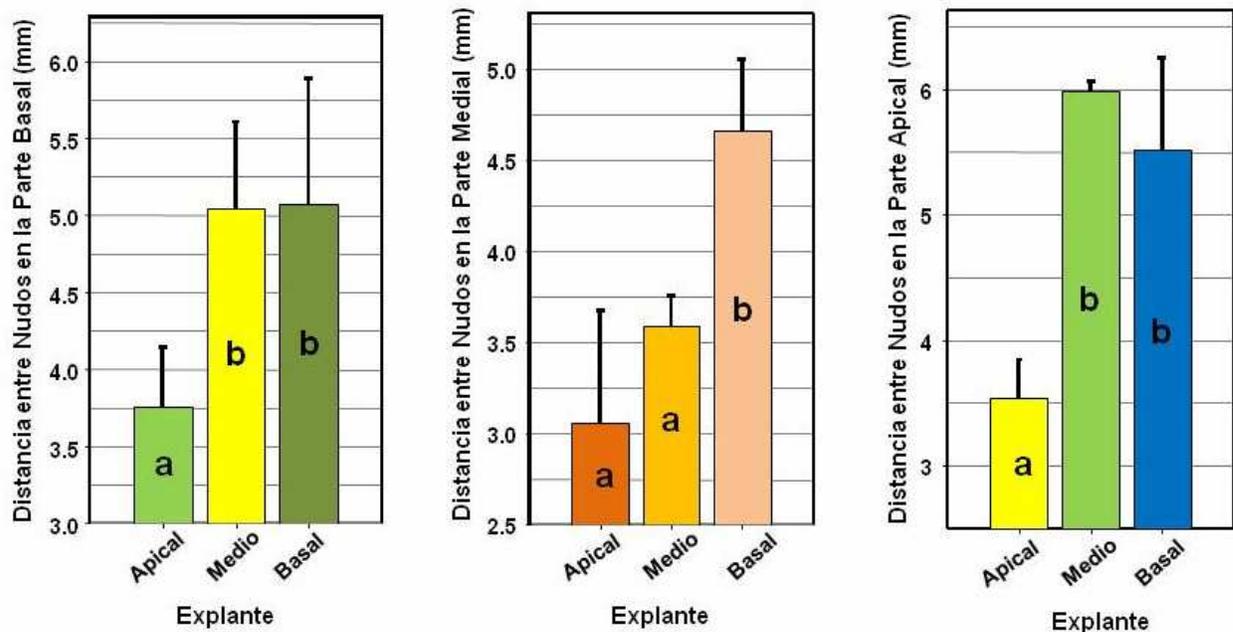


Figura 12 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables distancia entre entrenudos en la parte basal, distancia entre entrenudos en la parte medial y distancia entre entrenudos en la parte apical evaluadas en la fase de desarrollo.

La comparación de los tipos de explantes en el estudio, presenta una diferencia significativa en la variable distancia entre nudo en la parte apical de ($p > 0.0001$), que demuestra el efecto de diferencia de la variable DEA, existente entre los tratamientos

planteados en el estudio. El coeficiente de variación alcanza al 9.17%, aspecto que fortalece la inferencia de la misma respecto al factor en estudio, el coeficiente de determinación alcanza un 88%, el cual explica la diferencia presente entre los tipos de explantes empleados en el estudio.

En la misma variable se realizó el análisis de los promedios y dispersión (Duncan), de los tratamientos evaluados en el estudio, dando como resultado: en los explantes medial y basal, mayor distancia entre nudos en la parte apical, comparando con el explante apical este presenta menor DEA, estos resultados se lo puede atribuir a que en el explante apical se empleó el meristemo apical del tallo que generalmente está en constante división celular, formando primordios foliares, por lo tanto nudos, como esta formación es constante y rápida impide que la distancia entre nudo sea mayor que los explantes extraídos de las secciones Medial y basal.

V.5. Análisis de Varianza y Prueba de Promedios para PHB, PSB, PHR y PSR.

La operacionalización de la variable PHB se lo presenta en la tabla 6, en el cual la comparación entre los factores en estudio presenta una diferencia significativa de ($p > 0.033$), que proyecta una diferencia existente entre los tipos de explantes empleados, en la variable peso húmedo de biomasa, en la misma tabla podemos observar que el coeficiente de variación alcanzó un 12.67%, el cual afirma la diferencia que presentan los tipos de explantes, el coeficiente de determinación es el que proyecta una explicación del 53.05%.

El promedio y dispersión correspondiente a la variable peso húmedo de biomasa se lo presenta en la (figura 13), la misma está acompañada con la prueba de promedio Duncan, donde la comparación de PHB, promedio para los tres tipos de explantes respecto a la AMS viene representada por las letras minúsculas “a” y “b”, las cuales representan al promedio del PHB, de los tres tipos de explantes. Este tipo de análisis indica que letras iguales no presenta diferencia significativa respecto de los factores en estudio, por lo anterior explicado se puede observar que el peso húmedo de biomasa de los explantes medial y basal son relativamente iguales, obteniendo mayor peso

húmedo de biomasa respecto al PHB de las vitroplantas obtenidas a partir del explante apical. Este resultado se lo atribuye al desarrollo morfológico de las características tamaño, diámetro de tallo que fueron mayores en las vitroplantas obtenidas a partir de los explantes medial y basal.

Tabla 6. Análisis de varianza para las variables peso húmedo de biomasa (PHB); peso seco de biomasa (PSB); peso húmedo de biomasa radicular (PHR); peso seco de biomasa radicular (PSR) evaluadas en el estudio de identificación de explantes llevado a cabo durante la gestión 2010-2011 en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la UMSA.

Fuentes de Variación	Cuadrado Medio							
	PHB	p^\dagger	PSB	p^\dagger	PHR	p^\dagger	PSR	p^\dagger
Explante	4384.45	0.0333	137.40	0.0371	743.53	0.0024	21.01	0.0053
Dentro de Explantes	862.14		28.28		58.29		2.12	
Coef Variación. (C.V)	12.67		11.18		12.88		13.68	
Coef. Determinación. (R^2)	53.05		52.00		74.00		69.00	

$^\dagger p > F$

La variable PSB, muestra en la (tabla 6), una diferencia significativa de ($p > 0.037$) en el análisis estadístico, comparativo de los factores en estudio, en la misma podemos observar el coeficiente de variación del 11.18%, que expresa la diferencia presente de la variable PSB, en los tres tipos de explantes evaluados, también se observa el coeficiente de variación de 52 %.

El análisis de promedios y dispersión de la variable peso seco de biomasa, muestra que los explantes medial y basal presentan mayor PSB y no son significativamente diferentes, a diferencia del explante apical que presenta una diferencia significativa, ya que obtuvo menor peso seco de biomasa, estos resultados están muy relacionados con la variable del peso húmedo de biomasa.

El cálculo realizado, estadísticamente presenta una diferencia significativa para la variable peso húmedo de raíz de ($p > 0.0024$) el cual muestra el efecto de diferencia presentado en los diferentes tratamientos estudiados en el presente documento, teniendo un coeficiente de variación del 12.88%, este valor obtenido en este análisis

manifiesta, que realmente existe la diferencia, en la variable PHR, presentes en los tratamientos evaluados, además podemos destacar que el coeficiente de determinación tiene un 74% de explicación de la diferencia de la variable descrita, que presentan los diferentes tipos de explantes.

Para fortalecer lo anteriormente descrito al respecto de la variable PHR, se realizó el análisis de promedio y dispersión de esta variable, presentado en la figura 13, en la cual podemos observar que las raíces de los explantes medial y basal obtuvieron mayor peso húmedo, a diferencia del explante apical que presenta menor peso húmedo de raíz, este resultado está íntimamente relacionado con el desarrollo de la raíz en longitud, ya que se conoce que la LR obtenida por los explantes “medial y basal” anteriormente descrita obtuvieron mayor longitud de raíz, explicando la diferencia existente de los diferentes tipos de explantes.

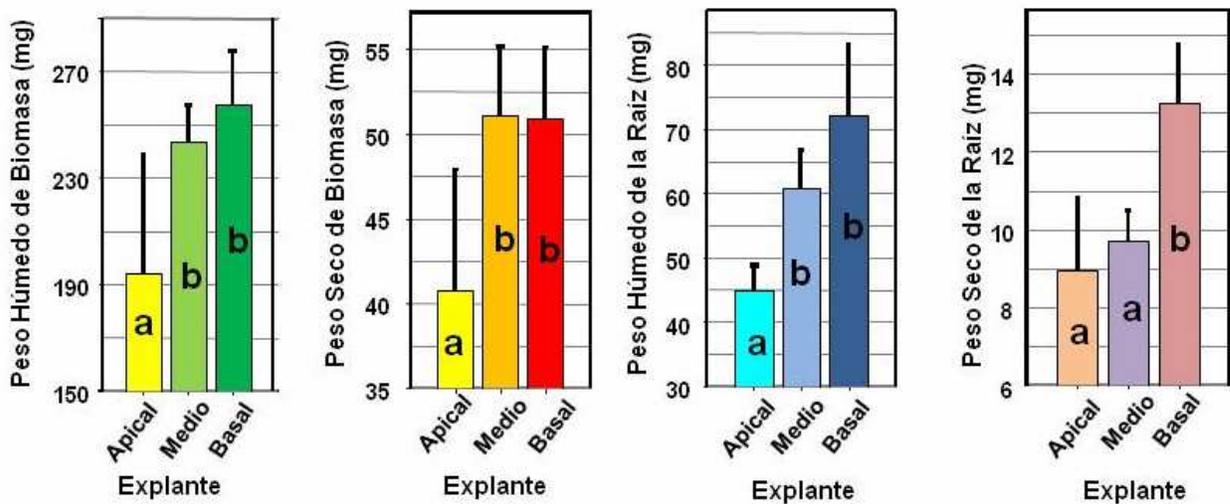


Figura 13 Promedio y dispersión promedio correspondiente a las variables peso húmedo de biomasa, peso seco de biomasa, peso húmedo de biomasa radicular y peso seco de biomasa radicular evaluadas en la fase de desarrollo.

La variable PSR manifiesta una diferencia significativa de ($p > 0.0053$), en el análisis estadístico realizado para los tipos de explantes, con un coeficiente de variación de 13.68%, el cual fortifica la diferencia de la variable pesos seco de raíz manifestada por los factores en estudio. A demás se tiene un coeficiente de determinación de 69%, el cual explica la varianza expresada por cada tipo de explante.

En la figura 13 se presenta el análisis de promedio y dispersión que corresponde a la variable PSR, en el que se observa que el explante basal presenta mayor pesos seco de raíz, a diferencia de los explantes apical y medial que obtuvieron menor peso seco de raíz, estos resultados presentados por la variable PSR, es la respuesta de la cantidad de humedad que presentaban las raíces en los tipos de explantes, se debe resaltar que las raíces son las que se alimentan de nutrientes y agua para suministrar a toda la planta.

V.6. Análisis de los componentes principales.

El análisis de componentes principales (CP) transformo el número de variables en dos componentes principales que integran variables no correlacionadas que explican el 56% y 16% para el primer y segundo componente principal respectivamente.

Las variables identificadas con el componente principal 1, están relacionadas a un mayor desarrollo vegetativo expresado en variables como: diámetro de tallo, peso de húmedo de biomasa, altura de vitroplanta, diámetro de tallo, entre otros. La expresión de estas variables está ligada al mayor desarrollo de explantes de origen basal y medial. Contrariamente, a la expresión identificada con el explante de origen basal; el explante de origen apical, por las observaciones realizadas en el presente estudio, se relaciona con un mayor desarrollo de foliolos, aspecto corroborado por la configuración de puntos en el biplot de la figura, donde se puede apreciar una estrecha correspondencia del vector que identifica al número de hojas con los puntos dispersos (1, 2, 3 y 4) del tratamiento de explante apical.

Estas observaciones realizadas y resultados obtenidos en el desarrollo vegetativo de los tipos de explantes, permite inferir que el desarrollo de las vitroplantas obtenidas a partir del meristemo apical manifiesta una permanente acción de dominancia apical y división constante de células, aspecto que es corroborado por un número significativo de primordios foliares a comparación de los explantes (5,6,7,8,9,10,11 y 12).

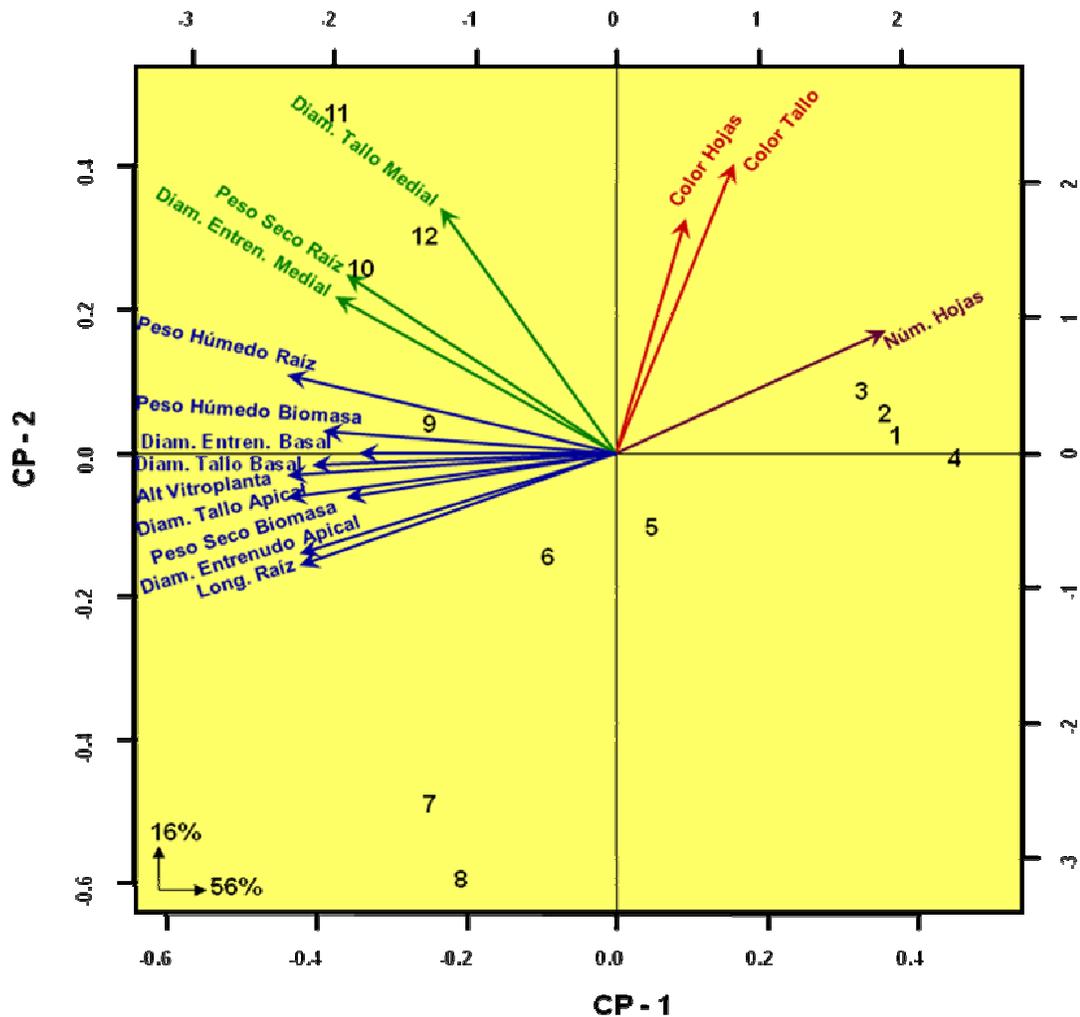


Figura 14. Biplot de dos componentes principales para las variables de respuesta evaluadas en función a tres tratamientos identificadas como, tipos de explantes apropiados para la propagación *in vitro* de Olluco. Los números (1, 2, 3 y 4) representan al explante apical; (5, 6, 7 y 8) al explante medial y (9, 10, 11 y 12) al explante basal.

Los explantes de origen medial y basal, dieron lugar a un mayor desarrollo con respecto a su biomasa, aspecto que podría estar íntimamente relacionado a su estructura anatómica y contenido de hormonas vegetales en dichos explantes, por lo anteriormente mencionado se debe aclarar que los explantes medial y basal son, provenientes de yemas axilares de diferentes secciones de vitroplantas establecida en condiciones *in vitro* a partir de brotes de tubérculos de Olluco, en dichas vitroplantas, se distribuyen diferentes, hormonas vegetales en distintas concentraciones, las cuales son sintetizadas por distintas partes de la misma vitroplanta. Otro factor que tiene influencia

en el desarrollo de estos explantes es la dominancia apical, ya que al realizar el corte, separando el meristemo apical de las secciones, medial y basal de la vitroplanta, este meristemo pierde la influencia de dominancia apical que ejercía, dando lugar al crecimiento y desarrollo de las yemas primarias axilares, las cuales tienden a formar biomasa o en algunos casos formar flores pero este no es el caso, las yemas axilares empleadas de la sección basal y medial (tipos de explantes) dieron lugar al mayor desarrollo de los tallos, distancia entre nudos, grosor de tallo, longitud de raíz que destacan en el análisis mostrado por el componente principal 1.

VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se evidenció diferencias morfológicas en las vitroplantas obtenidas a partir de tres tipos de explantes (Apical, Medial y Basal) en la fase de multiplicación, siendo estas características morfológicas presentadas por cada uno muy importantes para ser empleadas con éxito en distintas actividades tales como: la propagación masiva, limpieza de virus y conservación *in vitro* del cultivo de Olluco (*Ullucus tuberosus* Loz.).
- El uso de brotes de tubérculos de Olluco como material inicial para el establecimiento de vitroplantas fue muy favorable puesto que presentó muy poca o casi nada de contaminación, el cual también se debe al estado fitosanitario, manipuleo y desinfección de este material vegetal que fue sometido a condiciones *in vitro*.
- En la fase de multiplicación, las características morfológicas presentadas por la vitroplantas obtenidas a partir de tres tipos de explantes presentaron un comportamiento consistentemente diferencial para las variables: número de hojas, altura de planta, diámetro de tallo, peso húmedo de biomasa, peso seco de biomasa, longitud de raíz, peso húmedo de biomasa radicular, peso seco de biomasa radicular y distancia de entrenudos.
- Se encontró que el número de hojas, distancia entre nudos y altura de vitroplanta están estrechamente correlacionados entre sí, puesto que a mayor altura de vitroplanta con poca cantidad de hojas la distancia entre nudos será mayor o por lo contrario a menor altura de vitroplanta con gran cantidad de hojas la distancia entre nudos será menor.
- El explante apical sobresale en la comparación con las vitroplantas obtenidas a partir de los explantes Medial y Basal. Siendo este explante apical el que genero mayor numero de hojas lo cual es muy ventajoso en la propagación masiva y conservación de vitroplantas de Olluco, tomando en cuenta que en cada hoja

posee una yema axilar originadora de nuevas vitroplantas, los cuales son muy importante para la obtención potencial de nuevas vitroplantas en los siguientes sub cultivos.

- En lo referente a altura de vitroplanta, se observó que los explantes Medial y Basal son los que mejor desarrollaron esta característica, el cual influye en la posibilidad de las siguientes multiplicaciones o en la aclimatación de estas vitroplantas, teniendo en cuenta que para llevarlas al invernadero, las vitroplantas deben poseer un buen porte de las mismas, ya que serán trasladadas a condiciones diferentes, de laboratorio. El explante apical que desarrollo menor altura de vitroplanta es la mejor para fines de conservación *in vitro*.
- El diámetro de tallo manifiesta el porte y la capacidad de sobrevivencia en condiciones *in vitro*, en este estudio ninguno de las vitroplantas obtenidas a partir de los tres tipos de explantes presentaron una situación desfavorable.
- Se encontró que la biomasa total de las vitroplantas, no solo es el desarrollo de la materia orgánica, sino también depende de la absorción de elementos nutritivos inorgánicos (sales minerales) y agua que se encuentran en el medio de cultivo. La materia inorgánica, en peso, es cuantitativamente poco importante, pero lo es cualitativamente porque un déficit perjudica al desarrollo de las vitroplantas.
- Por lo que se pudo observar el comportamiento de las vitroplantas, obtenidas a partir de los explantes Mediales y Basales las cuales fueron sembradas en un medio de cultivo (MS), fueron las mejores, siendo las que obtuvieron un mayor peso húmedo de biomasa, esta característica es proporcionado por la: altura de vitroplanta, numero de hojas y diámetro de tallo.
- El peso seco de la biomasa generalmente es proporcional, al peso húmedo de biomasa, siendo esta una característica para la determinación de la cantidad de agua que presentan las vitroplantas.
- La longitud de raíz es una característica anatómica de las vitroplantas, siendo las que mayor importancia tienen en el momento de decidir si se trasladaran o no a

condiciones de invernadero, si estas no presentaran un buen tamaño de raíz, la posibilidad de sobrevivencia será en un porcentaje menor, a diferencia de los que si presentan un mayor tamaño de raíz que son las que mejor se adaptan, en diferentes condiciones de temperatura y humedad de ambiente, a las de laboratorio.

- En el presente estudio se observo que las vitroplantas, de origen Mediales y Basales son las que desarrollaron mayor tamaño en cuanto a la longitud de raíz, lo cual no significa que pueden ser trasladadas de inmediato a condiciones de invernadero pero son las que posiblemente requieran menor trabajo antes de ser llevadas a condiciones de invernadero.
- El peso húmedo de biomasa radicular de las vitroplantas obtenidas a partir de los explantes Mediales y Basales fueron los que mayor valor obtuvieron al respecto de las vitroplantas originadas por el explante apical, por lo anterior mencionado se puede inferir que las raíces son las que suministran agua y los nutrientes que requiere las vitroplantas para un buen desarrollo.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar cortes de los explantes apicales con uno o dos primordios foliares si el objetivo que se persigue es de obtener vitroplantas con un buen desarrollo en sus características morfológicas si el objetivo es la limpieza de virus, se puede emplear explantes de meristemas apicales de aproximadamente de 0.5 cm de tamaño, eliminando todos los primordios foliares ya que este tipo de explante no tiende a formar callos como el caso de algunas especies.
- Es recomendable utilizar explantes basales y mediales de 0.5 cm de tamaño el cual incluya la yema axilar más una parte del tallo, para la obtención de vitroplantas con características favorables en el desarrollo de la biomasa y longitud de raíz.
- Realizar un seguimiento en invernadero, para su aclimatación y posterior obtención de tubérculos del material vegetal que se sometió a cultivo *in vitro*.
- Es aconsejable el uso de explantes apicales para la obtención de mayor número de vitroplantas para los siguientes subcultivos en condiciones *in vitro*. Ya que son estas las que mayor número de yemas axilares van formando.
- Si bien la identificación del explante es muy importante para el desarrollo potencial de vitroplanta en la fase de multiplicación, es también necesario realizar otros estudios que complementen el ciclo de la producción de este cultivo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTO, M., J. SANCHEZ Y M. BANEN. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal: Auxinas. Barcelona. p. 378 - 388.
- AMES, T. 2004. El cultivo del Ulluco en la sierra central del Perú: Enfermedades Fungosas y Bacterianas y Principios para su Control. Lima, Perú. p. 13 - 31.
- ARBIZU, C. 2004. El cultivo del Ulluco en la sierra central del Perú: Clasificación y Morfología. Lima, Perú. p. 05 - 11.
- AYALA, G. 2004. Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación; Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Centro Internacional de la Papa, CIP. Lima, Perú. p. 101-112.
- AZCON, J. Y M. TALON. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc. Graw-Hill Interamericana. España 522 p.
- BARRERA, V., P. ESPINOSA, C. TAPIA, A. MONTEROS Y F. VALVERDE. 2004. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y Uso Sostenible en el Ecuador; Caracterización de las raíces y los tubérculos andinos en la ecoregión andina del Ecuador. Quito – Lima, Perú. p. 3 – 30.
- CADIMA, X. 2006. Botánica Económica de los Andes Centrales: Tubérculos. Universidad Mayor de San Andrés (UMSA). La Paz, Bolivia. p. 347-369.
- CADIMA, X., W. GARCÍA Y J. RAMOS. 2003. Conservación y producción del cultivo de la papalisa (*Ullucus tuberosus*). Área Temática de Recursos Genéticos (RRGG) y Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 84 p.
- CADIMA, X. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de papa y otros tubérculos andinos. Tesis Ing. Agr. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias “Martín Cárdenas”, U.M.S.S. 86 p.
- CADIMA, X., M. L. UGARTE. 1996. Mantenimiento *in vitro* de las colecciones de oca, papalisa e isaño. En: Informe anual 1995-96 IBTA PROINPA. Cochabamba, Bolivia. p. VI 37-VI 38.

- CAICEDO, C., L. MUÑOZ, A. MONTEROS Y C. TAPIA. 2004. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador; Producción agroecológica y limpieza de virus de melloco. Quito y Lima, Perú. p. 75 – 90.
- CÁRDENAS, M. 1989. Manual de plantas económicas de Bolivia. Segunda Edición. Ed. Los Amigos del Libro, La Paz y Cochabamba, Bolivia. 333 p.
- CONCI, V. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II: Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. Argentina. p. 481- 494.
- CONDORI, P., J. ALMANZA Y S. GONZÁLES. 2003. Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos: Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia; Factores limitantes de producción que inciden a los tubérculos andinos. Cochabamba, Bolivia. 208 p.
- CRUZ, E. Y D. TOBAR. 1998. Elaboración artesanal de mermeladas a partir de raíces y tubérculos andinos. Folleto 1. Programa Colaborativo de Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos. Centro Internacional de la Papa, Corporación Ambiente y Desarrollo. Ambato, Ecuador. 20 p.
- ESTRADA, R. 1986. Conservación y saneamiento de tuberosas andinas por cultivo de tejido. Lima, Perú. 26 p.
- FLORES, D. Y J. BRENES. s. f. Producción en invernadero de semillas de papa a partir de vitroplantas. Serie informativa tecnología apropiada N° 26. Costa Rica. 13 p.
- FUENTES, S. Y C. CHUQUILLANQUI. 2004. El cultivo del ulluco en la sierra central del Perú: Las enfermedades causadas por virus y su control. Lima, Perú. p. 13 - 31.
- GARCÍA, W. Y X. CADIMA. 2003. Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos: Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Cochabamba, Bolivia, 208 p.

- GEORGE EF. 2000. Plant propagation and micropropagation. En: Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Ed. Exegenetics Ltd., Edington, Wilts. England. p. 37-66.
- GONZALES, S., F. TERRAZAS, J. ALMANZA Y P. CONDORI. 2003. Producción de oca (*Oxalis tuberosa*), papalisa (*Ullucus tuberosus*) e isaño (*Tropaeolum tuberosum*): Importancia, zonas productoras, manejo y limitantes. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 46 p.
- HERTMANN, H., D. E. KESTER, F.T., DAVIES Y R. GENEVE., 1997. Plant propagation principles and practices. 6^a ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- INE, Instituto Nacional de Estadística. 1999. Estadísticas Agropecuarias 1984-1998. La Paz, Bolivia. 207p.
- INE/ENA, Instituto Nacional de Estadística - Encuesta Nacional Agropecuaria. 2008. Bolivia: Superficie, Producción y Rendimiento. Bolivia. p. 34-77.
- IPGRI/CIP, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos y Centro Internacional de la Papa. 2003. Descriptores del Ulluco (*Ullucus tuberosus*). Lima, Perú. 42 p.
- IZQUIERDO, J. Y W. ROCA. 1999. Biotecnología vegetal aplicada al mejoramiento y conservación de recursos fitogenéticos sobre cultivos andinos. Memorias de la Reunión técnica y taller de formulación de proyecto regional sobre producción y nutrición humana en base a cultivos andinos. Lima, Perú. p. 15-21.
- KOZAI, T. 1999. Micropropagation under photoautotrophic conditions. En: Micropropagation: Technology and Application. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 447-469.
- LESCANO, J. 1994. Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos. Programa interinstitucional de Waru Waru. La Paz, Bolivia.
- LÓPEZ, G. 2004. Cultivo del Ulluco en la Sierra Central del Perú: Tubérculos - semilla. Lima, Perú. p. 83 – 104.

- MROGINSKI, L., P. SANSBERRO Y E. FLASCHLAND. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Argentina. p. 17 - 25.
- MROGINSKI, L. Y W. ROCA. 1993. Cultivo de tejido en la agricultura: Establecimiento de cultivos de tejido vegetales in vitro. Colombia. p. 20 - 35.
- OLMOS, S., G. LUCIANI Y E. GALDEANO. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II: Micropropagación. Argentina. p. 353 - 362.
- PATIÑO, F. 1998. Estudio del rendimiento potencial de la papa (*Solanum tuberosum*), Papalisa (*Ullucus tuberosa*), Oca (*Oxalis tuberosa*) e Isaño (*Tropaeolum tuberosum*), empleando el modelo lintul, en candelaria prov. Chapare del Dpto. de Cochabamba. Tesis licenciatura. Universidad Mayor de San Simón. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias "Dr. Martín Cárdenas". Cochabamba, Bolivia. p. 5.
- PERLA, H. 2007, Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in Vitro*. Tesis de Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. P. 23 - 26.
- PIERIK, RLM.1999. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 326 p.
- PROGRAMA COLABORATIVO DE BIODIVERSIDAD DE RAÍCES Y TUBÉRCULOS ANDINOS. 1996. Memorias 1994-1995. Centro Internacional de la Papa, CIP. Lima, Perú. 370 p.
- PURVES W., D. SADOVA, G. ORIANI Y HELLER C. 2002. Vida: La Ciencia de la Vida. 6ª ed. Editorial medica panamericana. New york. 1133 p.
- RAVEN, P.H., R.F. EVERT Y S.E. EICHHORN. 1999. Biology of plants. 6ª ed. W.H. Freeman and Company Worth Publishers. New York, U.S.A. 944 p.

- RAZDAN, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2^a ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A. 375 p.
- REPO, R. Y J. KAMEKO. 2004. El Cultivo del Ulluco en la Sierra Central del Perú: Procesamiento. Lima, Perú. p. 119 – 133.
- ROBLES, E. 1981. Origen y evaluación de la oca, ulluco y mashua. Centro de informática para la investigación agrícola y Universidad agraria La Molina. Lima, Perú. p. 17.
- ROJAS, S., J. GARCÍA Y M. ALARCÓN. 2004. Propagación asexual de plantas: El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Bogotá, Colombia. p. 35 - 36.
- ROMERO, G. 2008. Biotecnología: generalidades, riesgos y beneficios. Curso experto universitario en biotecnología aplicada a los alimentos. S. I. (sin lugar). 20 p.
- SALAS, F. 1998. Procesamiento de Raíces y Tubérculos Andinos. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa, CIP. p. 22-28.
- SEGURA, J. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal: Introducción al desarrollo; Concepto de hormona vegetal. Barcelona. p. 349 - 376.
- TAIZ, L. Y E. ZEIGER. 1998. Plant physiology. 2^a ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland. Massachusetts, U.S.A. 792 p.
- TANIMOTO, E. 2005. Regulation of Root Growth by Plant Hormones-Roles for Auxin and Gibberellin. Critical Reviews In Plant Sciences. p. 249 – 265.
- TAPIA, M. E. Y A.M. FRIES. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos (En línea). Consultado 3 de marzo. 2010. FAO y ANPE. Lima. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s00.htm>
- TAPIA, M. 1997. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2da ed. Santiago-Chile. p. 88 -14.

ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de las soluciones stock Murashige y Skoog (1962)

Las soluciones Stock están basadas en las sales de Murashige y Skoog (1962), y se componen de cinco soluciones concentradas que son: Solución A, B, C, D y E.

Solución Ax10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Nombre	Formula Química	Peso (gr)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	16.5
Nitrato de potasio	KNO_3	19
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	1.7
Ácido Bórico	H_2BO_3	0.062
Sulfato de Manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.223
Sulfato de Zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.086

Todas estas sales se las preparo de forma individual disolviendo en 20-50 ml de H_2O_d (agua destilada), posteriormente se los vertió en una probeta de 1000 ml que contenga 400 ml de H_2O_d .

Disolver cada una de las siguientes sales en 100 ml de H_2O_d .

Nombre	Formula Química	Peso (gr)
Yoduro de Potasio	KI	0.1
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1

De estas soluciones se pipeteo a la solución Stock en agitación constante las siguientes cantidades:

- 8.2 ml de KI
- 2.5 ml de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.25 ml de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Homogenizando con la solución anterior y se enraso a un litro en un probeta.

Solución Bx10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Se pesó 3.7 gramos de Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y se disolvió en 500 ml de H_2O_d .

Solución Cx10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Nombre	Formula	Peso (gr)
Etilen diamin tetraacetato disódico	Na_2EDTA	0.3725
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2785

Se disolvió el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de H_2O_d y el Na_2EDTA en 25 ml de H_2O_d tibia se espero hasta que enfrié y mezclar ambas soluciones para después completar con H_2O_d hasta 500 ml.

Solución Dx10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

Se disolvió en 500 ml de H_2O_d 1 gramo de myo-inositol.

Solución Ex10 (Para 10 litros de medio de cultivo)

VITAMINA	Peso (gr)
Tiamina-HCl	0,01
Glicyna	0,05
Acido nicotinico	0,0125
Piridoxina-HCl	0,0125

Se disolvió cada vitamina por separado y completo hasta 250 ml con H_2O_d .

Anexo 2. Resumen del procedimiento experimental en las etapas (introducción, establecimiento de brotes y multiplicación *in vitro*), presentada en fotografías.

