

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE PAPA DE LAS VARIEDADES PARDA PASTUSA
(*Solanum tuberosum*), YEMA DE HUEVO (*Solanum phureja*), y COLORADA
(*Solanum phureja* var. *Colorada*)**

IVONNE AMPARO RAMÍREZ GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002

**DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE PAPA DE LAS VARIEDADES PARDA PASTUSA
(*Solanum tuberosum*), YEMA DE HUEVO (*Solanum phureja*), y COLORADA
(*Solanum phureja* var. *Colorada*)**

IVONNE AMPARO RAMÍREZ GONZÁLEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de químico

Directora
Mg. Isabel Bravo Realpe
Asesora
Nora Ester Valencia

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002

Nota de aceptación

Directora: Mg. Isabel Bravo Realpe

.

Jurado: Dr. Fabio Antonio Cabezas

_Jurado: Dr. Nelson Rojas

Popayán 22 marzo de 2002

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
0	INTRODUCCIÓN..... 13
1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 15
2	JUSTIFICACIÓN..... 17
3	OBJETIVOS..... 20
3.1	GENERAL..... 20
3.2	ESPECÍFICOS..... 20
4	ANTECEDENTES..... 22
4.1	MEDIO DE CULTIVO 24
4.2	COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO..... 27
4.2.1	Sales Inorgánicas..... 27
4.2.2	Agua..... 30
4.2.3	Agar..... 31
4.2.4	Azúcar..... 31
4.2.5	Reguladores de Crecimiento..... 32
4.2.5.1	Auxinas 32
4.2.5.2	Citoquininas 32
4.2.6	pH..... 33
4.3	SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA 34
	NUTRICIONALES.....
4.4	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA 36
	MICROPROPAGACIÓN.....
4.5	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS VARIEDADES DE PAPA, 39
	PARDA, COLORADA y YEMA HUEVO.....
4.5.1	Yema de huevo..... 39
4.5.2	Parda pastusa..... 40
4.5.3	Colorada 41

4.6	MULTIPLICACIÓN DE MATERIAL LIBRE DE VIRUS	43
4.6.1	Saneamiento de variedades	44
4.6.2	Cultivo de meristemas de papa	45
4.6.3	Pruebas de detección de patógenos	45
4.6.4	Semilla básica de papa y cultivo de tejidos	49
4.6.5	Protocolo para la micropropagación in vitro	53
4.7	PRINCIPIOS DE PROPAGACIÓN DE PLANTAS	57
4.7.1	Diferentes dosis de ácido giberélico utilizado para la micropropagación de papa	58
4.7.2	Efecto de la concentración de la sacarosa en la micropropagación de papa	58
4.7.3	Efecto de la edad fisiológica del tubérculo de la planta madre y el número de subcultivos en la tuberización in vitro de la papa.	58
4.7.4	Micropropagación fotoautotrófica para producción comercial de cultivares de papa andigena	59
4.7.5	Efecto del tamaño del recipiente sobre la micropropagación in vitro	60
5	MATERIALES MÉTODOS.....	61
5.1	UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	61
5.2	MÉTODO.....	61
5.2.1	Selección de plantas madres.....	61
5.2.2	Desinfestación.....	62
5.2.3	Aislamiento de yemas.....	63
5.2.4	Siembra in vitro.....	64
5.2.5	Incubación.....	65
5.2.6	Transferencia.....	66
5.2.7	Multiplicación.....	66
5.2.8	Enraizamiento.....	66
5.3	PREPARACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE MEDIO DE CULTIVO EN PAPA.....	67
5.3.1	Medio de cultivo para siembra.....	68
5.3.2	Medio de cultivo para transferencia.....	69

5.3.3	Medio de cultivo para enraizamiento.....	69
5.4	SELECCIÓN DE PROTOCOLOS.....	69
5.5	CONSIDERACIONES NECESARIAS PARA LA PREPARACIÓN DEL MEDO DE CULTIVO.....	69
5.6	ELABORACIÓN DE REGISTROS.....	70
5.6.1	Registro 1, Inventario de soluciones stock.....	70
5.6.2	Registro 2. preparación de medio de cultivo.....	70
5.6.3	Registro 3. Evaluación de protocolo.....	71
5.7	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	71
5.8	VALORACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES POR LAS PLÁNTULAS DE PAPA EN EL CULTIVO IN VITRO.....	72
5.8.1	Nitrógeno	72
5.8.2	Determinación de fósforo, Azufre, Potasio, Calcio, Magnesio y Micro nutrientes.....	73
5.8.2.1	Fósforo.....	73
5.8.2.2	Sulfatos.....	74
5.8.2.3	Potasio, Calcio, Magnesio, determinación por A. A. (Absorción atómica).....	74
5.8.2.4	Cobre, Magnesio, Hierro y Zinc.....	75
5.8.2.5	Boro.....	75
5.8.2.6	Cloruros.....	75
6.0	RESULTADOS.....	77
6.1	ENSAYO 1.....	81
6.2	ENSAYO 2.....	85
6.3	ENSAYO 3.....	89
6.4	ENSAYO 4.....	98
6.5	ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECCIONADOS COMO ÓPTIMOS.....	110
	CONCLUSIONES.....	124
	BIBLIOGRAFÍA.....	127
	ANEXOS.....	135

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Selección de plantas madres.....	62
Figura 2 Obtención de explantes.....	63
Figura 3 Aislamiento de yemas.....	64
Figura 4 Siembra de explantes de papa.....	64
Figura 5 Sala de incubación.....	65
Figura 6 Longitud del tallo de las variedades de papa colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo 1.....	82
Figura 7 Longitud del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	82

	1.....	
Figura 8	Grosor del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	83
	1.....	
Figura 9	Grosor del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	83
	1.....	
Figura 10	Longitud del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	86
	2.....	
Figura 11	Longitud del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	86
	2.....	
Figura 12	Grosor del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	87
	2.....	
Figura 13	Grosor del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	87
	2.....	
Figura 14	Longitud del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	91
	3.....	
Figura 15	Longitud del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in	

	vitro". Ensayo	91
	3.....	
Figura 16	Grosor del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas "in vitro". Ensayo	91
	3.....	
Figura 17	Grosor del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas "in vitro". Ensayo	92
	3.....	
Figura 18	Longitud de entrenudos de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas "in vitro". Ensayo	92
	3.....	
Figura 19	Longitud de entrenudos de las variedades de papa Parda cultivadas "in vitro". Ensayo	93
	3.....	
Figura 20	Nº de hojas de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas "in vitro". Ensayo	93
	3.....	
Figura 21	Nº de hojas de las variedades de papa Parda cultivadas "in vitro". Ensayo	94
	3.....	
Figura 22	Plántulas de variedad Colorada y Yema de huevo en protocolo P7 y P8. Ensayo	97
	3.....	

Figura 23	Longitud del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	100
	4.....	
Figura 24	Longitud del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	100
	4.....	
Figura 25	Grosor del tallo de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	102
	4.....	
Figura 26	Grosor del tallo de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	102
	4.....	
Figura 27	Longitud de entrenudos de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	103
	4.....	
Figura 28	Longitud de entrenudos de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	104
	4.....	
Figura 29	Número de hojas de las variedades de papa Colorada y Yema de huevo cultivadas “in vitro”. Ensayo	105
	4.....	
Figura 30	Número de hojas de las variedades de papa Parda cultivadas “in vitro”. Ensayo	105

4.....	
Figura 31 Características físicas de plántulas de papa Colorada, Yema de huevo y Parda en P10.....	107
Figura 32 Plántulas de papa de variedad Parda en protocolo P3 medio sólido. Etapa de transferencia.....	117
Figura 33 Plántulas de papa de variedad Y. Huevo en medio sólido P3.....	118
Figura 34 Plántulas de papa de variedad Y. Huevo en medio Líquido P9.....	118
Figura 35 Plántula de papa de variedad Colorada en protocolo P9 siembra	120
Figura 36 Plántulas de papa de variedad Colorada en protocolo P9 líquido.....	122
Figura 37 Plántulas de papa, variedad Y. Huevo. Efecto del tamaño del envase.....	123

LISTA DE CUADROS

Pág

Cuadro 1	Concentración de sales de los 10 protocolos de medios nutritivos para siembra de las 3 variedades de papa.....	78
Cuadro 2	Concentración de sales de los 10 protocolos de medios nutritivos para multiplicación y transferencia de las 3 variedades de papa.....	79
Cuadro 3	Concentración de sales de los 10 protocolos de medios nutritivos para enraizamiento de las 3 variedades de papa.....	80
Cuadro 4	Longitud y grosor de tallo de las plántulas de las tres variedades de papa cultivadas “in vitro” en un tiempo de 15 días. Ensayo 1.....	81
Cuadro 5	Longitud y grosor de tallo de las plántulas de las tres variedades de papa cultivadas “in vitro” en un tiempo de 30 días. Etapa de transferencia. Ensayo 2.....	85
Cuadro 6	Longitud del tallo, grosor de tallo, longitud de entrenudos y número de hojas, de las plántulas de las tres variedades de papa cultivadas “in vitro” en un tiempo de 30 días. Ensayo	90

3.....

Cuadro Longitud del tallo, grosor de tallo, longitud de entrenudos y número
7 de hojas de las plántulas de las tres variedades de papa
cultivadas “in vitro” en un tiempo de 60 días..... 98

Cuadro Nutrientes Absorbidos por las plántulas de papa cultivadas “in 110
8 vitro”

RESUMEN

Se realizó una pasantía en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del SENA (Cauca), desarrollando una investigación en la que se aplicó la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la obtención de un medio nutritivo óptimo para la producción de tres variedades de papa Parda Pastusa (*Solanum tuberosum*), Yema de Huevo (*Solanum phureja*) y Colorada (*Solanum phureja* var. Colorada); se ensayaron 10 protocolos de medio, seis de ellos reportados en la literatura y los otros cuatro se obtienen después de hacer ajustes en concentración de sales y hormonas a los anteriores protocolos de medio. Se encontró que los medios apropiados fueron un medio líquido óptimo para la variedad Yema de huevo y Colorada y un medio sólido para la variedad Parda. La obtención de los medios como adecuados se hizo con base a las características fenotípicas de las plántulas obtenidas; se realizó un análisis químico de los medios seleccionados como óptimos con el objeto de determinar la toma de nutrientes por parte de las plántulas, encontrándose que de los elementos suministrados al medio las plántulas tomaron un 78% de N, un 72% de K y un 59% de P, para la variedad Parda. las plántulas de variedad Colorada tomaron un 61% de N, 57% de K y un 71% de P. Las plántulas de variedad Yema de Huevo tomaron 48% de N, 68% de

K y 51% de P. En general las plántulas de las tres variedades absorbieron poca cantidad de los micronutrientes aplicados.

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A Preparación de medio de cultivo
- ANEXO B Test de normalidad
- ANEXO C Test De homogeneidad de varianzas
- ANEXO D Test ANOVA
- ANEXO E Test de Interacción de Duncan
- ANEXO F Test de Kruskal – Wallis
- ANEXO G Cantidad de nutrientes extraídos por el cultivo de papa en el suelo

A mis padres,

Hermanos y a mi

Hijo Camilo

Con todo

Mi amor

AGRADECIMIENTOS

Mis mas sinceros agradecimientos a:

La profesora Isabel Bravo Realpe, por su permanente dirección y guía en la realización de este trabajo.

A el Dr. Julio Cesar Tobar jefe del centro Agropecuario CAISA del SENA Popayán, en especial a su laboratorio de Biotecnología Vegetal por permitir realizar este trabajo; de igual manera agradezco a La I.A. Nora Valencia, a Lic. Maria del Socorro Anaya, Lic. Ileana Medina, Lic. Gustavo Herrera O. Y demás compañeros por su valiosa colaboración, especialmente agradezco a la Lic. Margarita María Chagüendo por su ayuda y estímulo durante la realización de este trabajo.

A mis hermanos, y a mis padres Marco Aurelio y Mercedes, por su inmensa dedicación y apoyo. A Luis Andrés y a mi hijo Camilo por su amor.

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de biotecnología vegetal del SENA Regional Cauca, se ejecutó el proyecto aprobado por el PLANTE con el CABILDO indígena de GUAMBIA, para los programas de gobierno nacional de seguridad alimentaria de las comunidades productoras de papa y sustitución de cultivos ilícitos en el CABILDO de Guambia. Silvia, Cauca.

La investigación aplicada que se desarrolló en el laboratorio, consistió en la aplicación de una de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la obtención de un medio nutritivo óptimo para la producción de las variedades de papa más cultivadas en la región, libre de virus, bacterias, hongos.

Aunque existen muchos reportes bibliográficos a cerca de medios nutritivos para papa, fue necesario realizar en el laboratorio de biotecnología del SENA regional Cauca, ensayos de diferentes protocolos de medios nutritivos utilizados en diferentes regiones y en diferentes variedades de papa para poder tener una base sobre los requerimientos de concentración de sales que necesitan las variedades de papa Parda Pastusa (*Solanum tuberosum*), Yema de Huevo (*Solanum phureja*) y Colorada (*Solanum phureja* var. Colorada) que se trabajan en el laboratorio.

Los programas de fitomejoramiento de papa en Colombia han producido más de 30 variedades que se adaptan a condiciones ecológicas, a caprichos de los intermediarios y a los gustos del consumidor. Ha sido un trabajo difícil que acredita al país como uno de los pocos países tropicales que no tienen necesidad de importar semillas de otras latitudes y se destacan entre ellos por el mayor número de variedades propias, de excelente calidad culinaria, algunas aptas para la industria de procesamiento (Herrera, 2000). Por esto, en el laboratorio, por medio de la técnica de cultivo de tejidos "in vitro", se obtuvo un medio nutritivo para cada una de las tres variedades de papa más cultivadas en la región, contribuyendo de ésta manera a la obtención de plántulas de papa para las comunidades productoras de papa de Silvia Cauca. En esta pasantía se pretendió además de adquirir conceptos y habilidades en el manejo de las técnicas mencionadas, contribuir a la investigación aplicada en la obtención de un medio de cultivo que suministre una nutrición apropiada a los explantes en las diferentes fases de la propagación "in vitro".

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema de cultivo de papa en Silvia Cauca se desarrolla con prácticas tradicionales, como la propagación vegetativa por tubérculo. La baja tecnología y la deficiente calidad de semillas debido a problemas fitosanitarios, con ataque de plagas como la polilla Guatemalteca, es semilla que no garantiza una buena productividad, Aspecto que incide en los bajos rendimientos de producción por hectárea, motivando el aumento y el uso inadecuado de agroquímicos (plaguicidas y fertilizantes) de alta síntesis como el Safercol, folcinco, Power Plex que causan dependencia, altos costos de producción, contaminación de recursos como suelo, aire, agua, perdiendo el equilibrio del agroecosistema de producción.

En el último año, el gusano blanco causó pérdidas en el 70% de las hectáreas cultivadas de papa en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Antioquia y Cauca.

En la actualidad, en Colombia hay 130.000 hectáreas sembradas de papa, y más de 100.000 familias derivan su sustento de este cultivo.

Según técnicos consultados del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) la plaga se había logrado controlar, pero la incidencia de la polilla guatemalteca hizo que el agricultor se concentrara en ella y descuidara la atención sobre el gusano blanco.

El cultivo de papa, *Solanum tuberosum*, presenta una gran incidencia de virus que se reflejan en las características fenotípicas del material vegetal, así mismo se ve afectada la productividad; por eso la semilla certificada de papa es una necesidad para el sector agrícola, por lo cual es necesario obtener semillas libres de virus. Aún cuando existen fórmulas de medio nutritivos para micropropagación “*in vitro*”, no hay una recomendación específica de cual medio de cultivo se deba utilizar para las variedades de papa Parda Pastusa (*Solanum tuberosum*), Yema de Huevo (*Solanum phureja*) y Colorada (*Solanum phureja* var. Colorada), para la región de Silvia Cauca.

2.JUSTIFICACIÓN

El cultivo de meristemas es una técnica que se utiliza para producir materiales libres de virus y otros patógenos. El meristemo es el punto de crecimiento de las yemas vegetales de las plantas y permite obtener plantas libre de virus, siguiendo los protocolos de desinfestación y desinfección y su posterior siembra en un medio específico, le proporcionará a la planta, los nutrientes necesarios para su crecimiento, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa, permite el desarrollo de plántulas “in vitro” después de 6 a 8 semanas (semillas iniciales). La propagación “in vitro” de esos materiales permite obtener en el laboratorio, en corto tiempo, grandes cantidades de plántulas de alta calidad fitosanitarias, y así agilizar la producción de plántulas de papa “in vitro” obteniendo semilla sana y de buena calidad que responda a las necesidades identificadas por el proyecto cofinanciado por el PLANTE.

La semilla de alta calidad produce plantas vigorosas, con buen número de tallos fuertes, en razón de la presencia de brotes múltiples, cortos y vigorosos en la semilla. Estas características le permiten a la planta tolerar ataques de plagas y de enfermedades y de otros factores adversos y además, favorecer su capacidad para producir tubérculos. Con la obtención del medio de cultivo apropiado para cada variedad, se podrán obtener plántulas que posean características

adecuadas y producir semillas de buena calidad, las cuales deben poseer las siguientes características:

- Pureza varietal: Tubérculos de color y forma características de cada variedad, sin mezclas de tubérculos de otras variedades.
- Sanidad de tubérculos: Semilla sana, libre de plagas y de enfermedades, que garantice buena emergencia, temprana y uniforme, buen desarrollo del cultivo, con alto potencial de rendimiento y buena forma y calidad de los tubérculos producidos.
- Buena condición física: Uniformidad en forma y tamaño de los tubérculos-semillas, sin daños mecánicos ni pudriciones, buena turgencia, con brotes múltiples vigorosos y preferiblemente clorofílicos que provengan de lotes libres de problemas patológicos.

La obtención de semillas de buena calidad, se logra por medio de la micropropagación “*in vitro*”. Para esto es necesario primero obtener un medio de cultivo apropiado que suministre todos los requerimientos nutricionales para tal fin. Por tal razón con éste trabajo se pretende obtener el medio de cultivo óptimo que garantice la propagación de tres variedades de papa Parda Pastusa (*Solanum tuberosum*), Yema de Huevo (*Solanum phureja*) y Colorada (*Solanum phureja* var. Colorada). La obtención de los medios de cultivo se realizó partiendo de los protocolos de medios de cultivo relacionados en la literatura a través de ensayos que permitan producir las mejores plántulas con los mínimos requerimientos nutricionales. Estos requerimientos se estudiarán a partir de análisis químicos del

medio de cultivo que produzca las mejores plántulas, antes de la siembra en dicho medio y después de la transferencias.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Aprender la técnica de micropropagación *in vitro* en las especies vegetales del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), a través de la pasantía en el laboratorio de biotecnología del SENA regional Cauca, ejecutando las actividades cotidianas, con el objeto de obtener un medio de cultivo para la micropropagación de tres variedades de papa.

3.2. ESPECIFICOS

Adquirir conocimiento y destreza en las técnicas de micropropagación "*in vitro*".

Ejercitarse en el procedimiento para la preparación de medios de cultivo.

Comparar el efecto de 6 medios de cultivo para papa diferentes, estandarizados en otros laboratorios y ensayarlos en las tres variedades de la región.

Ajustar un medio de cultivo “óptimo” para la micropropagación de papa.

Realizar el análisis químico del medio de cultivo “optimo”, antes y después de la transferencia del explante para cuantificar los elementos nutricionales tomados por la planta.

4. ANTECEDENTES

El desarrollo del cultivo de tejidos vegetales "*in vitro*" ha tenido en las últimas décadas una amplia aplicabilidad en el sector agrícola, particularmente en la obtención de plantas libres de patógenos, mejoramiento genético, establecimiento de bancos de germoplasma y micropropagación .

La micropropagación facilita la clonación, la posibilidad de reproducir rápidamente un material de características seleccionadas en variedades económicamente importantes, para contribuir al incremento de la productividad de los cultivos (Lieselotte, 1984).

La propagación "*in vitro*" o micropropagación, es la técnica que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante), de una manera aséptica proporcionándole artificialmente un medio químicamente apropiado y condiciones físicas controladas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido y llevar a cabo una propagación clonal masiva; de esta manera está determinado, el crecimiento y desarrollo "*in vitro*" de una planta.

El explante aislado "*in vitro*" necesita de algunas sustancias que también son empleadas en el desarrollo in vivo como son macro y micro nutrientes, agua, azúcares, vitaminas y reguladores de crecimiento, básicamente citocininas y/o

auxinas. En algunas ocasiones se emplean compuestos orgánicos poco definidos como el agua de coco, extractos vegetales y extracto de levadura entre otros.

La papa se propaga generalmente de forma asexual por medio de los tubérculos, es decir, los vástagos subterráneos de la planta. Sin embargo, con el método convencional de propagación vegetativa, las papas son a menudo propensas a los patógenos tales como , hongos, bacterias y virus, de tal modo que ocasionan mala calidad y producción. Por lo tanto, mucha atención se ha centrado en la producción de papa “in vitro” libre de virus (Mellor y Stace-Smith, 1977; Roca *et al.* , 1978; Djurdjina *et al.* 1997)

Meller y Stace-Smit descubrieron que los virus se erradican con mayor o menor dificultad, y publican en 1972 la lista de virus de mas difícil erradicación de mayor a menor así: PRLV o virus del enrollamiento de la hoja de la papa, (Panta et al 1990; Wilketal, 1990 Thole, et al, 1990). PVA o virus A de la papa, PVY o virus Y de la papa,(Stark y Beachy, 1989) mosaico “aucuba”, PVM o virus M de la papa (Wetels et al, 1990) PVX o virus x de la papa (Hemenway et al 1988; Hoekema et al, 1988). y el virus S de la papa o PVS. Esto nos conduce a aplicar simultáneamente dos de las técnicas más apropiadas para erradicar los virus: La termoterapia y el cultivo de meristemas, según lo recomienda (Espinosa, 1989).

La semilla asexual por tubérculos de la papa, disemina patógenos sistémicos como hongos, bacteria, virus. En Colombia están muy distribuidos los virus PRLV, PVX, PVY, PVS. Entre los hongos el *Verticillium arboatrum* es el mas conocido así como las bacterias *Pseudomonas solanacearum* y *Erwinia carotovora*.

4.1 MEDIO DE CULTIVO

Aun cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos se sabe que los antecedentes se remontan a 1860-1861, años en que (Sackro, 1860) y (Knops, 1861) descubrieron que las sustancias mas importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos orgánicos. El resultado de estas observaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva (solución Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo.

Después en 1935, cuando se conocieron las condiciones del crecimiento y división de células homogéneas, aparecieron numerosos artículos en los que se experimentaban mejores condiciones para una rápida división celular, mayor velocidad de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo. Así, (Robbins, 1936) , estudió el efecto de microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, manganeso y Boro eran necesarios para el cultivo de ápices radicales. (Murashige y Skoog, 1962), estudiaron y propusieron la composición de los medios de cultivo

al medio revisado para obtener una velocidad mayor en el crecimiento de células de plantas.

(Nickell, 1965), (Melches, 1955) y (Melches y Bergman, 1959), para estudios de fitofisiología y bioquímica, han experimentado el cultivo masivo o cultivo en tanque con medios líquidos. Además investigaron los efectos del abastecimiento de aire, control del pH, remoción de medios de cultivo y otros aspectos más (Rosell, 1990).

(Pierik 1987) define cultivo in vitro de plantas superiores como: el cultivo en un medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas de semillas, embriones, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

En sentido estricto, in vitro quiere decir "dentro de vidrio", es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes dentro de recipientes de vidrio en condiciones de medio ambiente controlado.

En cuanto a los tejidos de plantas, desde 1940 se ha desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre su requerimientos nutricionales en medios estrictamente definidos. En términos generales la mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. A menudo se utiliza la sacarosa como una fuente de energía. Algunos tejidos se pueden cultivar en un medio completamente definido, mientras muchos

otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, a menos que se le completen con microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales como el agua de coco, la casina hidrolizada, los extractos de levadura y de malta entre otros.

Posiblemente, la formulación de un medio para el cultivo de tejidos es más un arte que una disciplina por derecho propio; la experiencia es el mejor maestro en este tipo de trabajo, y éste es el mejor consejo u orientación que se le puede dar a un principiante.

Por tal motivo no es posible definir un medio único de todas las especies debido a que los requerimientos nutricionales de estas pueden diferir entre sí. Incluso distintos tejidos de una misma planta presentan necesidades diferentes. Por esto la definición de los constituyentes del medio, requiere un periodo de investigación para cada especie y tipo de explante.

Existe gran número de fórmulas para preparar el medio cultivo “*in vitro*”, las cuales contienen entre 15 a 35 compuestos químicos que suministran Carbono, Nutrimientos minerales, vitaminas, agente gelificante y sustancias reguladores del crecimiento, entre otros. Entre los medios de cultivo *in vitro* más utilizados están: el MS (Musrashige Et al., 1962), B5 (Gamborg Et al., 1968), NG (Chu Et al., 1975), WH (While, 1943) a los cuales se le han hecho algunas modificaciones por (Yeoman ET al., 1977) y (Singh Et al, 1981) (Roca y Mroginski, 1991).

4.2 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

Los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plántulas se adicionan a el medio en forma de sales inorgánicas

4.2.1 Sales inorgánicas

Nitrógeno: Constituye del 16 al 18% de la masa de las proteínas y es el principal elemento del protoplasma. Es un elemento móvil, esencial porque actúa en los procesos de absorción iónica, síntesis, multiplicación y diferenciación celular. Además el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, pirimidinas que se encuentran en los ácidos nucleicos, RNA y DNA esenciales para la síntesis de proteínas; en porfirinas que se encuentran en compuestos importantes desde el punto de vista metabólico, como las clorofilas, esenciales para la fotosíntesis y la respiración.

Fósforo: E el elemento que forma parte de las moléculas muy importantes para la vida de las plantas, pero además es un componente básico de las sustancias de

reserva contenidas en las semillas: es constituyente de ácidos nucleicos, enzimas, vitaminas, fosfolípidos, fitina y además es indispensable en procesos donde hay transformación de energía.

Es un elemento indispensable en el crecimiento vegetal, ya que es constitutivo de los tejidos destinados al soporte físico del vegetal: tronco, ramas, es decir del esqueleto vegetal.

Si hay exceso de P este acelera la maduración a expensas del crecimiento y puede generar efectos adversos sobre la utilización de otros nutrientes como el Zinc y el Hierro.

Dentro de los elementos mayores, el calcio y el magnesio integran un grupo denominado “**elementos secundarios**”, junto al azufre, en virtud de que, a pesar que las plantas lo requieran en altas cantidades, su deficiencia en el suelo es menos común.

Calcio: Todas las plantas necesitan calcio para formar tabiques de las células, a los que da consistencia y permeabilidad adecuada para la absorción nutritiva de las raíces y circulación de la savia. De otra parte es el principal elemento alcalino que neutraliza el ácido oxálico de la desasimilación de los vegetales que sin ésta transformación quemaría los tejidos.

Magnesio: El magnesio es un constituyente de la clorofila, contribuye a dar turgencia a la planta y forma parte de distintos componentes de la semilla.

Interviene en la circulación del fósforo al cual sirve de vehículo cuando se deposita en las semillas o cuando se desplaza a los tejidos generadores de grasas.

La planta absorbe mucho magnesio en la fase de crecimiento y cesa la adsorción cuando alcanza la madurez.

Azufre: El azufre forma parte de aminoácidos esenciales, de vitaminas, de la coenzima A: es activador de algunas enzimas proteolíticas como la papainasa y esta presente en la ferredoxina. Las plantas lo absorben en forma de ion sulfato reducido.

En líneas generales la dinámica del azufre en el sistema suelo planta es similar a la del nitrógeno.

En la mineralización se llega en primer lugar, a la formación de ácido sulfhídrico que en condiciones aerobias es oxidado rápidamente a azufre elemental y en una segunda etapa a sulfato. La reacción global de oxidación libera una considerable cantidad de energía y se expresa así:



Al igual que la nitrificación, la oxidación del azufre es un proceso que acidifica el suelo.

Potasio: Parece estar absorbido en las mitocondria, formando parte de enzimas activas durante la fosforilación oxidativa y tal vez en la síntesis proteica, se encuentra involucrado en el transporte aniónico y la hormoregulación entre otros.

Hierro: Forma el núcleo del citocromo y al pasar de Fe^{2+} a Fe^{3+} induce la oxidorreducción al final del proceso de la respiración. Así mismo en la fotosíntesis , tiene un papel pues forma parte de la ferredoxina.

Manganeso: Pasa de Mn^{+2} a Mn^{+3} . Induce de modo desconocido la síntesis de la clorofila ; es cofactor para las hidrogenasas, oxidasas y carboxilasas y se requiere para la producción O_2 en la fotosíntesis.

Boro: Es un elemento importante en el desarrollo de la raíz, hojas y botones florales, esencial en el proceso de polinización y crecimiento de semillas y frutos; el Boro forma parte del metabolismo de los carbohidratos y facilita el movimiento de los azúcares formando un complejo permeable Boro-azúcar, o juntando la membrana de las células, de tal manera que se hacen mas permeables a los azúcares.

Cobre: Se necesita solo en ínfima cantidad, pero es por completo esencial porque forma de las diversas enzimas, en especial la citocromo-oxidasa, que permite la oxidación respiratoria final.

Molibdeno: **Se acepta como esencial, aunque bastan pequeñísimas cantidades; forman parte de la NO₃ reductasa.**

Zinc: **Es un componente de las deshidrogenasas; se piensa que puede tener relación con la formación de reguladores del crecimiento, pues su deficiencia deja las plantas en roseta.**

Cloro: **Es vital en reacciones que llevan a la evolución del O₂ en la fotosíntesis(Rojas, 1993).**

4.2.2 Agua

Puesto que esta constituye el 95% del medio nutritivo se le debe prestar atención a su calidad. Para el cultivo in vitro debe ser destilada y en ocasiones para cultivos de protoplastos y células es preferible bidestilada.

Su mejor almacenamiento es en recipiente de polietileno, ya que el vidrio frecuentemente posee trazas de plomo, sodio o arsénico a no ser que sea del tipo pirex.

4.2.3 Agar:

Cuando los explantes se colocan en un medio nutritivo líquido, pueden quedar sumergidos y debido a la falta de oxígeno, el tejido muere. Por eso en la mayoría

de los casos y en especial durante la fase de establecimiento, se agrega agar al medio de cultivo con el fin de solidificarlo y poder así darle soporte al explante.

El agar es un polisacárido derivado de las algas marinas, que es lavado y purificado durante su elaboración, por lo cual no contiene materiales tóxicos. Las concentraciones generalmente adicionadas al medio varían entre 0.5 y 0.8%. Con cantidades mayores la solución se vuelve muy dura y la dilución de agua y nutrientes muy lenta, por lo que al tejido se le dificulta su absorción y el crecimiento *in vitro* se afecta negativamente.

Para la solidificación adecuada del medio cuando se emplea agar, es importante que el pH no se encuentre por debajo de 4.5 – 4.8

4.2.4 Azúcar

Es una fuente de carbono esencial para el crecimiento y desarrollo, puesto que los explantes no son suficientemente autótrofos *in vitro*.

Por lo general la mas usada es la sacarosa (Seetohul, 1995), en concentraciones que varían entre 1 y 5% (Butenko, 1968), pero también pueden emplearse glucosa y fructuosa. La sacarosa junto con el agar son los componentes mayores en los medios de cultivo y afectan la captación de agua por las células de las planta (Seetohul, 1995).

La concentración depende básicamente del tipo de explante con que se esté trabajando, por lo general mientras más joven y pequeño sea, la cantidad debe ser mayor.

4.2.5 Reguladores de crecimiento

En la micro propagación masiva se emplean generalmente auxinas, citoquininas o una combinación de ambas.

4.2.5.1 Auxinas El ácido Indol acético (AIA) y el Indol propiónico (AIP) y el indol butírico (AIB) son auxinas relativamente débiles. Hay otros compuestos que pueden comportarse como débiles o fuertes como son los ácidos naftalenacético (ANA) y naftoacético (NOA). El 2-4 diclorofenoxiacético (2-4-D) es considerado fuerte. Las auxinas son también sintetizadas por las plantas, como el ácido indolacético (AIA), el ácido indol pirúvico (IPA), y otras, sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftoxiacético (NOXA) éstas son inductoras del alargamiento de la célula a bajas concentraciones, aceleración de la respiración y del metabolismo energético.

4.2.5.2 Citoquininas Son derivados de la adenina, con citoquininas naturales como la zeatina (Z) y la 2 psopentiladenina (2- i p) , se pueden lograr buenos resultados en la micro propagación, pero las sustancias sintéticas como Kinetina (K) y Bencilaminopurina (BAP) son mas empleadas, ya que pueden estar más disponibles por un mayor periodo de tiempo, puesto que no son degradadas como las naturales, por la citocina oxidasa y por consiguiente tiene una mayor movilidad dentro de los tejidos. Su función es activar la división celular y retardar el

envejecimiento de los órganos; La acción fundamental no se conoce pero se supone que se adhiere al RNA de transferencia y controlando así la síntesis de algunas proteínas o enzimas, induce la actividad de las amilasas y proteasas, promueve un poco el alargamiento y tiene influencia sobre el transporte de nutrientes tal vez como efecto de la activación del metabolismo.

Es muy importante que exista un equilibrio auxina / citocinina, pues la auxina induce la diferenciación de la raíz y la citocinina la diferenciación del tallo.

4.2.6 PH

Después de la preparación del medio nutritivo se hace necesario ajustar el pH de la solución entre 5.2 y 5.8, ya que en este intervalo se presenta la mayor disponibilidad de compuestos. Con pH 4.5 o menos, el AIA es inestable, el agar no solidifica, puede precipitarse sales como fosfato y hierro y se retarda la absorción de iones amonio. A pH mayores de 6.0 puede haber degradación de algunos azúcares como glucosa. La determinación se realiza potenciométricamente (Llano, 1990).

4.3 SINTOMAS DE DEFICIENCIAS NITRICIONALES

Deficiencia de Nitrógeno: La deficiencia de n se caracteriza por un desarrollo vegetativo restringido, hojas poco desarrolladas y de color verde pálido. Las hojas mas viejas (bajeras) tienen tendencia a la senescencia (amarillas y secas) y se pueden perder prematuramente.

Deficiencia de Fósforo : El síntoma más característico es el de plantas rígidas y de pobre desarrollo vegetativo. Los folíolos son más erectos y hay un marcado retraso en la madurez del cultivo. También se presenta escasez y retraso de la floración. Como consecuencia de la deficiencia de P hay baja producción de papa.

Deficiencia de Calcio: Un síntoma característico de la deficiencia de calcio es la deformación de las hojas jóvenes que hace que las puntas se doblen hacia abajo. Los márgenes de las hojas pueden aparecer amarillentos y posteriormente secarse. Las raíces se vuelven raquílicas y de color pardo y en ciertos cultivos, una deficiencia de calcio produce podredumbre apical.

Deficiencia de Magnesio: La carencia de magnesio produce clorosis y paralización de la fotosíntesis. Las hojas se tornan amarillas entre los nervios, y esto seguido por la aparición de zonas pardas que se secan. Se reduce la distancia entre los nudos del tallo, las hojas se mueren y se inhibe la floración.

Deficiencia de Azufre: La deficiencia no suele encontrarse a menudo. Generalmente aparece un amarilleo de las hojas, que suele ser visible, en primer lugar en las más jóvenes. Manchas necróticas pueden aparecer en las hojas basales y en deficiencia aguda, hay muerte prematura de las hojas afectadas.

También la carencia de azufre está generalmente relacionada con la carencia de nitrógeno y se confunde con ella, los síntomas son parecidos, especialmente al iniciarse el desarrollo, cuando la mineralización de las reservas orgánicas está limitada.

Deficiencia de Potasio: La Deficiencia de K se manifiesta por el tono verde oscuro anormal de la planta y la decoloración y bronceado de la hoja, que termina necrosándose, especialmente en las puntas y en los márgenes de las hojas bajas. Los tubérculos con bajo contenido de potasio son susceptibles a la aparición de manchas azuladas.

Deficiencia de Hierro: El crecimiento es más o menos restringido. La clorosis se inicia en la parte apical y continúa hacia la base. Pueden aparecer manchas necróticas y los esquejes de las plantas deficientes en hierro son muy propensos a las pudriciones fungosas.

Deficiencia de Manganeso: El crecimiento de la planta es ligeramente afectado. Toda la planta presenta pérdida de color y las hojas son uniformemente pálidas.

Deficiencia de Boro: El crecimiento del brote principal es restringido, los entrenudos cortos y tallo débil. La presencia de hojas retorcidas.

Deficiencia de Cobre: Generalmente el crecimiento no es afectado en forma severa. Los brotes laterales llegan a ser anormalmente largos. La mas característica manifestación de una aguda deficiencia de cobre es la inhibición de la floración, esta es demasiado tardía.

Deficiencia de Zinc: Principalmente en la madurez el crecimiento de la planta es restringido, dando esta una apariencia de roseta. Las hojas medias y basales se tornan convexas por su haz y exhiben manchas cloróticas.

4.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

VENTAJAS

- *Pequeña necesidad de espacio.* **La multiplicación de vástagos puede conseguirse en un espacio reducido porque se multiplican vástagos pequeños.**

- **Esterilidad.** La propagación se lleva a cabo en condiciones estériles. No deberían producirse pérdidas por plagas o enfermedades y las plántulas producidas finalmente deberán estar libres de bacterias, hongos, nemátodos.
- **Certificación de ausencia de virus.** Si se utilizó material libre de virus para iniciar los cultivos, pueden producirse grandes cantidades de plantas libres de virus.
- **Condiciones controladas.** Las condiciones para la multiplicación “*in vitro*” pueden controlarse estrictamente: luz, composición del medio, niveles de reguladores de crecimiento, temperatura, etc. Pueden conseguirse reproduciblemente altas tasas de propagación.
- **Producción continua.** La producción puede mantenerse continuamente sin variaciones estacionales.
- **Trabajo.** No se necesitan atenciones entre los subcultivos (como riego, eliminación de malas hierbas, fumigación.)
- **Espacio de invernadero.** El espacio de invernadero requerido es menor.
- **Plantas en stock.** Las plantas en stock pueden almacenarse “*in vitro*”. Se da la posibilidad de almacenar e intercambiar germoplasma con el menor riesgo.
- **Espectro de especies.** Algunas plantas propagadas “*in vitro*”. son difíciles o imposibles de propagar *in vivo*. Existe la posibilidad de propagar rápidamente una variedad de la cual existan pocos individuos.
- **Mecanización.** Se pueden automatizar los procesos de propagación de algunas especies para reducir el trabajo necesario.

El crecimiento en campo de las plantas propagadas "*in vitro*" es frecuentemente más vigoroso que las clonadas *in vivo*, esto es debido al rejuvenecimiento y a que se encuentran libres de enfermedades

DESVENTAJAS

- **Instalaciones muy especializadas.** Se necesitan instalaciones altamente especializadas (como habitaciones de cultivo, cabinas de flujo laminar, etc.)
- **Trabajadores especializados.** Los trabajadores deberán ser capaces de trabajar en condiciones estériles y de decidir donde dividir los distintos cultivos.
- **Contaminación.** Si se produce contaminación bacteriana o fúngica en las fases tempranas de la multiplicación pueden perderse muchos propágulos potenciales.
- **Condiciones de micro propagación.** Puede ser necesario desarrollar métodos específicos para cada especie con el fin de conseguir una micro propagación eficaz, incluyendo las condiciones de enraizamiento y de establecimiento de las plántulas .
- **Tamaño de la plántula.** Las plántulas inicialmente son pequeñas .
- **Costes.** Dado que las instalaciones requeridas y los procedimientos suponen un intenso trabajo, el coste de las plántulas es relativamente

alto y debe compensarse por tanto con una producción a gran escala y con un valor añadido elevado de las plántulas producidas (Llano, 1990).

4.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS VARIEDADES DE PAPA PARDA, COLORADA Y YEMA DE HUEVO

4.5.1 YEMA DE HUEVO

Es una variedad antigua de la especie *S. phureja*, sus características morfológicas son:

- **Planta:** Es una planta de tallos delgados verdes claros, ramificados, porte bajo. Folíolos primarios pequeños, verdes claros, rugosos. Flores abundantes, color lila. Fructificación mediana.
- **Tubérculos:** De forma redonda. Piel amarilla. Pulpa amarilla. Ojos de profundidad media.

Sus características agrícolas son:

- **Adaptación :** 2600 a 2800 m.s.n.m.
- **Su periodo vegetativo :** 4 de meses.

- **Materia seca** : 22.3% (peso específico 1.090)
- **Porcentaje de azúcares reductores** : 0.1.

4.5.2 PARDA PASTUSA

De las variedades Quincha (**S. Andigena**) x Tocana colorada (**S. andigena**).

Sus características morfológicas son:

- **Planta:** La planta posee tallos erectos, verdes, foliolos medianos verdes claros. Flores grandes, color lila con acúmenos blancos. Fructificación abundante.
- **Tubérculos:** Forma redonda aplanada. Piel rosada. Hojos de profundidad mediana. Pulpa crema.
- **Adaptación** : 288 a 3200 m.s.n.m.
- **Periodo vegetativo** : 6 a 7 meses.
- **Materia seca** : 22.5% (peso específico 1.091)
- **Porcentaje de azúcares reductores:** 0.25 %.

4.5.3 COLORADA

Es una variedad de la especie *Solanum phureja* , sus características morfológicas son:

- ▶ **Planta:** Es una planta de tallos gruesos, de tallos erectos verdes.

- ▶ **Tubérculo:** De forma redonda aplanada, piel amarilla, pulpa amarilla, ojos de profundidad mediana.

- ▶ **Adaptación:** 2800 a 3000 m.s.n.m.

- ▶ **Período vegetativo:** 4 meses

- ▶ **Materia seca:** 22%

La papa, introducida de América en Europa en 1585, y posteriormente diseminada por el mundo, constituye uno de los cultivos de mayor importancia mundial. Ocupa cuarto lugar en el mundo entre los 10 principales cultivos, y su producción anual asciende a más de 200 millones de toneladas.

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

Seleccionada y mejorada por los países desarrollados, la papa regresa a su lugar de origen; como producto mejorado, condiciona a muchos países a importar material de siembra y depender así de los mercados desarrollados.

A pesar de la investigación que se hace en el cultivo de la papa, la producción de su “semilla” es una actividad que debe evolucionar hacia técnicas más eficientes. El objetivo fundamental es producir un material de siembra con alto grado de pureza varietal y de calidad fitosanitaria. La papa es uno de los cultivos con más requerimientos tecnológicos para la producción de semilla porque está expuesto al ataque de organismos patógenos como hongos, bacterias y virus. Algunos de estos patógenos habitan en el suelo y afectan los rendimientos del cultivo; otros son

transportados por el aire o por otros medios y causan epifitotia que deben controlarse aplicando productos de control químico. De esos organismos, los más importantes son los causantes de enfermedades virales porque se perpetúan en la descendencia clonal.

El tubérculo se considera como la semilla unitaria tradicional, y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo incluyendo su estado fitosanitario.

En muchos países, la imposibilidad de producir semilla básica de modo estable ha incrementado la importación de ésta en cantidades significativas. En posteriores multiplicaciones, esos países han alcanzado niveles de producción estables y adecuados. La importación y la manipulación de grandes volúmenes de semilla trae consigo la introducción y el establecimiento de plagas y enfermedades. Es necesario pues desarrollar métodos avanzados de producción de semilla en aquellos países donde, además de importar esa semilla, , haya focos de infección viral todo el año y tengan esquemas de producción de semilla de hasta 10 años.

4.6 Multiplicación de material libre de virus

La necesidad de aumentar las tasas de multiplicación de semilla o de incrementar simplemente el número de tubérculos ha motivado la reacción de sistemas de multiplicación de la papa, como los siguientes:

- ❖ **Corte de tubérculos.**

- ❖ Producción de esquejes de brotes de tubérculos.
- ❖ Producción de esquejes de tallo adulto.
- ❖ Producción de esquejes de tallo juvenil.
- ❖ Producción de tubérculos usando esquejes de hoja-yema.
- ❖ Doble cosecha de papa.
- ❖ Multiplicación “*in vitro*” mediante las técnicas del cultivo d tejidos.

El desarrollo de esas técnicas ha traído el uso frecuente de la expresión “multiplicación rápida o acelerada”. La multiplicación acelerada de la papa se refiere a un conjunto de técnicas que aumentan los coeficientes de multiplicación de semilla básica a niveles no alcanzados por los métodos tradicionales.

4.6.1 Saneamiento de variedades

A diferencia de las enfermedades causadas por hongos, aquellos causadas por virus no pueden ser controladas químicamente, ya que los virus y viroides utilizan el metabolismo de la planta para su reproducción. Una vez que una planta adquiera la enfermedad viral, ésta se transmite de una generación vegetativa a otra.

Los métodos terapéuticos (termoterapia o quimioterapia) contribuyen al saneamiento de las plantas cuando se utilizan asociados con el cultivo de tejidos “*in vitro*”. El éxito de setas metodologías dependen del virus que se desee eliminar y de la variedad de papa. El concepto de plantas “libres de

virus” es válido solamente cuando se especifica el virus, o la enfermedad viral, que haya sido detectado usando técnica virológicas efectivas;; por ese motivo, el concepto de plantas “probadas para virus” es más apropiado.

4.6.2 Cultivo de Meristemas de Papa

Ha sido demostrado que los puntos de crecimiento de brotes y raíces de plantas infectadas con algún virus están libres de él o lo llevan solamente en concentraciones muy bajas (Kassanis, 1957).

Morel fue el primero en demostrar que podían obtenerse, mediante el cultivo de meristemas, plantas de papa libres de virus a partir de plantas infectadas. En la planta, porciones de tejido con capacidad embrionaria persisten durante toda su vida; estos tejidos perpetuamente jóvenes son los meristemas.

El cultivo e meristemas “*in vitro*” puede usarse para producir plantas libres de patógenos a partir de una planta que esté sistémicamente infectada ya sea por micoplasmas (Jacoli, 1978; Lizárraga et al. , 1983).

El resultado final del trabajo de saneamiento debe comprobarse mediante técnicas precisas de diagnóstico para virus y otros patógeno. De esta manera, el proceso de saneamiento incluye cuatro pasos importantes:

- ❖ Identificación del virus.
- ❖ Aplicación de las técnica de eliminación.
- ❖ Pruebas de las plantas regeneradas.

- ❖ Propagación de plantas sanas.

4.6.3 Pruebas para la Detección de Patógenos

Durante muchos años, la selección de plantas aparentemente sanas para la producción de semillas estuvo basada en la simple observación de las enfermedades en el campo y, en algunos casos, en técnicas de diagnóstico poco sensibles.

La introducción de la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ha mejorado considerablemente la detección y el diagnóstico de enfermedades virales de la papa en los últimos cinco años. En consecuencia, los métodos de detección de virus como el A₆, el Igel-lange o las pruebas serológicas básicas (aglutinación, microprecipitación, difusión radial, o precipitados de látex) han sido reemplazados por la técnica ELISA. Detalles de esta técnica han sido descritos por diversos autores (Clark y Adams, 1977; Gugerli, 1979; 1980; Salazar, 1982).

La técnica ELISA ha revolucionado la solución de los problemas prácticos del diagnóstico de enfermedades virales en el cultivo de la papa, por su precisión y por el grado de automatización con que se puede realizar. Su eficiencia se basa en la alta especificidad de la preparación de los anticuerpos requeridos. La introducción de anticuerpos monoclonales altamente específicos para el virus de la papa (PVY) (Gurely y Fries, 1981; 1983) mejoró considerablemente la sensibilidad

de ELISA. Igualmente, la automatización del proceso ha permitido probar hasta 10,000 muestras de tubérculos por día, usando equipos especiales combinados con un elevador automático de placas, con dispensadores y con espectrofotómetros. Con las computadoras, finalmente se obtendrá un máximo beneficio de ésta técnica.

La observación cuidadosa de las plantas de papa en el campo y en los invernaderos, así como la verificación regular de su estado sanitario mediante la microscopia electrónica, seguirán complementando cualquier tecnología nueva. Los métodos mas sensibles, como ELISA, pueden usarse dentro de esquemas de micropropagación in vitro.

Algunos laboratorios determinan el estado fitosanitario de sus líneas de cultivo in vitro dejando, al momento de micro propagar, los dos micro esquejes, basales para la observación en el microscopio electrónico. Esta operación se realiza durante tres ciclos de micro propagación. Sin embargo el orden lógico de aplicación de las pruebas de detección de virus asociada a la micro propagación podría ser:

1. Microscopio electrónico
2. ELISA
3. Electroforesis o técnicas de hibridación de ácidos nucleicos; para el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV), si estuviera presente.
4. Plantas indicadoras.

En algunos casos, el material obtenido in vitro no será suficiente, deberá pues sembrarse en macetas para multiplicarlo y realizar todas las pruebas necesarias, aumentando sí la certeza del estado sanitario de las variedades de papa.

Colección de semilla básica de papa libre de enfermedades

Casi todas las colecciones de papa se conservan con métodos tradicionales, es decir, se siembran en áreas en las cuales se corre el riesgo de que contraigan reinfecciones. La mayor parte de estos materiales pueden contaminarse con uno o mas virus, ya que es prácticamente imposible mantener en el campo un cultivo en condiciones óptimas de sanidad.

El cultivo de tejidos ofrece una alternativa para el mantenimiento de variedades de papa libres de enfermedades. Aplicando estas técnicas de cultivo, el centro Internacional de la papa (CIP) en Lima, Perú, ha reunido una colección in vitro de alrededor de 500 clones.

De las varias metodologías que pueden aplicarse para el mantenimiento in vitro de la papa, se pueden citar:

- ❖ Criopreservación.
- ❖ Métodos de callos secados
- ❖ Métodos de crecimiento limitado.

El método de congelado rápido ha sido aplicado a la papa por (Bajaj, 1981) con yemas axilares y 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) como crioprotector; la técnicas de los callos secados fue usada por (Nitzsche, 1983) en una línea de papa.

Roca et al. (1978) han señalado que el mantenimiento in vitro en condiciones de crecimiento normal es una labor intensiva, ya que las "microestacas" deben ser trasferidas a un medio fresco y regeneradas como planta nueva cada dos o tres meses. Por tal razón se han propuesto diferentes formas de reducir la frecuencia de trasferencia de los cultivos (Westcott et al., 1977; Schilde-Rentschler, 1979), Estrada et al. (1983) informan que la colección de clones de papa del CIP ha estado almacenada in vitro sin ninguna trasferencia durante un año, a 22- 25 °C , con 3000 lux de iluminación y con 16 h de fotoperiodo en un medio que contenía 4% de manitol y 0.5 de sacarosa. Roca (1981) ha señalado que un cuarto dedicado a banco de germoplasma con temperatura controlada, iluminación, estantes apropiados, y con dimensiones de 5 x 6 x 2.5 m, tiene una capacidad para el almacenamiento de 20,000 tubos de ensayo con cultivos de meristemas de yuca, (*Manihot esculenta*).

4.6.4 Semilla Básica de papa y cultivo de tejidos

Después del éxito de Morel (1965) en la multiplicación de orquídeas in vitro, se ha incrementado el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativa para la propagación asexual de plantas de importancia económica.

Las partes de la planta empleadas para esta técnica son tan pequeñas, que han propiciado el uso de término micro propagación. Esta técnica tiene las siguientes ventajas

- producción de millones de plantas en un año

- intercambio internacional de material, reduciendo o eliminando los riesgos de diseminación de patógenos
- aplicación de la técnica en cualquier época del año.

Organizar la producción de semilla básica de papa empleando el cultivo de tejidos exige ponderar la importancia de los siguientes aspectos:

la producción a nivel regional o nacional; los recursos económicos existentes; los recursos técnicos de que se disponga; el nivel mínimo de conocimiento y destreza en esas técnicas de cultivo. No se trata simplemente de introducir la tecnología sino más bien de adecuarla a las condiciones concretas de la institución, la región o el país.

Varios países (Francia , Viet Nam , Hungría, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, Cuba, Perú) han incorporado una etapa de cultivo de tejidos a los esquemas de producción de semilla básica de papa. Viet Nam (desde 1984) y la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (desde 1976) utilizan la micropropagación "*in vitro*" en este proceso.

Hay cuatro fases importantes en la producción de semilla básica de papa mediante la técnica de cultivo de tejidos, cada una de las cuales se explicará detalladamente:

Fase I : multiplicación de material libre de patógenos usando técnicas *in vitro*

Fase II : multiplicación intermedia en recipientes de mayor capacidad

Fase III: multiplicación en suelo enriquecido

Fase IV: producción de tubérculos en suelo tratado

Fase I : multiplicación de material in vitro

En esta fase, las plantas, colocadas en tubo de ensayo u otros recipientes, se subcultivan por medio de segmentos de nudos a una tasa de multiplicación muy alta.

Materiales

Para la micropropagación de papa pueden usarse, como material inicial, las plántulas obtenidas por cultivo de meristemos o las yemas de los tubérculos que han demostrado estar libres de enfermedades virales.

Yemas de tubérculos. El material seleccionado debe desinfestarse pasándolo por alcohol de 70% y colocándolo luego en una solución de hipoclorito de calcio al 0.5% durante 5 a 10 minutos, según su tamaño. Se enjuga luego tres veces con agua destilada estéril en un área a prueba de contaminaciones.

Las yemas de tubérculos dan origen a tallos vigorosos y a hojas relativamente grandes, en algunos casos compuestas; ambas estructuras son similares a las de las plantas adultas. Después de varias multiplicaciones (una por mes) las plantas desarrollan un tallo con hojas simples de tamaño variable. Este proceso puede experimentar modificaciones según la variedad de papa y el estado de incubación de los tubérculos. Por ejemplo en las variedades Bintje y BF-15 el estado juvenil se presenta entre la segunda y la cuarta multiplicación, cuando se parte de tubérculos almacenados a 20 °C durante 30 a 90 días desde la cosecha. A si pues, partiendo de una yema de una planta adulta sembrada "*in vitro*" y después de varias multiplicaciones en las condiciones mencionadas, ocurre un proceso de rejuvenecimiento del material.

Algunas formas de tallos juveniles encontradas in vitro poseen pequeños tuberculos que resultan del trauma producido cuando se cortan los esquejes de plántulas en la edad fisiológica avanzada.

Plántulas derivadas de meristemas. La disección de meristemas necesita de un microscopio estereoscopico; en la medida en que se usen practicas sanitarias estrictas en la ejecución de las operaciones aquí descritas, el éxito estará garantizado. Las cabinas de flujo laminar ayudan a prevenir contaminaciones, pero el alto costo de ese equipo puede limitar el desarrollo del trabajo. En Viet Nan se observó que los propios agricultores construían cámaras de transferencia para aplicar en sus casas las técnicas de micropropacion por segmentos de tallos (nudos). Estos resultados abren nuevas posibilidades a los productores.

Las condiciones para el cultivo de meristemas son :

Temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas, e iluminación de 12.000 a 13.000 lux.

El estado juvenil de las plántulas micropropagadas depende, en cierta medida, de las condiciones del cultivo. Alteraciones de estos parámetros han causado la perdida del estado juvenil, expresada en la aparición de hojas compuestas o en la formación de tuberculillos.

Otro medio utilizado es el de Knop en el cual se han desarrollado variedades de papa como Desiree, Baraka y Mariella. La composición de los medios se modifica dependiendo del tejido que se cultiva.

En el programa Cubano de semilla de papa se ha utilizado de modo general, para la micropropagación de papa, el medio A derivado del medio de Knop. Sus componentes son los siguientes:

Macroelementos: Se toman de la solución base para el medio Knop diluida a la mitad, pero empleando cinco veces mas potasio.

Microelementos: Se toman de la solución base para el medio Berthelot.

Producción de tubérculos in vitro

Esta técnica, así como la formación acelerada de yemas axilares, es de capital importancia en la micropropagación de la papa. La tuberización in vitro ofrece las siguientes ventajas:

- Se obtienen tubérculos en cualquier estación del año.
- Es posible almacenarlos en pequeño espacio.
- Sirven de material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada, y de experiencia en cultivos de tejidos.
- Sirven para siembras tempranas en campo, permitiendo así un escalonamiento de la producción.
- Se pueden transportar más fácilmente que las plántulas en tubos de ensayo.

El CIP ha desarrollado investigaciones para inducir tubérculos in vitro en un amplio rango de genotipos de papa. Pudo constatarse que se indujo la formación de tubérculos en todos los genotipos probados. En promedio una de 10 yemas axilares de plántulas cultivadas in vitro desarrolló estolones con pequeños

tubérculos en sus extremos. Cada tubérculo pesaba entre 3 y 38 mg, tenía dos o más ojos y expresaba, aun siendo de tamaño pequeño, caracteres como el color y la forma.

4.6.5 Protocolos para la multiplicación in vitro

1. Producción de tubérculos in vitro

- a) Coloque brotes axilares “ cosechados in vitro” en un medio MS con 22.0 a 44.0 μ M de BA y 0.23 M de sacarosa, en un erlenmeyer de 300 a 500 ml.
- b) Incube, a una temperatura de 18 a 20 °C, con un fotoperiodo de 8 horas, y con 100 a 500 lux de intensidad lumínica.
- c) En un lapso de 4 meses se obtienen de 30 a 50 tubérculos en miniatura de cada erlenmeyer (Hu Wwang, 1983)

2. Multiplicación por medio de nudos

- a) Estructure su programa de multiplicación partiendo de plantas obtenidas in vitro, ya sea de yemas de tubérculos libres de virus o de plántulas procedentes de meristemas.
- b) Corte, de la planta obtenida in vitro, varias estacas de manera que cada una posea una hoja y una yema axilar.
- c) Plante las estacas en un medio MS o Knop (diluido a la mitad y con cinco veces mas KNO_3 por litro) y en condiciones de cultivo como las ya descritas.
- d) Al cabo de un mes, repita sucesivamente los pasos b) y c).

- e) Se obtiene, en estas condiciones, un ritmo de multiplicación n de 5 a 7 estacas por mes.

3. formación acelerada de yemas axilares

- a) Transfiera plántulas regeneradas a la superficie del medio sólido MS + 0.005 M de ANA, en un erlenmeyer de 250 ml.
- b) Observe que dos o tres brotes axilares, con raíces adventicias, se desarrollan en 20 días.
- c) Manipule los nuevos brotes axilares desarrollados para que adopten una posición horizontal en la superficie del agar.
- d) Repita el paso c) con un intervalo de 20 días, hasta obtener como resultado una masa de brotes axilares.
- e) Coseche las yemas axilares con la ayuda de pinzas, y haga el subcultivo en un medio fresco.
- f) Repita el paso e) con 20 días de intervalo, obteniendo el doble o triple de proliferaciones por frasco (Hu y Wang, 1983).

Fase II: Multiplicación intermedia en semiesterilidad

La multiplicación in vitro de cualquier material ocurre en progresión geométrica. El ritmo de multiplicación in vitro de la papa puede ocurrir indefinidamente; sin embargo, factores de orden práctico limita esta posibilidad. Además, las condiciones ambientales de las cámaras de cultivo posibilitan la ocurrencia del "estado juvenil". El paso de una planta desde un cultivo in vitro al campo requiere una etapa de transición o intermedia. " los esquejes dejan de cultivarse en condiciones asépticas, lo que facilita las operaciones, conservando algunas

ventajas del cultivo estéril en tubos, en particular, la protección contra las infecciones virales y la conservación en la fase juvenil” (Rossignol-Bancilhon y Nozeran, 1979).

Es posible desarrollar este sistema o fase intermedia en cajas de vidrio orgánica transparentes (40 x 25 x 25 cm) que llevan arena hasta una altura de 5 a 7 cm. Las cajas están protegidas con una plícula de polietileno transparente para evitar la deshidratación del material sembrado. Estas cajas se colocan en estantes iluminados, semejantes a las que utilizan para colocar las gradillas en los tubos de ensayo empleados en la micropropagación in vitro. El sustrato que sirve de soporte para plantar esquejes de plántulas tienen importante en el éxito del transplante.

Fase III: Multiplicación en suelo enriquecido o tratado

Las plántulas obtenidas en la fase intermedia son frágiles y pequeñas, condición que limita su trasplante directo al campo. Se crea así la necesidad de otra fase que consiste en el traslado de las plántulas a pequeños cubos de tierra comprimida y enriquecida (una mezcla de tierra, turba, arena y fertilizante), colocados en intervalos húmedos, con temperaturas de 19 a 20 °C, y con una iluminación muy alta durante 18 horas.

De esta manera, gracias a la nutrición mineral suministrada en riegos frecuentes con la solución de Hoagland y a la iluminación alta, los pequeños esquejes se convierten rápidamente en plantas robustas, de hojas compuestas.

Como se ha explicado, el estado juvenil de las plántulas de papa permite utilizar más frecuentemente el material vegetal para la micropropagación; por otra parte, este estado puede extenderse o acostarse con las condiciones del cultivo in vitro. Ahora bien, una vez trasladadas las plántulas de la fase intermedia a la fase de suelo enriquecido, comienza a producirse la pérdida paulatina del estado juvenil que ha sido aprovechado hasta ahora.

El fotoperiodo largo (18 horas) a que se someten las plántulas retarda el proceso de tuberización. No debe olvidarse que, al final del proceso, serán llevadas al campo para que produzcan tubérculos.

Fase IV : Producción de tubérculos

La producción de semilla básica de papa requiere condiciones fitosanitarias estrictas. En ocasiones, es difícil encontrar lugares con una baja incidencia de áfidos o pulgones (vectores de enfermedades); por ello, la selección del lugar adecuado se hace crítica.

4.7 PRINCIPIOS DE PROPAGACIÓN DE PLANTAS

4.7.1 Diferentes dosis de ácido giberélico utilizado en la micropropagación de papa.

Se realizó un ensayo sobre el efecto de 4 niveles de ácido giberélico en el crecimiento de explantes de papa de la variedad: Revolución. Se prueba en las concentraciones: GA₃(0.25ppm, 0.12ppm, 0.30ppm, 0.48ppm, 0.96ppm) como suplemento del medio de cultivo de Murashige & Skoog.

Se colocaron 4 plantas de aproximadamente 0.5 cm de longitud correspondientes a los entrenudos, los ápices se descartaron para este propósito porque sabemos que tienen tasas de crecimiento más aceleradas y no podríamos compararlas con las correspondientes a los entrenudos. Se evalúa el crecimiento cada 8 días y se tomaron en cuenta parámetros como: altura de tallo, longitud de raíces, # de entrenudos, “ resultando satisfactorio para promover el crecimiento del tallo el nivel de (0.96 ppm) en relación al testigo, mientras en relación al número de entrenudos, el testigo resultó mejor, como puede apreciarse en el cuadro, en cuanto a la longitud de raíz, el tratamiento(0.48ppm) tuvo igual crecimiento del testigo, el # de raíces no se vio afectado por ninguno de los tratamientos (Álvarez, 2000).

4.7.2 EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SACAROSA EN MICROPROPAGACION DE LA PAPA

Fue investigado el efecto de la concentración de la sacarosa en la micropropagación de la papa, los brotes fueron utilizados como material que

comenzaba para producir plantas in vitro. Las condiciones del crecimiento eran de un fotoperiodo de 16 horas, una temperatura de 25 a 27°C y los medios de cultivo el MS (1962) sin hormonas complementados con sacarosa del 4%. Los cortes nodales fueron multiplicados en medios frescos para la obtención de nuevas plantas. Los nuevos cortes nodales fueron inoculados en medios MS frescos sin hormonas con (4, 6, 8, 10 y del 12%) de sacarosa, a una temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 8 horas que fue proporcionada para la formación de microtubérculos. Según los resultados obtenidos, la concentración de la sacarosa en los medios puede estimular la formación del tallo (sacarosa 4%) y del microtubérculo 8 sacarosa de 6, de 8, de 10 y de 12 %). El número más alto de microtubérculos fue obtenido con la concentración de sacarosa del 10 %; puede ser concluido así, que la alta concentración de sacarosa junto con un fotoperiodo corto, temperaturas relativamente bajas y sin el uso de hormonas de crecimiento se puede utilizar para producir los microtubérculos para la micropropagación de la papa (Nawsheem, 2001)

4.7.3 Efecto de la edad fisiológica del tubérculo de la madre y del número de subcultivos en la tuberización “in vitro” de la papa.

La edad fisiológica del tubérculo de la planta madre usado como fuente de tuberización in vitro inducidos con kinetina. El peso de la planta y del microtubérculo seco disminuyó con el aumento de número de subcultivos. Para cualquier edad fisiológica, el material se puede multiplicar con seguridad usando la

propagación del nodo hasta el tercer subcultivo y los biensayos para la tuberización no tienen variación en la respuesta (Villafranca, *et al.*, 1996).

4.7.4 Micropropagación Fotoautotrofica para producción comercial de cultivares de papa andígena.

Se realizó una secuencia experimental para determinar el comportamiento de plantas de papa; los ensayos fueron I. 30 gramos de sacarosa / L y sustituir tapas normales por membranas provistas de filtro de microporo con medio normal. II sin sacarosa, empleando tres tipos de propágulos: a) nudos simples (sin lámina foliar) b) ápices c) microesquejes (con lámina foliar) III Medios de cultivo con diferentes gramos de sacarosa (0.5g/l ; 10 g/L; 15g/L; 20 g/L; 25 g/L y 30g/L. Empleando solamente microesquejes IV remultiplicación en condiciones fotoautotropicas y V Porcentaje de rendimiento en invernadero.

Los resultados en el tercer ensayo fueron: el crecimiento longitudinal de las plantas fue inversamente proporcional a las concentraciones de sacarosa, la pigmentación se muestra mas intensa en los niveles mayores de azúcar (Salaues, 1995).

4.7.5 Efecto del tamaño del recipiente sobre la micropropagación de la mandioca (Manihot esculenta).

Numerosos estudios tratan sobre el efecto del medio de cultivo y de las condiciones físicas de incubación. Sin embargo es relativamente poco lo que se

conoce con respecto al efecto del tamaño del recipiente sobre la eficiencia en la micropropagación. Se cultivaron microestacas de tallo de mandioca de 1.5 cm conteniendo una yema. El medio de cultivo compuesto de sales minerales, vitaminas y sacarosa de MS (1962) suplementado con 0.01 BAP, 0.01 ANA, y 0.1 GA3 el cultivo de microestacas fue realizado en recipientes de vidrio de 400 cc, 100 cc, 80 cc, 30 cc y 10 cc de capacidad total. Ph a 5.7 (antes de adicionar agar 0.8%). Al cabo de 30 días de cultivo se evaluó los parámetros siguientes: número de hojas, de nudos y de raíces, longitud de tallo y raíces, peso fresco y peso seco. Los resultados en general un mayor crecimiento en los parámetros evaluados(longitud de tallo, número de hojas, área foliar, peso fresco y peso seco , se obtuvo en recipientes de 30 cc. En cambio el mayor crecimiento de área radicular (número de raíces, longitud de raíces) en recipientes de 400 cc. Sin embargo en la producción total de la biomasa las plantas regeneradas en los diferentes recipientes no obtuvieron diferencias significativas, lo que sugiere que el tipo de recipiente afectaría la distribución de la biomasa. Es probable que un factor relacionado con la fase gaseosa del cultivo influya en éste comportamiento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La pasantía se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología vegetal del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) Cauca. Localizado en el Km. 7, vía a Cali, 1640 m.s.n.m.

Humedad relativa: 60% y 70%

Temperatura promedio: 21°C y 23°C.

Laboratorio de Agroquímica, Universidad del Cauca, Popayán.

Laboratorio de suelos, Secretaria de Agricultura, Popayán.

5.2 METODO

Se utiliza la técnica de **Cultivo de Tejidos** que comprende las siguientes etapas

5.2.1 Selección de plantas madres

Las plantas madres de papa se obtienen de semilla de básica de *Solanum tuberosum*, las cuales la variedad parda pastusa, *Solanum tuberosum* ssp andigena certificada proviene de Corpoica Tibaltata, Yema de huevo *solanum*

phureja, la cual proviene de Nariño, esta certificada, la variedad Colorada aun no esta certificada y se origina en los cultivos de la región son plantas que presentan buen estado fitosanitario , son seleccionadas con el ingeniero agrónomo responsable del proyecto en campo, figura N° 1



Figura N° 1 Selección de plantas madres

Se corta una porción de la planta madre desde el ápice y entre los nudos hasta 10 cm antes de la raíz, de esta manera se obtienen los explantes para la siembra in vitro, figura N° 2.



Figura N° 2. Obtención de explantes

5.2.2 Desinfestación:

Se hace la desinfestación de los cortes con tween al 1% durante 10 minutos, se enjuagan los explantes 3 veces con agua destilada estéril , luego se lavan con hipoclorito de sodio NaClO al 2% durante 15, se enjuaga con agua destilada, se sumergen en etanol al 70% durante 15 segundos y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril.

5.2.3 Aislamiento de Yemas

Los explantes desinfectados se llevan a la Cámara de flujo laminar y se procede a extraer las yemas, y nuevamente se desinfectan en alcohol al 70% durante 30 minutos, Figura N° 3.



Figura N° 3 Aislamiento de yemas.

5.2.4 Siembra “in vitro”

Las yemas aisladas se siembran en recipientes pequeños, que contienen el medio de cultivo previamente preparado, figura N° 4, de acuerdo a la formulación relacionada en el anexo A. Y la composición de los medios se relaciona en el cuadro N° 1



Figura N° 4. Siembra de los explantes de papa.

5.2.5. Incubación: Los explantes después de ser sembrados en los frascos se llevan a la sala de incubación, que se encuentra a una temperatura promedio de 22°C y una humedad relativa de 65%, como se observa en la figura 5, donde permanecerán por observación física y asepsia del medio durante un periodo de 15 días hasta la transferencia.



figura 5 Sala de incubación

Diariamente se controla por observación de los explantes las cualidades del medio de cultivo. Cuando se presenta contaminación por virus o bacterias, del explante o del medio, se hace un descarte de los frascos contaminados y se reemplazan por nuevas siembras. Si la contaminación es general, se revisa el protocolo de desinfección de los explantes, o del proceso de esterilización del medio según el caso.

5.2.6. *Transferencia*

Después de los 15 días de ser sembrados los explantes, se transfieren a recipientes de 250 cc y de 100 cc de capacidad total con medio nuevo, de diferente concentración, cuya composición se relaciona en la cuadro N°2. En este

medio permanecerán 15 días y se repite el proceso haciendo transferencias de las plántulas a nuevo medio cada 15 días durante 8 -10 semanas.

5.2.7 Multiplicación

Esta se realiza cuando los explantes tienen aproximadamente 5 cm de altura. Consiste en hacer corte de estas plántulas entre los entrenudos, para ser sembrados en nuevo medio, allí permanecerán 15 días; en la literatura se reportan ensayos en donde cuando la planta cultivada in vitro ha alcanzado una altura entre los 6-10 cm con por lo menos 3 nudos, se hacen los cortes del nudo ya que de esta manera se asegura una producción rápida de grandes cantidades de plantas para la etapa de multiplicación (Hussey y Stacey, 1981).

5.2.8. Enraizamiento

Después de varias multiplicaciones los nuevos explantes se dejan crecer y se transfieren a un medio nuevo, el cual contiene hormonas de crecimiento y enraizamiento. su composición se relaciona en la cuadro N°3.

La técnica de cultivo de tejidos, se realiza con explantes proveniente de 3 variedades regionales de papa: Parda Pastusa (*Solanum tuberosum*), yema de huevo (*Solanum phureja*) y colorada (*Solanum phureja*)var. Colorada

Se adoptan procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana y se proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o

inducido, se realizan ensayos de varios protocolos de medio de cultivo, para obtener el medio de cultivo más apropiado para cada variedad.

Para cada variedad se ensayan inicialmente 6 protocolos de medio de cultivo utilizados normalmente para micropropagación de papa. De acuerdo a los resultados observados se hicieron modificaciones a algunos de esos protocolos, obteniéndose un total de 10 protocolos para los ensayos. Cada protocolo contiene varios medios de cultivo: a). **Un medio para siembra o iniciación**, es el medio que se utiliza para sembrar los explantes que son extraídos inmediatamente de la planta de la planta madre b) **un medio para la fase de multiplicación** y c) **un medio para enraizamiento**. (su composición se relaciona en los cuadros N° 1, 2 y 3 respectivamente), de los cuales se seleccionan los más apropiados con base al crecimiento óptimo de las plántulas. Para ello se realizan 4 ensayos con el objeto de obtener el protocolo de medio de cultivo más adecuado para cada variedad.

5.3 PREPARACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE MEDIO DE CULTIVO EN PAPA

Para preparar el medio se procede primero a preparar las soluciones madres o stock: se prepara stock de sales, en la que la sal de hierro se prepara por separado, stock de vitaminas, stock de hormonas. Para la preparación del medio es necesario revisar las soluciones madres, antes de proceder a las mezclas, luego se adicionan primero las sales, luego las vitaminas y después la solución de hormonas en las proporciones necesarias para que presente las concentraciones

relacionadas en los cuadros para cada protocolo en cada etapa. Y se mide el pH que debe ser de 5.8. Por separado se disuelve el agar en agua caliente destilada estéril, luego se procede a hacer la mezcla de sales y el agar. La mezcla se lleva a un micro ondas durante 5 minutos a una potencia de 10 con el objeto de homogenizar para que la solución quede completamente translúcida.

Después esta solución se sirve en los frascos respectivos donde se hace la siembra de los explantes y se cubren con papel aluminio, se empacan estos recipientes en grupos de 9 o 12 frascos protegiéndolos con papel craft, se rotulan con la fecha, composición (siembra, multiplicación o enraizamiento) para luego esterilizar en un autoclave durante 20' a 15 libras de presión y 121°C. Luego se dejan enfriar y se almacenan en refrigerador a 4°C.

Los medios que llevan agar quedan sólidos y los que no quedan líquidos, en este caso la preparación es la misma, pero obviando la preparación del agar.

A manera de ejemplo, en el anexo 1 se describe el procedimiento para preparar el medio correspondiente al protocolo 9 .

5.3.1 **Medio de cultivo para siembra:** Los 10 protocolos utilizados para el medio de cultivo para siembra, se preparan de acuerdo a la composición relacionada en el cuadro N°1.

5.3.2 **Medio de cultivo para transferencia y multiplicación:** Los 10 protocolos de medio de cultivo utilizados se preparan de acuerdo a la composición relacionada en el cuadro N° 2.

5.3.3 **Medio de cultivo para enraizamiento:** Los 10 protocolos de medio de cultivo utilizados se preparan de acuerdo a la composición relacionada en la cuadro N° 3.

5.4 SELECCIÓN DE PROTOCOLOS

Con el objeto de seleccionar los protocolos mas apropiados, para cada variedad, se realizan 4 ensayos, en cada uno se agrupan los protocolos y se seleccionan los mejores de acuerdo al desarrollo y estado físico óptimo de la plántula.

5.5 CONSIDERACIONES NECESARIAS PARA LA PREPARACIÓN DEL

MEDIO

- Es necesario preparar el medio utilizado con agua destilada estéril o agua desionizada.
- Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes.
- Todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.
- Verificar la calibración de pH-chimetro y de las balanzas.
- Esterilizar los medios inmediatamente después de prepararlos.

5.6 ELABORACIÓN DE REGISTROS

Todas las operaciones que se realizan son registradas en un sistema de registro como el que se describe a continuación.

5.6.1 Registro de evaluación de soluciones stock: En este registro se controla el tiempo de preparación de un stock o solución madre, el cual preferiblemente debe utilizarse en el menor tiempo posible y se está controlando si el estado de la solución es óptima con respecto a ausencia de hongos, bacterias, precipitados etc. Como se detalla en el cuadro N° 4.

Cuadro N° 4. Registro de inventario de soluciones stock

Mes: _____

FECHA DE PREPARACIÓN	CULTIVO	STOCK	PROTOCOLO	ESTADO DE LA SOLUCION	RESPONSABLE

5.6.2 Registro de evaluación de preparación de medio de cultivo

En este registro se controlan las existencias de medio que se encuentran refrigeradas, su fecha, composición, cultivo y cantidad de frascos, de esta manera se evita almacenar medio de cultivo durante mucho tiempo. Se detalla a continuación.

Cuadro N° 5. Registro de preparación de medio de cultivo

Mes: _____

FECHA DE PREPARACION	CULTIVO	CANTIDAD	INSUMOS	TOTAL DE FRASCOS	RESPONSABLE

5.6.3. Evaluación de protocolos

Para evaluar los protocolos se hace el siguiente registro, tomando nota del estado de los explantes, desde la siembra, hasta su desarrollo.

Cuadro N° 6. Registro diario de evaluación de protocolos

Mes: _____

Fecha	Protocolo	Variedad	N° de explantes	Periodo de evaluación	RESULTADOS				
					Long. de entrenudos	Grosor tallo	Longitud tallo	N° de hojas	N° Explantes descarte

5.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico se realiza a el ensayo seleccionado como óptimo el cual se contiene los protocolos con los que se obtuvo las mejores características

físicas de los explantes de las 3 variedades de papa, Parda, Y. Huevo y Colorada, efectuando un ANOVA, un test de Duncan y un test de Kruskal - Wallis.

5.8 VALORACION DE LA ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES POR LAS PLÁNTULAS DE PAPA EN EL CULTIVO IN VITRO.

Con el objeto de cuantificar los elementos nutricionales tomados por la plántula, se realiza el análisis químico de los nutrientes, N, P, K, $\text{SO}_4^{=}$, Cu, Mg, Fe, Cu, Zn, B, y cloruros en los medios de cultivo seleccionados como óptimos, antes de la siembra de los explantes y después de retirarlos del medio en la etapa de transferencia, puesto que en esta etapa se presenta la mayor absorción de nutrientes (Herrera, 2000).

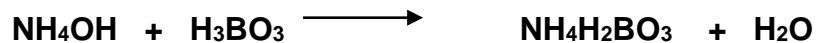
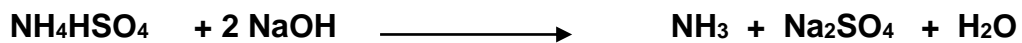
Para ello se homogeniza el medio del frasco y se toma una muestra para hacer las siguientes determinaciones.

5.8.1 Nitrógeno (N) mediante el método de Kjeldal.

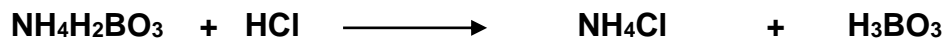
Para la determinación de N total se toma la muestra previa homogenización y se efectúa una digestión en medio de ácido sulfúrico y catalizadores. el procedimiento se realiza de acuerdo a las siguientes reacciones:



La descomposición del sulfato ácido de amonio, ocurre al adicionar un exceso de álcali para liberar el amoniaco, el cual se recoge por destilación sobre ácido bórico, las reacciones son.



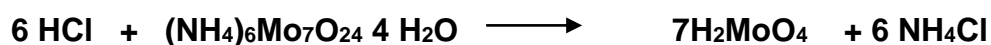
La titulación del borato de amonio formado en el paso anterior se valora con HCL, usando como indicador de punto final una mezcla de rojo de metilo y verde de bromocresol. La reacción es:



5.8.2. Determinación de Fósforo, Azufre, Potasio, Calcio, Magnesio y microelementos.

Para éstos elementos se hace una digestión ácida en HClO₄: HNO₃ (3:1) toda la noche, y después de obtener el extracto se hace la determinación de fósforo (P), boro (B), por colorimetría. y azufre (S) por el método turbidimétrico.

5.8.2.1 Fósforo: Se determina a partir del extracto obtenido de la digestión ácida, mediante el método colorimétrico, basado en la formación de un complejo de fósforo con ácido molíbdico, que absorbe a una longitud de onda a 660 nm.. El método cloro molíbdico utiliza una solución de $\text{HCl}-(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ donde al reaccionar produce el ácido molíbdico como se muestra a continuación.



La formación del complejo ocurre así:



Se realiza una curva de calibración con soluciones de fósforo obtenidas a partir de fosfato monopotásico KH_2PO_4 y se determina la concentración de la muestra por interpolación en esta curva, a una longitud de onda de 660 nm. En el fotocolorímetro.

5.8.2.2 Sulfatos: Se utiliza el método turbidimétrico para la determinación de sulfatos; que se basa en la precipitación de los iones SO_4^{--} en forma de BaSO_4 mediante la reacción:



Esta se mantiene en suspensión, mediante la adición de glicerina, posteriormente se hace la determinación en el fotocolorímetro. se realiza la curva de calibración

(a partir de una solución Stock de K_2SO_4 de 100 ppm) sobre la cual se interpoló la muestra problema. Y se lee a 420 nm.

5.8.2.3 Potasio, Calcio, Magnesio determinación por Espectrofotometria de Absorción Atómica: La técnica de EAA (Espectrofotometria de absorción atómica) consiste en que la muestra a analizar es atravesada por una radiación electromagnética proveniente de una lámpara cuyo cátodo está constituido por el metal del catión a determinar. Los iones de dicho metal, presentes en la solución, absorben la radiación de una manera proporcional al número de ellos; si se conoce la intensidad de la radiación antes y después de interaccionar con la muestra, puesta en estado gaseosa por un quemador, se puede conocer la concentración de un elemento en la solución volatilizada.

Se aplica esta técnica para la determinación de K, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe, Zn.

Potasio, Calcio y Magnesio, después de la digestión se determinan mediante la técnica de Espectrofotometria de Absorción Atómica a las siguientes longitudes de onda 740, 422.7, 285.2 nm respectivamente.

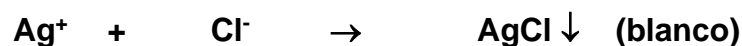
En este método se tiene en cuenta las interferencias de otros iones presentes, para determinar Mg^{2+} y Ca^{2+} , para controlar interferencias se adicionó óxido de lantano La_2O_3 al 1% y así las lecturas se pueden hacer con llama de acetileno-aire.

5.8.2.4. Cobre, Manganeso, Hierro, Zinc: Después de la digestión, se determinan mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica a las siguientes longitudes de onda 324.7, 285.2, 248.9, 213.9 nm respectivamente.

Se hace una curva de calibración para cada elemento (Fe, Cu, Mn, Zn), luego se realiza la lectura de cada muestra y se interpola para hallar la concentración de la muestra.

5.8.2.5 Boro: Para el boro después de la digestión, se cuantifica por colorimetría utilizando azometina H para desarrollar el color y leer en el fotocolorímetro a una longitud de onda, a 430 nm.

5.8.2.6 Cloruros: Los cloruros se determinan por el método Argentométrico que consiste en la determinación se basa en la reacción del nitrato de plata AgNO_3 con los cloruros de la solución utilizando como indicador cromato de potasio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$, de manera que el ión Ag^+ reacciona con los cloruros.



Formando un precipitado correspondiente a los cloruros de plata. Una gota de exceso del ion Ag^+ reacciona con el indicador formando un precipitado rojo el cual indica el punto final.



De manera que los miniequivalentes de AgNO_3 empleados en la titulación corresponden a los miniequivalentes de cloruro presentes en la solución.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizó la técnica de Cultivo de Tejidos, ensayando 6 protocolos inicialmente para la siembra, multiplicación y enraizamiento. Luego de observar resultados de cada protocolo y se realizaron modificaciones a algunos de ellos obteniéndose un total de 10 protocolos de medio de cultivo a ensayar para la tres etapas; en los cuadros 1, 2, y 3 se describen las concentraciones de los medios utilizados, los cuales se agruparon en 4 ensayos, con el objeto de seleccionar el más adecuado para las 3 variedades de papa. A los explantes se les practica un seguimiento diario y una evaluación semanal, de las variables: composición del medio o protocolo, longitud del tallo, número de hojas, longitud de entrenudos para cada variedad; esto con el fin de determinar el medio nutritivo adecuado.

A la planta madre se le realizó solamente una sola cosecha, al hacer el corte de los segmentos de ésta se desecha; aunque a literatura refiere que para cualquier edad fisiológica, el material se puede multiplicar con seguridad usando a propagación del nudo hasta el tercer subcultivo.

Tblas

6.1 ENSAYO 1

En este ensayo se utilizan 4 protocolos denominados P1,P2,P4,P5; en estos se siembran las 3 variedades de papa: Colorada, Parda y Yema de huevo, con 51, 43, y 49 explantes respectivamente para un total de 143 explantes, evaluados en la etapa de siembra, los resultados se describen en el cuadro N° 4 y en la figuras N° 6 y 7 donde se promedian para cada variedad los datos de longitud y en la figura N° 8 y 9 los datos de grosor del tallo.

Cuadro N° 4. Ensayo 1 Longitud y grosor del tallo de las plántulas de 3 variedades papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas in vitro, en un tiempo de 15 días.

PROTOCOLO	VARIEDAD	LONGITUD CM. *	GROSOR MM *
1	PARDA	0.5	1
2	PARDA	0.5	1
4	PARDA	0.3	1
5	PARDA	0.8	2
1	Y. HUEVO	0.4	1
2	Y. HUEVO	0.4	1
4	Y. HUEVO	0.5	1
5	Y. HUEVO	0.9	1
1	COLORADA	0.5	2
2	COLORADA	0.6	2
4	COLORADA	0.5	1
5	COLORADA	0.8	1.5

* promedio de : 43 datos Parda
49 datos Y. Huevo.
51 datos Colorada.

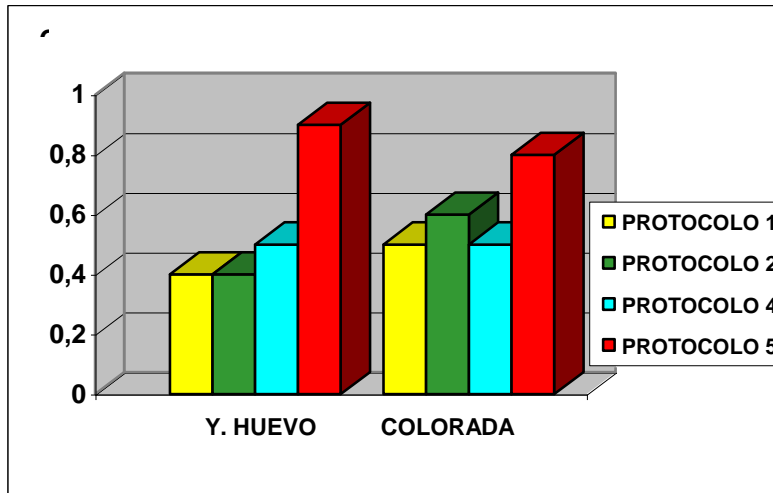


Figura N° 6. Longitud del tallo de las variedades de papa Colorada y Y. Huevo. cultivadas in vitro. Ensayo 1.

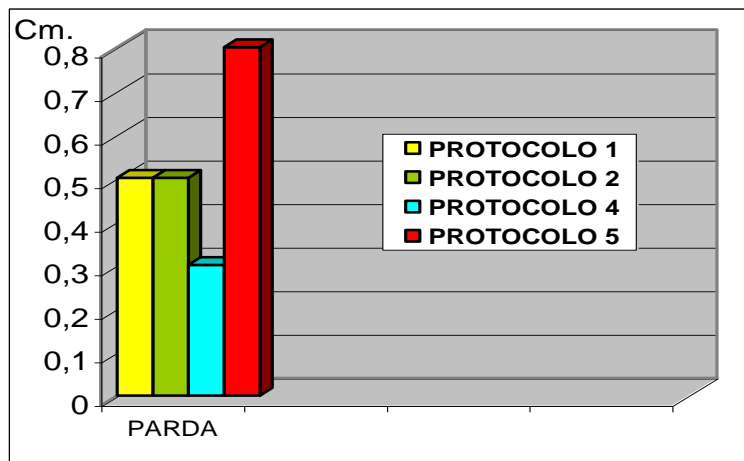


Figura N° 7. Longitud del tallo de la variedad Parada cultivada in vitro. Ensayo 1.

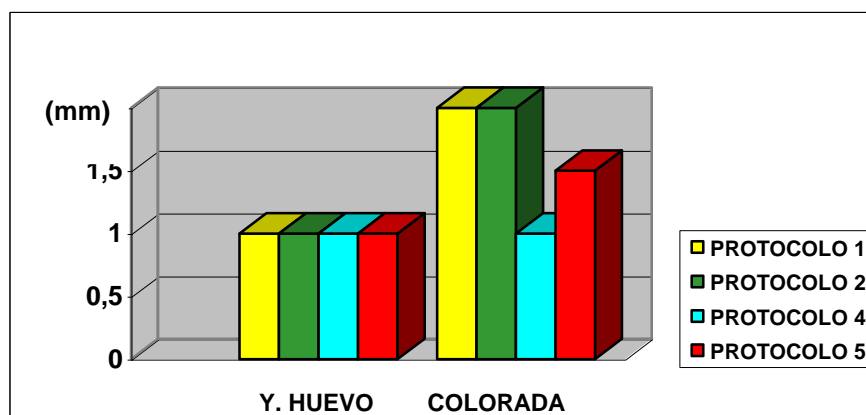


Figura N 8 Grosor del tallo de las variedades de papa Colorada y Y. Huevo. cultivadas in vitro. Ensayo 1.

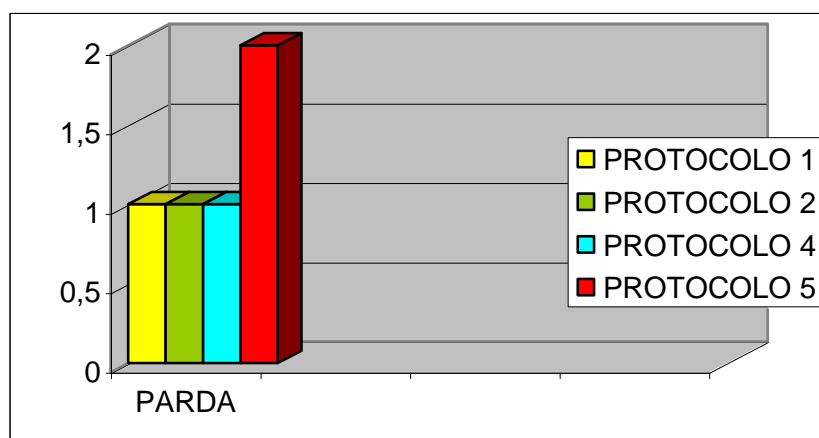


Figura N 9: Grosor del tallo de la variedad Parada cultivada in vitro. Ensayo 1

Las plantas en este ensayo, presentaron una alta contaminación, tejido muerto y poco crecimiento, se presentó tejido contaminado por hongos y bacterias a pesar de haber seguido las normas de asepsia. Comparada con los otros protocolos se puede pensar que la concentración de sales es baja en los protocolos P1 y P2, principalmente la concentración de Manganeso (Mn) y Cobre (Cu) debido a que estos elementos actúan en el sistema de defensa contra el ataque de patógenos

(GRAHAN, 1983) por este motivo no se aplica un análisis estadístico, sin embargo se puede observar que la mayor longitud para las 3 variedades se observa en el protocolo P5, en este protocolo se presentó poca contaminación por hongos y bacterias, lo que indica probablemente que la concentración de sales en este protocolo podría ser la más adecuada en todas las variedades.

En el protocolo P4, en la fase de iniciación se detecta la quema de las plántulas con fuerte necrosamiento, más acentuado que en los otros protocolos, esto se puede atribuir probablemente a la alta concentración de nutrientes presentes, que pueden causar toxicidad y muerte final de la plántula.

En cuanto al grosor, la variedad Colorada , presentan el mayor grosor, también la variedad Parda en el protocolo 5.

Se puede observar en la figura N° 6 que la variedad Yema de Huevo y Colorada tienen comportamientos similares con respecto a la longitud

Los resultados obtenidos en este primer ensayo en cuanto al crecimiento y grosor del tallo, se ven afectados por la contaminación de los explantes, teniendo en cuenta estos resultados se realizaron las siguientes consideraciones para realizar el ensayo 2:

1. Se analizaron las diferencias de concentraciones entre los diferentes protocolos y se observó que las concentraciones de los protocolos P1 y P2 son muy similares y se confirmaba en el resultado que expresaron los explantes, por tal razón se decidió descartar el protocolo 1 que presentó características físicas más negativas.

2. Debido a la necrosis que presentaron los explantes del protocolo 4, se decide hacerle una variación a éste, convirtiéndose así en otro protocolo P6.
3. Se incluyó el protocolo de medio de cultivo P3.

6.2. ENSAYO 2

Se realizó con los protocolos P2, P3, P4, P5, y P6, se sembraron las 3 variedades de papa, Parda, Colorada y Y. huevo con 31, 33 y 34 explantes respectivamente para un total de 98 explantes, evaluados en la etapa de transferencia, obteniéndose los resultados relacionados en la cuadro # 5 y figura # 10 y 11.

Cuadro # 5. Ensayo 2. Longitud y grosor del tallo de las plántulas de 3 variedades papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas in vitro, en un tiempo de 30 días.

PROTOCOLO	VARIEDAD	LONGITUD CM*	GROSOR MM*
2	PARDA	0	0
3	PARDA	1.5	0.2
4	PARDA	0	0
5	PARDA	5	0.15
6	PARDA	2.3	0.6
2	Y. HUEVO	0	0
3	Y. HUEVO	3.5	0.2
4	Y. HUEVO	0	0
5	Y. HUEVO	5	0.15
6	Y. HUEVO	2.1	1.0
2	COLORADA	1.2	0.15
3	COLORADA	3	0.2
4	COLORADA	0	0
5	COLORADA	6	0.2
6	COLORADA	2.3	1.2

* promedio de : 31 datos Parda.
33 datos Y. Huevo.
 34 datos Colorada.

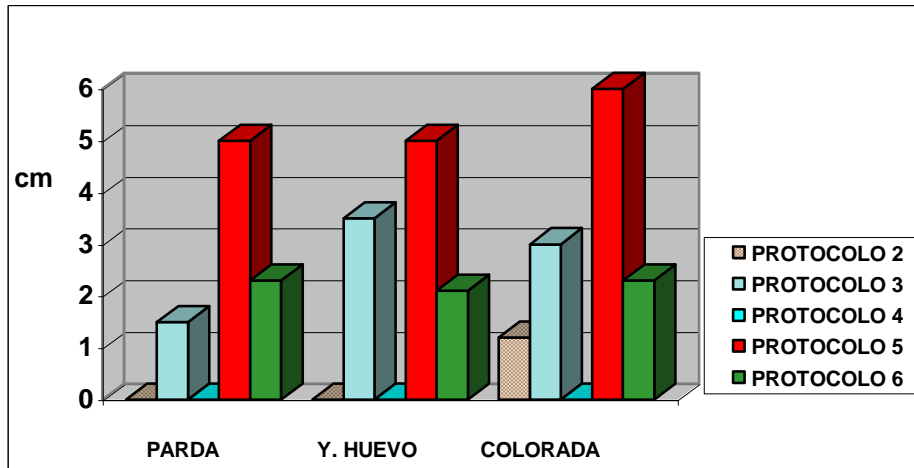


Figura N 10 : Longitud del tallo en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 2

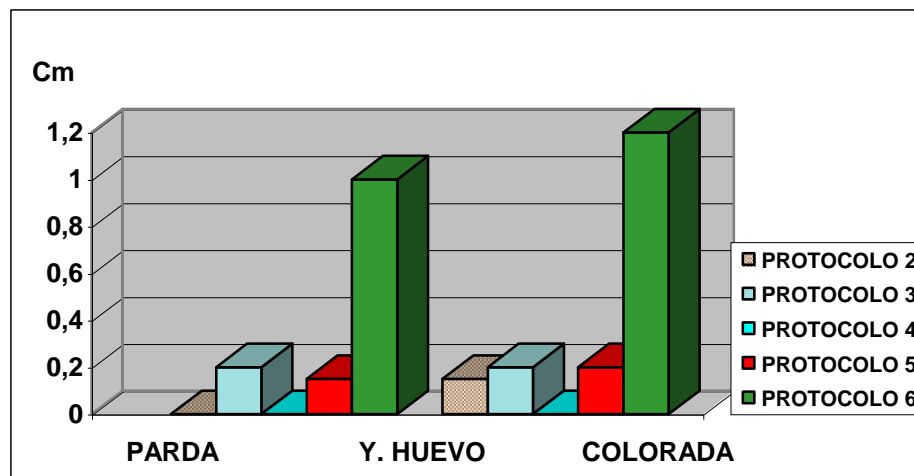


Figura 11. Grosor del tallo en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 2

En este ensayo se presenta gran contaminación especialmente en el protocolo P2 y P4, detectándose tejido necrótico y muerto, en las figuras # 10 y 11 se observa

la menor longitud y menor grosor para las plántulas de estos protocolos con relación a los protocolos 3, 5 y 6. Las plántulas de los protocolos 3 y 6 de este ensayo presentaron mejores resultados, por ejemplo en el protocolo 3 las plantas crecieron y presentaron buena coloración, un verde intenso, de acuerdo a su variedad.

Las plántulas de los protocolos 5 presentaron el mayor crecimiento del tallo de las plantas, con una coloración verde aceptable para cada variedad, el problema detectado fue plantas con tallos muy delgados y débiles. En la literatura se reportan ensayos sobre el efecto de diferentes concentraciones de GA3 para el crecimiento de explantes de papa; las concentraciones ensayadas fueron 0.25 ppm, 0.30 ppm, 0.48 ppm y 0.96 ppm; se evaluaron parámetros como la altura del tallo, longitud de la raíces y N° de entrenudos, obteniéndose resultados satisfactorios con la concentración de 0.96 ppm para el crecimiento del tallo, resultó mejor con relación al testigo. Efecto que se presentó en las plántulas de papa de las tres variedades con el protocolo P5 el cual contiene una concentración de la giberelina de 3 ppm, los tallos tuvieron un crecimiento mucho mayor con un promedio de 5.0 cm para la variedad parda y de 5-6 cm para las variedades Colorada y Yema de Huevo; la distancia entre los nudos de aproximadamente 2.0 cm obteniéndose así de 2 a 3 entrenudos en un tiempo de 60 días, factor no conveniente para obtener una buena tasa de multiplicación por segmentos nodales.

Las plántulas del protocolo 6 presentaron buen aspecto físico para todas las variedades especialmente para la variedad Parda pastusa, pero el inconveniente principal se debió a la presencia de tejido no diferenciado (callo) el cual impide que

la planta crezca normalmente, la planta comparte los nutrientes del medio con el callo y este tejido se tarda en diferenciar lo que no es benéfico para las plántulas. El mayor grosor en todas las variedades se presenta en este protocolo.

Teniendo en cuenta estos resultados del segundo ensayo se realizaron las siguientes consideraciones para realizar el ensayo # 3.

- ♦ Se tomó la decisión de descartar los protocolos P2 y P4.
- ♦ Se realizar variaciones al protocolo 5.
- ♦ **Variación 1.** Omitir la hormona Giberelina (GA3) y adicionar 0.5 mg/L Kinetina y 0.05 mg/L BAP. (Bencil amino purina) convirtiéndose en el protocolo 7.
- **Variación 2.** Omitir la hormona Giberelina (GA3), adicionar 0.5 mg/L kinetina y 0.75 mg/L de ácido indol butirico (IBA) convirtiéndose en el protocolo 8.
- **Variación 3.** Disminuir la concentración a la mitad de la hormona (GA3), 0.75 mg/ L, adicionar 0.5 mg/L Kinetina, 0.75 mg/L IBA y la mitad de la concentración de BAP del protocolo 7, o sea 0.025 mg/L. Convirtiéndose en el protocolo 10.

6.3. ENSAYO 3

Se realiza con los protocolos denominados P3, P6, P7, P8, P9, y P10, en estos se siembran las 3 variedades de papa Parda, Colorada y Y. Huevo, con 55, 60, y 57 explantes respectivamente, para un total de 172 explantes, los resultados obtenidos en este ensayo se relacionan en el cuadro N° 6 y en las figuras N° 12, 13, 14 y 15 donde se promedian para cada variedad los datos de longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de entrenudos y número de hojas.

Cuadro N° 6. Longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de los entre nudos y número de hojas de las plántulas de 3 variedades papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas in vitro, en un tiempo de 30 días. Ensayo 3

PROTOCOLO	VARIEDAD	LONGITUD*	GROSOR*	LONG. ENTRENUDOS*	N° DE HOJAS*
3	PARDA	6	0.32	0.5	10
6	PARDA	4	0.8	0.3	6
7	PARDA	1	1.2	0.2	6
8	PARDA	1.8	1.6	0.1	6
9	PARDA	4.2	0.4	0.5	8
10	PARDA	3.8	0.4	0.4	8
3	Y. HUEVO	7	0.3	0.3	12
6	Y. HUEVO	4.8	0.8	0.2	10
7	Y. HUEVO	1.5	1.7	0.2	10
8	Y. HUEVO	1.8	1.5	0.2	10
9	Y. HUEVO	6.4	0.5	0.45	14
10	Y. HUEVO	5.3	0.4	0.4	12
3	COLORADA	6.3	0.3	0.5	12
6	COLORADA	3.2	0.7	0.4	10
7	COLORADA	1.3	1.2	0.1	10
8	COLORADA	1.6	1.3	0.1	10
9	COLORADA	6.7	0.5	0.5	14
10	COLORADA	6.0	0.3	0.5	12

* promedio de : 55 datos Parda.
57 datos Y. Huevo.
60 datos Colorada.

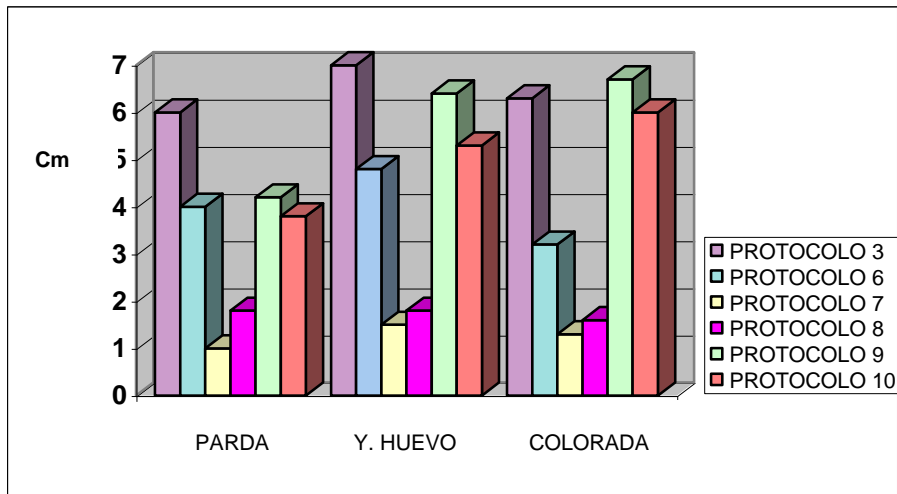


Figura # 12 : Longitud del tallo en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 3

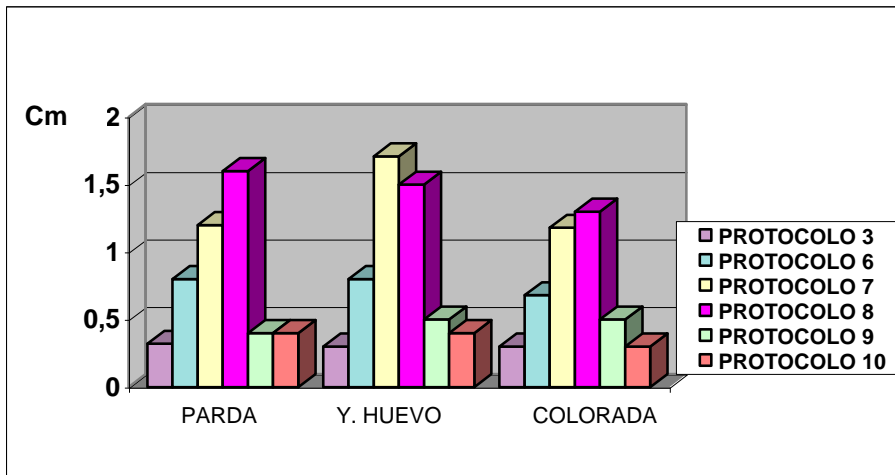


Figura # 13 : Grosor del tallo en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 3

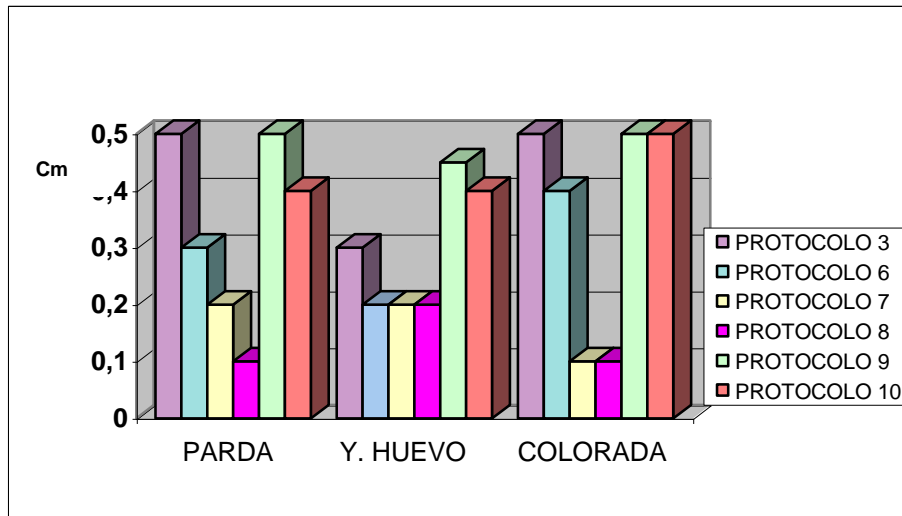


Figura # 14 : Longitud de entrenudos del tallo en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 3

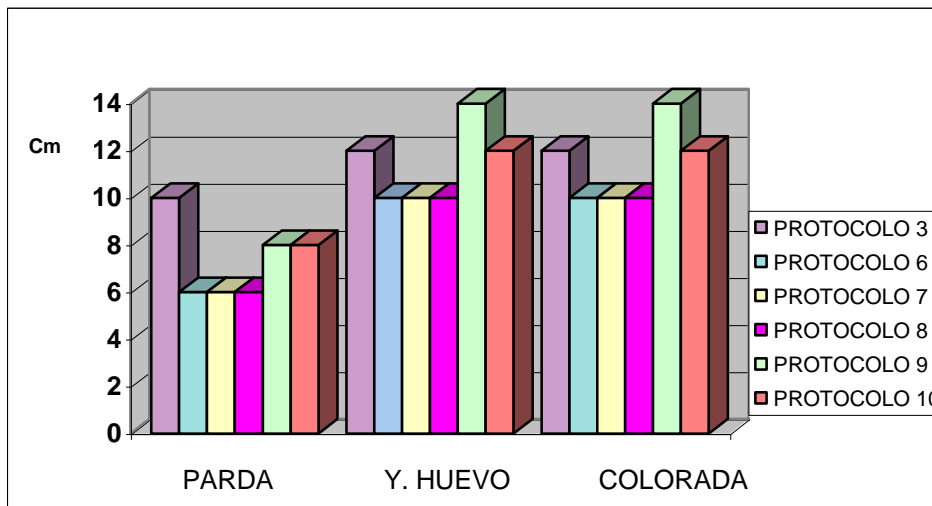


Figura # 15 : Número de hojas en las 3 variedades de papa cultivadas in vitro. Ensayo 3.

La mayor longitud en este ensayo se obtiene para las plántulas de las variedades Parda y Yema huevo, en el protocolo P3 y para Colorada en el protocolo P9 y la menor longitud se obtiene en los protocolos P7 y P8 para las tres variedades, se pudo observar que en estos protocolos primó la formación de pequeños esquejes adventicios (roseta) y se presenta una coloración muy pálida, por lo tanto este sería un factor para descartar estos protocolos.

La hormona giberelina que se usa principalmente para la elongación del tallo en el protocolo 10 se encuentra a una concentración de 0.75 ppm que es alta con relación a los otros protocolos excepto el P5, ésta concentración dio resultados favorables ya que se encontraron longitudes del tallo de 5 a 6 cm y de 8 entrenudos en promedio, indicando de ésta manera que esa concentración podría aceptarse como óptima para la micropropagación de papa; además no se encontraron diferencias significativas (anexo b) respecto a los demás protocolos.

El grosor de una plántula cultivada in vitro, debe llegar a ser igual al de la planta madre, debido a que las plántulas obtenidas son clones de la plántula inicial; en el caso de la variedad Parda y Colorada, el grosor del tallo de la plántula madre es de 0.7 – 0.8 cm aproximadamente, para la variedad Yema huevo 0.5-0.6 cm. De acuerdo con esto, para la variedad Parda en este ensayo se observa en la figura N° 13 que los protocolos P7, Y P8, las plántulas ya han superado este valor, en todas las variedades, en el protocolo P6 las plántulas están próximas a superarlo; por lo tanto no son adecuados. En cambio en los protocolos P3, P9 y P10 aún no han alcanzado ese valor, siendo los más óptimos los protocolos P9 y P10, porque el protocolo P3 tiene un grosor bajo.

Para la variedad Yema huevo el valor adecuado debería estar alrededor de 0.5 – 0.6 cm, en la figura N° 13 se puede apreciar que en los protocolos P7 y P8 se supera también en 60 días ese valor, mientras que en los protocolos P3, P9, y P10 aún no se ha alcanzado ese valor, siendo en el protocolo P3 el valor más bajo obtenido (0.3 cm); los más apropiados por tanto serán también los protocolos P9 y P10.

Para la variedad Colorada, el valor adecuado debería estar alrededor de 0.7 –0.8 cm, de acuerdo a la figura N° 13 se deduce que en los protocolos P7 y P8 ya se ha superado este valor en 60 días, por lo tanto no son apropiados, el protocolo P6 tiene ya 0.68 cm, que indica que tampoco sería apropiado; en los protocolos P3 y P10 el valor obtenido es bajo 0.3 cm con respecto al óptimo, por lo tanto se selecciona como apropiado el P9.

En las variedades Yema huevo y Colorada, en los protocolos P7 y P8 las plántulas presentan una coloración verde pálido y forma de roseta, es decir, plántulas con formación de esquejes adventicios, por lo tanto se descartan estos 2 protocolos Figura 16.

La menor longitud de los entrenudos de la plántula sería la recomendada para la micro propagación in vitro en la etapa de multiplicación ya que a menor longitud de los entrenudos, mayor número de nuevos explantes, debido a que en esta fase, las plantas colocadas en recipientes o tubos de ensayo, se subcultivan por medio de segmentos de nudos a una tasa de multiplicación muy alta, (Rocca, 1991)

En la figura N° 14 se observa que la menor longitud de entrenudos se obtuvo en el protocolo P6, P7 y P8 en las variedades Yema huevo y Colorada; presentan poco crecimiento, formación de esquejes adventicios, callo y una coloración verde pálido; en los protocolos P7 y P8, como se observa en la figura N° 16.

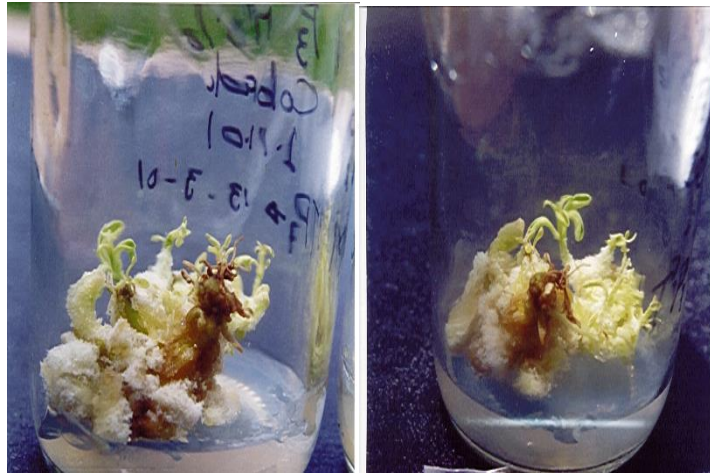


Figura N°16. plántulas de papa de variedad Colorada y Yema huevo en protocolo P7 y P8 del ensayo 3 (formación de callo); a los 60 días.

Después del análisis anterior se procede a descartar los protocolos P7 y P8.

Para la variable **número de hojas**, se selecciona como el mejor protocolo para una variedad, aquel con el cual se obtenga el mayor número de hojas, debido a que para el proceso de multiplicación in vitro por medio de nudos, se hace el corte de la plántula de manera que cada una posea una hoja y una yema axilar (Rocca, 1991). En la figura N° 20 se puede observar que el mayor número de hojas en las

variedades Yema huevo y Colorada se obtiene con el protocolo P9 y en la figura N° 21 se observa con el protocolo P3 para la variedad Parda .

6.4 ENSAYO 4

Descartados los protocolos P7 y P8, se procede por lo tanto a realizar el siguiente ensayo con los protocolos denominados P3, P6, P9 y P10, donde se sembraron las 3 variedades de papa, Parda, Colorada, y Yema huevo, con 38, 36, y 35 explantes respectivamente para un total de 109 explantes, evaluados en la etapa de multiplicación obteniéndose los resultados relacionados en el cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Ensayo 4. datos de Longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de entrenudos y número de hojas, de las plántulas de las tres variedades de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas in vitro, en un tiempo de 60 días.

PROTOCOLO	VARIEDAD	LONGITUD DEL TALLO*	GROSOR DEL TALLO*	LONGITUD DE ENTRE NUDOS*	NUMERO DE HOJAS*
3	PARDA	6,3	0,4	0,5	12
6	PARDA	4,8	0,8	0,3	7
9	PARDA	7	0,46	0,5	8
10	PARDA	5,8	0,41	0,4	9
3	Y. HUEVO	6,2	0,3	0,5	12
6	Y. HUEVO	5	2,1	0,3	6
9	Y. HUEVO	8	0,4	0,5	14
10	Y. HUEVO	6,7	0,37	0,55	10

3	COLORADA	6	0,3	0,54	10
6	COLORADA	4,7	0,7	0,4	9
9	COLORADA	7,8	0,4	0,46	14
10	COLORADA	5,8	0,3	0,48	10

* promedio de : 38 datos Parda.
36 datos Y. Huevo.
35 datos Colorada.

En este ensayo se evalúa longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de los entrenudos y número de hojas, y se aplica un tratamiento estadístico que relacionará protocolo y variedad, el tratamiento consiste en una prueba de normalidad, y homogeneidad de varianzas, para aplicar un ANOVA, un test de Duncan y un test de Kruskal – wallis según el caso, los cuales arrojaron los siguientes resultados.

Para la **longitud** los datos se clasifican como datos paramétricos anexos B y C por eso se les aplicó un ANOVA y un test de Duncan (anexo D y E.)

Los datos de las variables **grosor del tallo, longitud de entrenudos, y número de hojas**, se clasificaron como datos no paramétricos anexos B y C, por tal causa se aplicó el test de Kruskal – Wallis (anexo F).

Los datos se representan estadísticamente en las figuras N° 23 a 30 mediante diagramas de barras con letras en su interior, en donde; si hay al menos una letra en común indica que no se encuentra diferencia significativa entre los tratamientos.

LONGITUD

Los datos se relacionan en la cuadro N° 7 y en las figuras 23 y 24. La longitud del tallo es una de las variables utilizadas para la evaluación del medio de cultivo, y está relacionada estrechamente con el número de entrenudos, y la distancia entre

ellos de tal manera que a mayor longitud se obtenga, mayor podrá ser la cantidad de entrenudos.

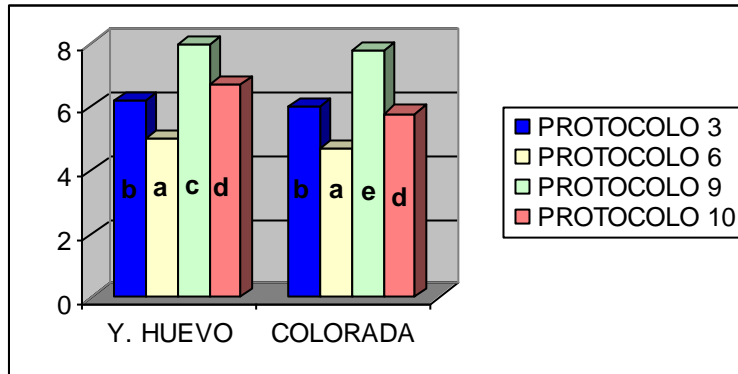


Figura N° 23. Longitud del tallo de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorada, cultivadas in vitro.

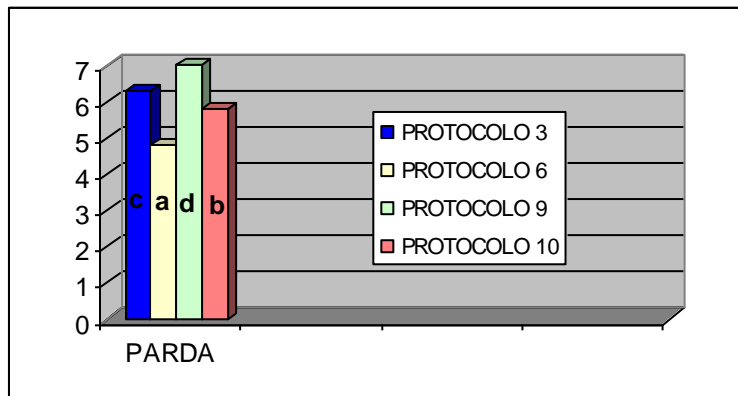


Figura N° 24. Longitud del tallo de las plántulas de papa de la variedad Parada Pastusa, cultivada in vitro.

La longitud para todos los tratamientos presenta diferencias significativas de acuerdo al anexo E, de los datos obtenidos estadísticamente para longitud se puede analizar lo siguiente:

La variedad **Parda** en todos los protocolos presenta diferencias estadísticas significativas, en el protocolo P9 presenta la mayor longitud, seguido del protocolo P3, y la menor longitud para esta variedad se obtuvo con el protocolo P6.

Para la variedad **Yema huevo** existen diferencias estadísticamente significativas, en todos los protocolos para la variable longitud, siendo el protocolo P9 con el que se obtuvo una mayor longitud, seguido del protocolo P10.

Para la variedad **Colorada** el protocolo P9 presenta la mayor longitud siendo estadísticamente superior a los otros protocolos, se puede observar que los protocolos con los cuales se obtuvo las mayores longitudes de tallo para las variedades Yema huevo y Colorada, en un periodo de 60 días fue el protocolo P9, en este protocolo el medio que se utiliza es líquido, que favorece la absorción rápida de los nutrientes seguido del protocolo P3 para Parda y Colorada.

Se puede observar que la variedad Colorada en los protocolos P3 y P10 no presentan diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico.

La longitud del tallo se ve afectada por el periodo vegetativo de cada variedad y como se observa, la variedad parda es la que menor longitud del tallo presenta, respecto a las variedades Yema huevo y colorada, ya que su periodo vegetativo es más largo (Herrera, 2000).

De acuerdo a lo anterior, el mejor protocolo para este parámetro es el P9.

GROSOR

Los datos se relacionan en el cuadro N° 7 y en las figuras N° 25 y 26, este es otro parámetro utilizado para evaluar la eficiencia del medio.

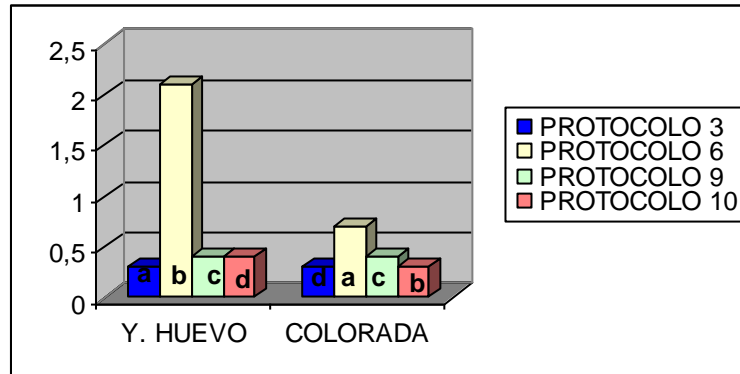


Figura N° 25. Grosor del tallo de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorado cultivadas in vitro.

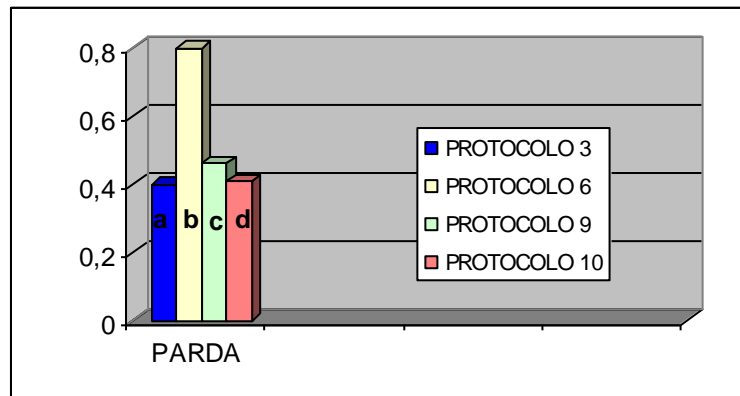


Figura N° 26. Grosor del tallo de las plántulas de papa de variedad Parada Pastusa. cultivada in vitro.

La estadística indica que hay diferencias significativas entre tratamientos, (anexo F) en las 3 variedades en general, para la variedad parda, el mayor grosor se obtuvo con el protocolo P6, valor que es superior con respecto al óptimo, 0.7 cm,

la plántula formó callo o tejido no diferenciado, lo que no es conveniente para el desarrollo de esta.

En la variedad Yema huevo se obtuvo mayor grosor con el protocolo 6, siendo superior al de las otras variables en este mismo protocolo, con un promedio de 2.07 cm, seguido del protocolo P9, como se dijo anteriormente el grosor de una plántula de papa debe llegar al grosor de la plántula madre.

De acuerdo a los resultados anteriores, el mejor protocolo con respecto a este parámetro son los protocolos P3, P9 y P10.

Para la variedad Colorada con el protocolo 6 se obtuvo el mayor grosor 0.7 cm, seguido del protocolo P9 con un promedio de 0.4cm resultando éste como el más óptimo.

LONGITUD DE ENTRENUDOS

Los datos se representan en la cuadro N° 7 y en las figuras N° 27 y 28. La menor longitud entre los nudos de la plántula sería la recomendada para la micro propagación in vitro, en la etapa de multiplicación, como se dijo anteriormente.

(Rocca, 1991).

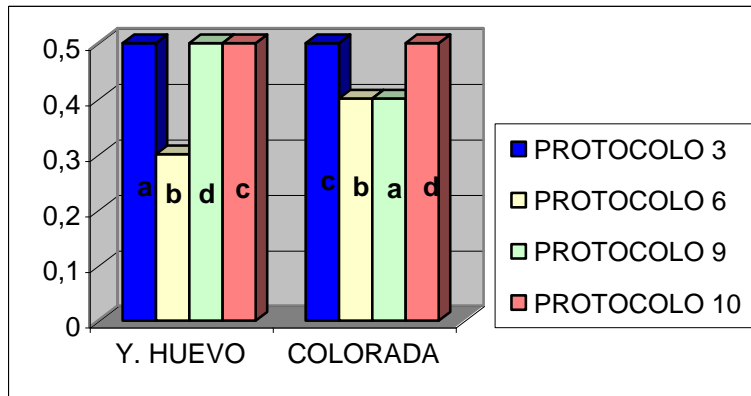


Figura N° 27. Longitud de los entre nudos de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorada cultivadas in vitro.

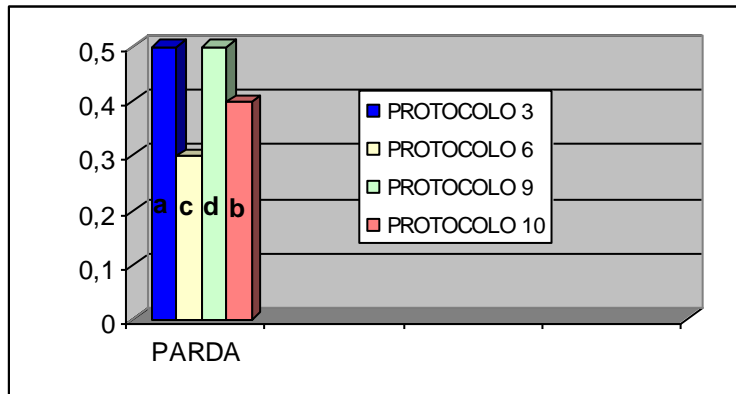


Figura N° 28. Longitud de los entre nudos de las plántulas de papa de variedad Parda pastusa, cultivadas in vitro.

Estadísticamente se presenta diferencias significativas, (anexo F) entre los todos los protocolos y en todas las variedades, en la figura N° 28 se observa que para la variedad Parda en el protocolo P6 obtuvo un promedio de longitud de entrenudos de 0.3cm el valor mas bajo, que sería el ideal, siguiéndole el protocolo P3 con un valor de 0.5cm. Para la variedad Yema huevo también con

el protocolo P6 se obtuvo una longitud de entrenudos pequeña 0.3cm siguiéndole el protocolo P3 y P9 con un valor de 0.5cm y el protocolo P10 con 0.55 cm. Y con la variedad Colorada se obtuvo una longitud de 0.4 cm para el protocolo 6, seguido del protocolo P9 con un valor de 0.46cm. Figura N° 27

Como se dijo anteriormente la menor longitud de entrenudos sería la mejor. Con esta variable el mejor protocolo sería el P6 para todas variedades, sin embargo los protocolos 3 y 9 también son adecuados.

NÚMERO DE HOJAS

Los datos se representan en la cuadro N° 7 y en las figuras N° 29 y 30. La estadística (anexo F) indica que hay diferencia significativa para la variable número de hojas en todas las variedades y en todos los protocolos.

Para la variable número de hojas, se selecciona como el mejor protocolo para una variedad, aquel con el cual se obtenga el mayor número de hojas. Debido a que para el proceso de “multiplicación in vitro por medio de nudos, se hace el corte de la planta obtenida in vitro, de manera que cada una posea una hoja y una yema axiliar” (Rocca, 1991).

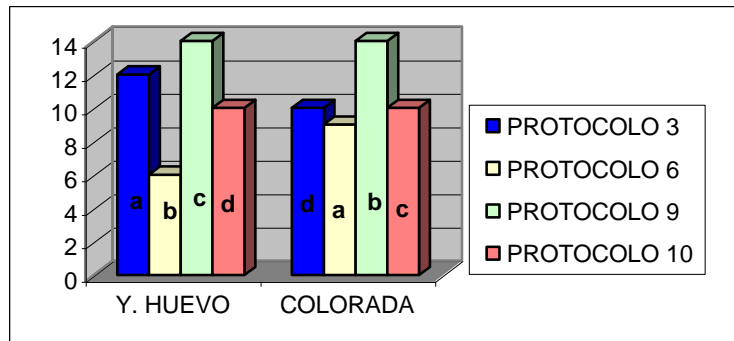


Figura N° 29. Número de hojas de las plántulas de las variedades de papa Yema huevo y Colorada, cultivadas in vitro.

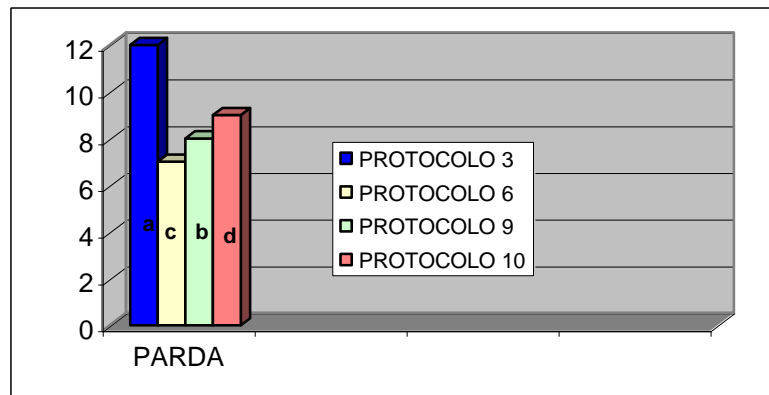


Figura N° 30. Número de hojas de las plántulas de papa de variedad Parda pastusa, cultivadas in vitro.

La mayor longitud en este ensayo se obtiene para las plántulas de las variedades Parda y Yema huevo, en el protocolo P3 y para Colorada en el protocolo P9 y la menor longitud se obtiene en los protocolos P7 y P8 para las tres variedades, se pudo observar que en estos protocolos primó la formación de pequeños esquejes adventicios (roseta) y se presenta una coloración muy pálida, por lo tanto este sería un factor para descartar estos protocolos.

La hormona giberelina que se usa principalmente para la elongación del tallo en el protocolo 10 se encuentra a una concentración de 0.75 ppm que es alta con relación a los otros protocolos excepto el P5, ésta concentración dio resultados favorables ya que se encontraron longitudes del tallo de 5 a 6 cm y de 8 entrenudos en promedio, indicando de ésta manera que esa concentración podría aceptarse como óptima para la micropropagación de papa; además no se encontraron diferencias significativas (anexo b) respecto a los demás protocolos.

El grosor de una plántula cultivada in vitro, debe llegar a ser igual al de la planta madre, debido a que las plántulas obtenidas son clones de la plántula inicial; en el caso de la variedad Parda y Colorada, el grosor del tallo de la plántula madre es de 0.7 – 0.8 cm aproximadamente, para la variedad Yema huevo 0.5-0.6 cm. De acuerdo con esto, para la variedad Parda en este ensayo se observa en la figura N° 13 que los protocolos P7, Y P8, las plántulas ya han superado este valor, en todas las variedades, en el protocolo P6 las plántulas están próximas a superarlo; por lo tanto no son adecuados. En cambio en los protocolos P3, P9 y P10 aún no han alcanzado ese valor, siendo los más óptimos los protocolos P9 y P10, porque el protocolo P3 tiene un grosor bajo.

Para la variedad Yema huevo el valor adecuado debería estar alrededor de 0.5 – 0.6 cm, en la figura N° 13 se puede apreciar que en los protocolos P7 y P8 se supera también en 60 días ese valor, mientras que en los protocolos P3, P9, y P10 aún no se ha alcanzado ese valor, siendo en el protocolo P3 el valor más bajo obtenido (0.3 cm); los más apropiados por tanto serán también los protocolos P9 y P10.

Para la variedad Colorada, el valor adecuado debería estar alrededor de 0.7 –0.8 cm, de acuerdo a la figura N° 13 se deduce que en los protocolos P7 y P8 ya se ha superado este valor en 60 días, por lo tanto no son apropiados, el protocolo P6 tiene ya 0.68 cm, que indica que tampoco sería apropiado; en los protocolos P3 y P10 el valor obtenido es bajo 0.3 cm con respecto al óptimo, por lo tanto se selecciona como apropiado el P9.

En las variedades Yema huevo y Colorada, en los protocolos P7 y P8 las plántulas presentan una coloración verde pálido y forma de roseta, es decir, plántulas con formación de esquejes adventicios, por lo tanto se descartan estos 2 protocolos Figura 16.

La menor longitud de los entrenudos de la plántula sería la recomendada para la micro propagación in vitro en la etapa de multiplicación ya que a menor longitud de los entrenudos, mayor número de nuevos explantes, debido a que en esta fase, las plantas colocadas en recipientes o tubos de ensayo, se subcultivan por medio de segmentos de nudos a una tasa de multiplicación muy alta, (Rocca, 1991)

En la figura N° 14 se observa que la menor longitud de entrenudos se obtuvo en el protocolo P6, P7 y P8 en las variedades Yema huevo y Colorada; presentan poco crecimiento, formación de esquejes adventicios, callo y una coloración verde pálido; en los protocolos P7 y P8, como se observa en la figura N° 16.

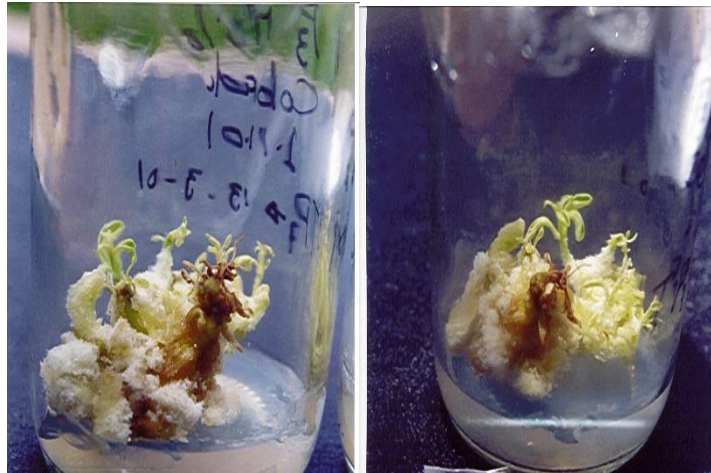


Figura N° 16. plántulas de papa de variedad Colorada y Yema huevo en protocolo P7 y P8 del ensayo 3 (formación de callo); a los 60 días.

Después del análisis anterior se procede a descartar los protocolos P7 y P8.

Para la variable **número de hojas**, se selecciona como el mejor protocolo para una variedad, aquel con el cual se obtenga el mayor número de hojas, debido a que para el proceso de multiplicación in vitro por medio de nudos, se hace el corte de la plántula de manera que cada una posea una hoja y una yema axilar (Rocca, 1991). En la figura N° 15 se puede observar que el mayor número de hojas en las

variedades Yema huevo y Colorada se obtiene con el protocolo P9 y P3 para la variedad Parda .

6.4 ENSAYO 4

Descartados los protocolos P7 y P8, se procede por lo tanto a realizar el siguiente ensayo con los protocolos denominados P3, P6, P9 y P10, donde se sembraron las 3 variedades de papa, Parda, Colorada, y Yema huevo, con 38, 36, y 35 explantes respectivamente para un total de 109 explantes, evaluados en la etapa de multiplicación obteniéndose los resultados relacionados en el cuadro N° 7.

Cuadro N° 7. Ensayo 4. datos de Longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de entrenudos y número de hojas, de las plántulas de las tres variedades de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas in vitro, en un tiempo de 60 días.

PROTOCOLO	VARIEDAD	LONGITUD DEL TALLO*	GROSOR DEL TALLO *	LONGITUD DE ENTRE NUDOS*	NUMERO DE HOJAS*
3	PARDA	6,3	0,4	0,5	12
6	PARDA	4,8	0,8	0,3	7
9	PARDA	7	0,46	0,5	8
10	PARDA	5,8	0,41	0,4	9
3	Y. HUEVO	6,2	0,3	0,5	12
6	Y. HUEVO	5	2,1	0,3	6
9	Y. HUEVO	8	0,4	0,5	14
10	Y. HUEVO	6,7	0,37	0,55	10
3	COLORADA	6	0,3	0,54	10
6	COLORADA	4,7	0,7	0,4	9
9	COLORADA	7,8	0,4	0,46	14
10	COLORADA	5,8	0,3	0,48	10

* promedio de : 38 datos Parda.
36 datos Y. Huevo.
35 datos Colorada.

En este ensayo se evalúa longitud del tallo, grosor del tallo, longitud de los entrenudos y número de hojas, y se aplica un tratamiento estadístico que relacionará protocolo y variedad, el tratamiento consiste en una prueba de normalidad, y homogeneidad de varianzas, para aplicar un ANOVA, un test de Duncan y un test de Kruskal – wallis según el caso, los cuales arrojaron los siguientes resultados.

Para la **longitud** los datos se clasifican como datos paramétricos anexos B y C por eso se les aplicó un ANOVA y un test de Duncan (anexo D y E.)

Los datos de las variables **grosor del tallo, longitud de entrenudos, y número de hojas**, se clasificaron como datos no paramétricos anexos B y C, por tal causa se aplicó el test de Kruskal – Wallis (anexo F).

Los datos se representan estadísticamente en las figuras N° 17 a 24 mediante diagramas de barras con letras en su interior, en donde; si hay al menos una letra en común indica que no se encuentra diferencia significativa entre los tratamientos.

LONGITUD

Los datos se relacionan en la cuadro N° 7 y en las figuras 17 y 18. La longitud del tallo es una de las variables utilizadas para la evaluación del medio de cultivo, y está relacionada estrechamente con el número de entrenudos, y la distancia entre ellos de tal manera que a mayor longitud se obtenga, mayor podrá ser la cantidad de entrenudos.

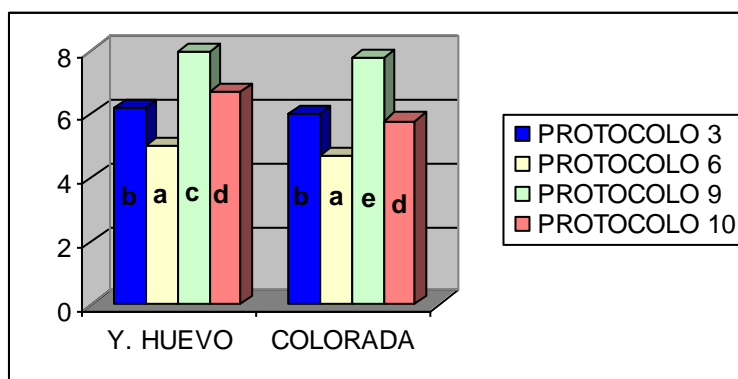


Figura N° 17. Longitud del tallo de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorada, cultivadas in vitro.

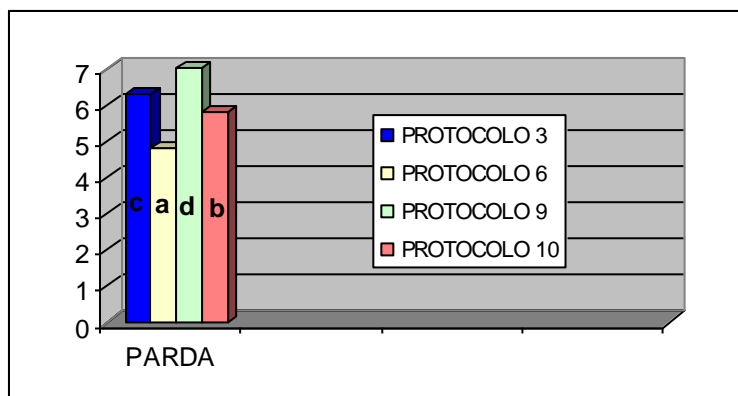


Figura N° 18. Longitud del tallo de las plántulas de papa de la variedad Parda Pastusa, cultivada in vitro.

La longitud para todos los tratamientos presenta diferencias significativas de acuerdo al anexo E, de los datos obtenidos estadísticamente para longitud se puede analizar lo siguiente:

La variedad **Parda** en todos los protocolos presenta diferencias estadísticas significativas, en el protocolo P9 presenta la mayor longitud, seguido del protocolo P3, y la menor longitud para esta variedad se obtuvo con el protocolo P6.

Para la variedad **Yema huevo** existen diferencias estadísticamente significativas, en todos los protocolos para la variable longitud, siendo el protocolo P₉ con el que se obtuvo una mayor longitud, seguido del protocolo P₁₀.

Para la variedad **Colorada** el protocolo P₉ presenta la mayor longitud siendo estadísticamente superior a los otros protocolos, se puede observar que los protocolos con los cuales se obtuvo las mayores longitudes de tallo para las variedades Yema huevo y Colorada, en un periodo de 60 días fue el protocolo P₉, en este protocolo el medio que se utiliza es líquido, que favorece la absorción rápida de los nutrientes seguido del protocolo P₃ para Parda y Colorada.

Se puede observar que la variedad Colorada en los protocolos P₃ y P₁₀ no presentan diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico.

La longitud del tallo se ve afectada por el periodo vegetativo de cada variedad y como se observa, la variedad parda es la que menor longitud del tallo presenta, respecto a las variedades Yema huevo y colorada, ya que su periodo vegetativo es mas largo (Herrera, 2000).

De acuerdo a lo anterior, el mejor protocolo para este parámetro es el P₉.

GROSOR

Los datos se relacionan en la cuadro N° 7 y en las figuras N° 19 y 20, este es otro parámetro utilizado para evaluar la eficiencia del medio.

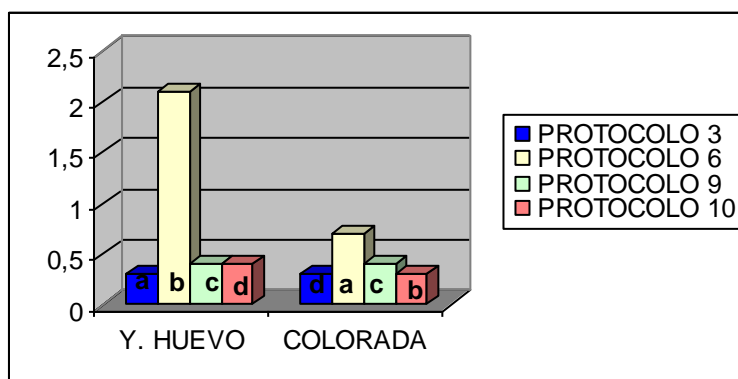


Figura N° 19. Grosor del tallo de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorado cultivadas in vitro.

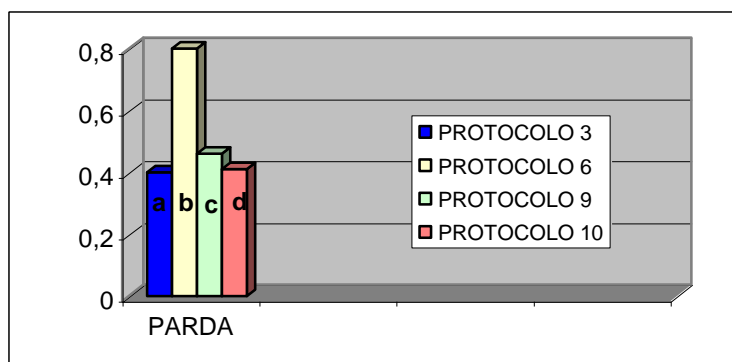


Figura N° 20. Grosor del tallo de las plántulas de papa de variedad Parada Pastusa. cultivada in vitro.

La estadística indica que hay diferencias significativas entre tratamientos, (anexo F) en las 3 variedades en general, para la variedad parda, el mayor grosor se obtuvo con el protocolo P6, valor que es superior con respecto al óptimo, 0.7 cm, la plántula formó callo o tejido no diferenciado, lo que no es conveniente para el desarrollo de esta.

En la variedad Yema huevo se obtuvo mayor grosor con el protocolo 6, siendo superior al de las otras variables en este mismo protocolo, con un promedio de

2.07 cm, seguido del protocolo P9, como se dijo anteriormente el grosor de una plántula de papa debe llegar al grosor de la plántula madre.

De acuerdo a los resultados anteriores, el mejor protocolo con respecto a este parámetro son los protocolos P3, P9 y P10.

Para la variedad Colorada con el protocolo 6 se obtuvo el mayor grosor 0.7 cm, seguido del protocolo P9 con un promedio de 0.4cm resultando éste como el más óptimo.

LONGITUD DE ENTRENUDOS

Los datos se representan en la cuadro N° 7 y en las figuras N° 21 y 22. La menor longitud entre los nudos de la plántula sería la recomendada para la micro propagación in vitro, en la etapa de multiplicación, como se dijo anteriormente. (Rocca, 1991).

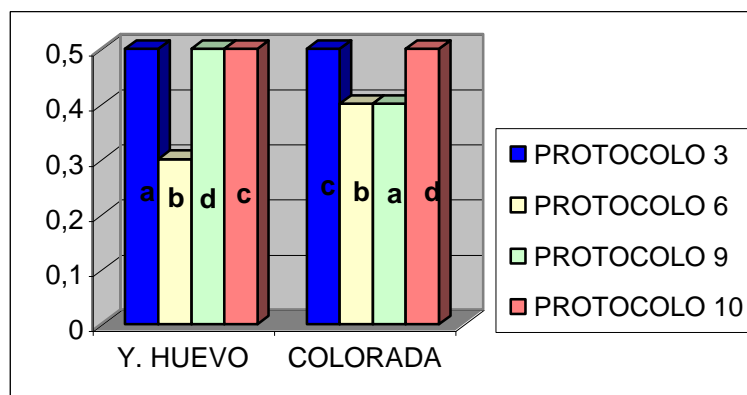


Figura N° 21. Longitud de los entrenudos de las plántulas de papa de las variedades Yema huevo y Colorada cultivadas in vitro.

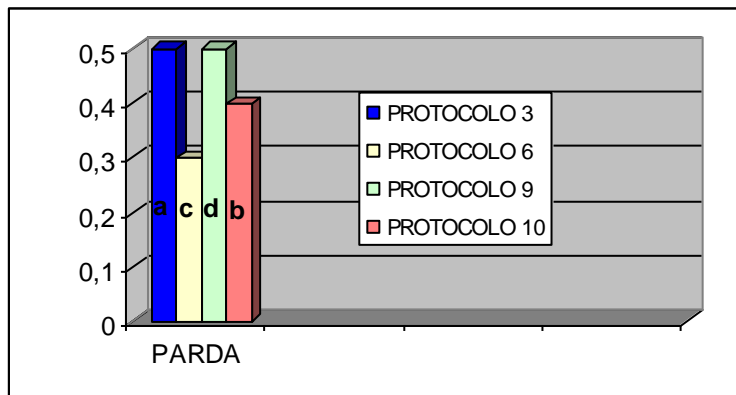


Figura N° 22. Longitud de los entrenudos de las plántulas de papa de variedad Parda pastusa, cultivadas in vitro.

Estadísticamente se presenta diferencias significativas, (anexo F) entre los todos los protocolos y en todas las variedades, en la figura N° 28 se observa que para la variedad Parda en el protocolo P6 obtuvo un promedio de longitud de entrenudos de 0.3cm el valor mas bajo, que sería el ideal, siguiéndole el protocolo P3 con un valor de 0.5cm. Para la variedad Yema huevo también con el protocolo P6 se obtuvo una longitud de entrenudos pequeña 0.3cm siguiéndole el protocolo P3 y P9 con un valor de 0.5cm y el protocolo P10 con 0.55 cm. Y con la variedad Colorada se obtuvo una longitud de 0.4 cm para el protocolo 6, seguido del protocolo P9 con un valor de 0.46cm.

Como se dijo anteriormente la menor longitud de entrenudos sería la mejor. Con esta variable el mejor protocolo sería el P6 para todas variedades, sin embargo los protocolos 3 y 9 también son adecuados.

NÚMERO DE HOJAS

Los datos se representan en la cuadro N° 7 y en las figuras N° 23 y 24. La estadística (anexo F) indica que hay diferencia significativa para la variable número de hojas en todas las variedades y en todos los protocolos.

Para la variable número de hojas, se selecciona como el mejor protocolo para una variedad, aquel con el cual se obtenga el mayor número de hojas. Debido a que para el proceso de “multiplicación in vitro por medio de nudos, se hace el corte de la planta obtenida in vitro, de manera que cada una posea una hoja y una yema axiliar” (Rocca, 1991).

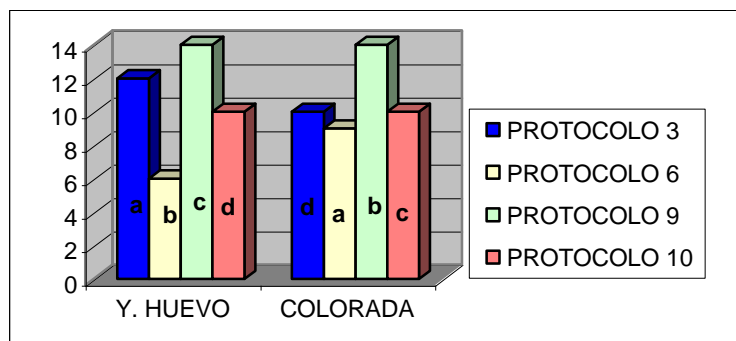


Figura N° 23. Número de hojas de las plántulas de las variedades de papa Yema huevo y Colorada, cultivadas in vitro.

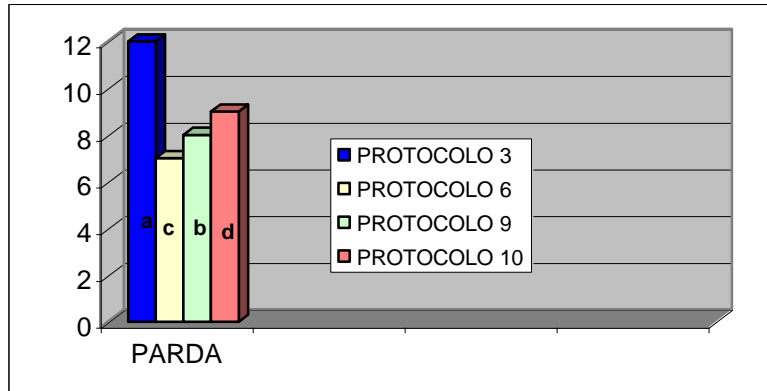


Figura N° 24. Número de hojas de las plántulas de papa de variedad Parda pastusa, cultivadas in vitro.

De la figura N° 24 se observa que para la variedad **Parda** el mayor número de hojas en promedio, se obtiene con el protocolo P3 con 12 hojas seguido del protocolo P10 con 9 hojas.

Para la variedad **yema de huevo** y **colorada** el mayor número de hojas se obtuvo con el protocolo P9 con 14 hojas en promedio Figura 23.

Después del análisis anterior se puede observar que para todas las variedades el protocolo 6 presenta menor longitud del tallo, mayor grosor del tallo y menor número de hojas, hay aumento del crecimiento de tejido no diferenciado implicando menor longitud, todos estos factores negativos, inducen a descartar este protocolo.

El protocolo P10 presenta buenas características físicas, dando resultados aceptables, pero presenta una coloración verde claro en los tejidos de las variedades Parda, Yema de huevo y Colorada, como se observa en la figura N° 19; que puede ser debido a la falta de Fósforo en forma de fosfato di-ácido de potasio (KH_2PO_4) que es una forma asimilable; el fósforo tiene gran importancia en la función metabólica y además hace parte del proceso de fijación simbiótica del nitrógeno e interviene en los procesos en los que éste se encuentra envuelto. Con la omisión de KH_2PO_4 disminuye también el aporte de potasio K, elemento que la papa requiere en altas cantidades ya que éste elemento mantiene la turgencia de las plantas que es esencial para el correcto funcionamiento de los procesos fotosintéticos y metabólicos.



Figura N° 25. Características físicas de plántulas de papa Colorada, Y. Huevo y Parda (de izquierda a derecha) en etapa de multiplicación; protocolo P10

Factor que induce a descartar este protocolo, quedando así los protocolos P3 y P9 como los más opcionados. Para la variedad Parda Pastusa el P3 y para las variedades Yema de huevo y Colorada el P9.

El protocolo P9 contiene quinetina como regulador de crecimiento, ésta esta implicada en la división celular, en la modificación de la dominancia apical, también se adiciona para la inducción de yemas adventicias en callos y órganos; se usa también para la proliferación de tallos axilares, esta tendencia se puede observar en las figuras N° 26 y 27 en donde las plantas se desarrollan en medio líquido P9 para las variedades Yema de Huevo y Colorada.

El protocolo 9 es un medio de cultivo líquido como se puede observar en el cuadro N° 2 la ausencia de agar en la etapa de multiplicación, por se un medio líquido facilita la absorción de nutrientes por la planta; este tipo de medio es mejor para las partes superiores de las plántulas(Dodds, 1989), los cortes nodales se siembran con 3 o 4 nudos y se inoculan en medios líquidos darán entre 60-70 nudos en apenas 2-3 semanas de cultivo.

Se pudo observar que cuando se sembraron segmentos nodales superiores directamente en el medio líquido, la variedad Colorada ya que fue la que presentaba una mejor robustez; se adicionó menor cantidad de medio y se obtuvieron plántulas de la variedad Colorada con una coloración verde aceptable en un tiempo de 60 días, con varios esquejes adventicios con buenos segmentos nodales útiles para la multiplicación.

También se observó que en la multiplicación “in vitro” cuando se realizaban los cortes de los microesquejes con uno o dos nudos para ser transferidos a un nuevo medio se observó que los microesquejes de la parte superior y media eran los más débiles (especialmente los de la variedad Yema de Huevo) y que al transferirlos a un medio líquido en la etapa de transferencia no prosperaban al quedar sumergidos en el medio afectando de ésta manera la respiración aerobia, por esta razón hubo necesidad de realizar una pequeña etapa de transición transfiriendo los segmentos de nudos a medios semisólidos con 3.0 g/l de agar. Los microesquejes inferiores no tuvieron inconveniente, favoreciéndose la formación de brotes axilares y de esta manera aumentando la tasa de multiplicación; los resultados obtenidos dieron similar respuesta a un estudio sobre la micropropagación de papa afectado por las características de los microesquejes, donde la mejor tasa de multiplicación se obtuvo en microesquejes inferiores o basales y mucho mejor si éstos se multiplicaban con el brote de una hoja (Gerso, et al, 1999).

De acuerdo a (Butenko, 1968) la concentración de sacarosa recomendada para la micropropagación de papa esta entre el 2-5% y (Vinterhalter et al., 1997) recomienda usar altas concentraciones de sacarosa. En otros ensayos reportados por (Salaus, 1995) se encontró que un 3% de sacarosa fue el óptimo para obtener plantas robustas, tallo de diámetro mas o menos el doble al testigo y amplia lámina foliar, concentraciones menores no dieron buenos resultados, el crecimiento longitudinal fue inversamente proporcional a las cantidades de sacarosa y la pigmentación fue mayor a niveles altos de sacarosa. Con base a lo

anterior en los ensayos realizados para la multiplicación de papa se utilizó cantidades entre el 1- 1.5 % de sacarosa en la etapa de siembra y el 3% para la etapa de multiplicación y transferencia, dando resultados favorables para los protocolo 3 y 9.

Las altas variaciones que se producen en este ensayo, se presentan en las investigaciones de este tipo, ya que por ser materiales biológicos, son normalmente de tamaño pequeño; por consiguiente, son muy sensibles a los pequeños cambios en los niveles externos, como las condiciones físicas de los experimentos, en los cuartos de crecimiento, se supone que estos cuartos están dotados de condiciones controladas, no obstante están expuestos a condiciones locales y a gradientes de baja intensidad que pueden afectar la uniformidad con que cada factor ambiental llega a cada uno de los materiales ensayados.

Como por ejemplo a veces es difícil garantizar plenamente que las fuentes de luz están colocadas de tal forma que la intensidad y la calidad de luz son las mismas para todo el experimento; con frecuencia se detectan gradientes de iluminación, que produce cambios en el humedad por la transpiración de los cultivos. Rocca (Roca, 1991).

6.5. ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SELECCIONADOS COMO ÓPTIMOS.

Los análisis químicos del medio de cultivo se realizaron en el medio en el cual las plántulas se encuentran en la etapa de transferencia, antes y después de transferir los explantes a un nuevo medio, debido a que en esta etapa, las plántulas toman la mayor cantidad de nutrientes. Los datos se relacionan en el cuadro N° 8

Cuadro N° 8 Nutrientes Absorbidos por las plántulas de papa cultivadas “in vitro”

PROTOCOLO	VARIEDAD		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	B	SO4
3	PARDA	%	78	59	72	36	48	10	10	9.0	11	11	24
9	Y. HUEVO	%	48	51	68	38	30	13	22	7.0	3.5	37.5	21
9	COLORADA	%	61	71	57	41	31	18	10	7.0	7	37.5	34

PARDA PASTUSA

La variedad parda pastusa tubo un mejor desarrollo en el medio sólido P3, que en el líquido, ya que en este no prosperó normalmente indicando que la plántula de papa necesita de un soporte para sostenerse.

La variedad Parda pastusa absorbió en mayor cantidad N (78%), K (72%), P (59%), Mg (48), Ca (36%), SO₄ (24%), B (11%), Zn (11%), Fe (10%), Cu (10%), Mn (9 %).

La variedad Parda pastusa tomó un 78 % de **Nitrógeno**, éste representa un papel muy importante en la estructura de la molécula proteica. Es un elemento móvil, esencial porque actúa en los procesos de absorción iónica, síntesis, multiplicación y diferenciación celular.

Además, el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, pirimidinas que se encuentran en los ácidos nucleicos, RNA y DNA esenciales para la síntesis de proteínas. Porfirinas que se encuentran en compuestos importantes desde el punto de vista metabólico, como las clorofilas, esenciales para la fotosíntesis y la respiración.(Rojas, 1993).

El segundo elemento de mayor absorción en la plántula de papa Parda pastusa fue el **Potasio** Las plántulas lo absorbieron en un porcentaje 72%., Indicando que esta cantidad es la óptima ya que se observa un estado óptimo en el desarrollo de la plántula en esta etapa. Es un elemento que tiene una función específica en

la economía del agua en la planta, ya que intervienen en el ajuste de la apertura de las estomas y al activar su cierre, limita la transpiración, mantiene la turgencia de las plantas que es esencial para el correcto funcionamiento de los procesos fotosintéticos y metabólicos, generando en la planta resistencia a la sequía (COMPLEMAN, 1985).

El hecho de que tome alta cantidad de potasio se podría atribuir a que como hay suficiente cantidad de agua en el medio, las plantas necesitan ajustar la apertura de los estomas para limitar su transpiración.

Este elemento es esencial como activador de las enzimas que intervienen en la síntesis de ciertas uniones pectídicas (Rojas 1993).

El K es asimilado en grandes cantidades por la planta de papa, y su carencia durante el periodo de crecimiento acorta el periodo vegetativo en detrimento del rendimiento. Unas cuantas semanas después de la emergencia, la papa asimila ávidamente al K hasta cuando llega al estado máximo del follaje, por esta razón, en este período relativamente corto debe haber una buena disponibilidad de K (Herrera, 2000).

Fósforo, La plántula tomó un 59 %. El P que es también un elemento móvil dentro de la planta, tiene una importante función metabólica, es componente de cada uno de los ácidos nucleicos y fosfolípidos en las células de las plantas. El P forma los fosfatos de hexosa y triosa, los A. Nucleicos, coenzimas y transportadores de energía, se puede decir que la célula depende de P (Devlin, 1981).

Parece estar absorbido en las mitocondrias formando parte de enzimas activas en la fosforilación oxidativa y tal vez en la síntesis proteica.

En los tejidos meristemáticos de las regiones de la planta, sede de un activo crecimiento, se encuentran fuertes concentraciones de P, que intervienen allí en la síntesis de nucleoproteinas (Rojas , 1993).

Magnesio Es el cuarto elemento de mayor absorción por la parda pastusa, un 48%, este elemento es el único constituyente mineral de la molécula de clorofila, por tanto, es indispensable para la fotosíntesis (COMPLEMAN, 1985) y para el metabolismo glucidico.

En general, el ATP interviene también en estas reacciones; el Mg actúa también como activador para los enzimas que intervienen en la síntesis de los ácidos nucleicos DNA y RNA.

De acuerdo a la observación física, el óptimo desarrollo de la plántula indica una adecuada absorción de Mg.

Calcio La plántula tomó un 36 % este elemento es necesario para la formación de la lámina media de las células debido a su importante papel en la síntesis del pectato de calcio. Regula la asimilación del Potasio, Magnesio y Boro, neutraliza la acidez del suelo y de la planta.

Los síntomas de deficiencia de Ca son fáciles de observar, las regiones meristemáticas y apicales del tallo, hojas y raíces resultan fácilmente afectadas y

pueden acabar muriendo por lo cual cesa el crecimiento de estos órganos, lo que no se observó aunque la plántula lo haya tomado en poca cantidad.

Azufre Este elemento se absorbió un 24%, El azufre hace parte de la estructura proteica, pues es constituyente de los aminoácidos, cistina, cisteína , metionina y coenzima A.

Este también establece puentes en la molécula proteica y ayudan a los enlaces peptídicos y los puentes de H a estabilizar la estructura de la proteína. (Rojas, 1993).

Los enlaces –S-S- se asocian con la estructura del protoplasma y la cantidad de grupos sulfhidrilo (-SH), en las plantas se relaciona en algunos casos con la resistencia al frío (Tisdale, 1995), es importante que la plántula tome éste elemento debido a que esta variedad es de clima frío y se hace necesario para la adaptación ex vitro.

Boro La planta lo absorbió en 11 % su función principal dentro de la planta es la parte del metabolismo de los carbohidratos y facilita el movimiento de los azúcares formando un complejo permeable Boro-Azúcar o juntando las membranas, de tal manera que se hacen mas permeables a los azúcares. La función del Boro es esencial debido a que el medio de cultivo se le adiciona en esta etapa 30000 mg/L de sacarosa.

La velocidad de división de las células de las plantas es señal de la función del contenido de Boro. (COMPLEMAN,1985) Sin embargo, también se puede apreciar que no se debe agregar tanto Boro al medio.

Zinc Es un elemento que la plántula de papa Parda pastusa tomó un 11%, este micro elemento interviene en la biosíntesis de la auxina llamada ácido indolil-3-acético (IAA) SKOOG (1940) que es la auxina indispensable para el crecimiento, pues su deficiencia hace que se produzcan plántulas en forma de roseta.

Muchas enzimas dependen de la presencia del zinc, como la deshidrogenasa alcohólica y parece que desempeña un papel muy importante en la síntesis de las proteínas. (Rojas, 1993) No se observan deficiencias de zinc indicando un nivel suficiente de absorción.

Hierro La plántula tomó un 10 %, este elemento está asociado con la producción de clorofila, tiene funciones específicas en la activación de varios sistemas meristemáticos. Hidrogenasa-Fumárica, catalasa, oxidasa y citocromos. (COMPLEMAN,1985).

Este nivel de absorción sería suficiente de acuerdo al desarrollo fisiológico de la plántula en esta etapa, no se observan características físicas de deficiencia.

Cobre Es un micro elemento que la plántula absorbió el 10%, de este se necesita solamente, en trazas, es por completo esencial porque forma parte de

diversas enzimas, en especial la citocroma-oxidasa que permite la oxidación respiratoria final. (Devlin, 1981).

Juega también un papel importante en el control de la humedad de los tejidos de la planta y en el crecimiento del tallo y de las hojas.

Manganeso La plántula tomó un 9%, este elemento juega un papel muy similar al del Fe en el crecimiento de la planta y especialmente en la asimilación del fósforo, calcio y magnesio.

Participa en el transporte de electrones, en el sistema, en el mantenimiento de la estructura de la membrana del cloroplasto.

Un papel importante del Mn, según (GRAHAN, 1980) reporta que el Mn juega un papel obvio en la defensa del hospedero contra el ataque de patógenos.

Este elemento es esencial dentro del cultivo in vitro ya que la plántula en el medio es muy susceptible a patógenos y en sí el medio mismo.

Es un factor esencial en el metabolismo del nitrógeno, en ambos actúa como activador enzimático (COMPLEMAN, 1985).

Se cree también que el manganeso interviene en la destrucción u oxidación del ácido indolil-3-acético (IAA) que es la hormona del crecimiento, natural de las plantas. (Rojas, 1993).

En general se observa que la absorción de micronutrientes está alrededor de 9 - 11 %, indicando que las plántulas de la variedad Parda pastusa necesitan menor cantidad de micronutrientes en esta etapa.

En esta variedad se puede observar el verdor de la plántula en el medio sólido en la siguiente figura, indicando, que la cantidad de nutrientes absorbido fue óptima y que hubo un balance completo de nutrientes se puede observar la figura 28.



Figura # 28 plántula de papa de variedad Parda en medio sólido P3

YEMA DE HUEVO

Esta variedad presentó buenos resultados, en el protocolo P3 medio sólido y en el protocolo P9 medio líquido figuras 29 y 30 respectivamente. Sin embargo las plántulas tuvieron más progreso en el protocolo P9 líquido, por tal motivo se descartó el medio sólido, indicando que se puede obviar el agar y por lo tanto esto influye en la disminución en los costos de la micro propagación.



Figuras N °29 Plántulas de papa de variedad Yema huevo en medio P3 sólido con una mezcla hormonal de 1.0 mg/L GA3 y 0.1 mg / L de quinetina, etapa de multiplicación



Figura N° 30 Plántulas de papa de variedad Yema huevo en medio de cultivo P9 siembra sólido y transferencia líquido, a los 60 días, con una mezcla hormonal de 0.1 mg/ L de GA3 y 0.5 mg /L de quinetina.

De acuerdo a los resultados del cuadro N° 8 se puede deducir que en la variedad Yema huevo se observa el siguiente orden decreciente de absorción de nutrientes con el protocolo P9 líquido: K (68%), P (51%), N (48%), Ca (38%), B (37.5%), Mg (30%), Cu (22%), SO₄ (21%), Fe (13%), Mn (7%), Zn (3.5%).

Estos datos nos verifican y nos explican algunas observaciones sobre la variedad yema de huevo.

Se puede observar en el caso del N que presenta una baja absorción 48% y el Cu, 22% esto puede influir negativamente en la absorción del Nitrógeno (Garcés, 2000), debido a que existe un antagonismo en la absorción de estos 2 nutrientes y de esta manera se podría explicar la falta de verdor en estas plántulas obtenidas en este medio, que puede afectar en la síntesis de clorofila, por deficiencia de N, ya que tomó un 48% de la cantidad agregada, por lo tanto se podría sugerir una disminución en la cantidad de Cu suministrada al medio.

En cuanto al Mg se reporta un antagonismo entre la absorción del potasio y el Magnesio, sin embargo, en este caso hubo una absorción del 30% que tal parece no afectó la absorción del Potasio 68%, un porcentaje que se puede considerar adecuado.

También se puede observar el Boro y el Calcio que la planta los absorbió en un 37.5% y 38% respectivamente, en este caso existe una sinergia entre estos 2 elementos. La presencia del Boro capacita a la planta para absorber mejor el Ca.

Se detectó también una alta absorción de B (37%) que es un elemento importante en el desarrollo de la raíz, hojas y botones florales. Este elemento también favorece parte del metabolismo de carbohidratos y facilita el movimiento de los azúcares (COMPLEMAN,1985).

En general no se observa deficiencia ni toxicidad de ningún elemento con excepción del antagonismo N/Cu.

COLORADA

En la variedad colorada se obtuvo resultados similares a la variedad yema de huevo, en el protocolo P9, pero con mayor absorción del nitrógeno, que se puede observar en la diferencia del verdor de las variedades, donde la intensidad en la colorada fue mayor como se observa en la figura N° 31.

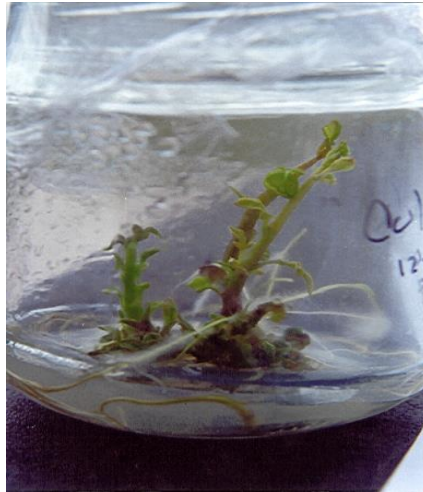


Figura N° 31 Plántulas de papa de variedad Colorada en protocolo P9 siembra (sales diluidas a la mitad) con una mezcla hormonal 0.1 mg / L de GA3 y 0.04 mg / L de quinina.

Del cuadro N° 8 se deduce que el orden decreciente de los nutrientes absorbidos por la plántula fue. P (71%), N(61%), K(57), Ca(41%), B(37.5%), SO₄(34%), Mg(31%), Fe(18%), Cu(10%),Mn(7%), Zn(7%).

La variedad Colorada tomó en mayor porcentaje, los macronutrientes con respecto a las otras variedades, los micro nutrientes se encontraron que la planta los tomó en un rango de 18 a 7, sin embargo, no se observó toxicidad ni antagonismos.

El Potasio la plántula lo absorbió en un 71% este es un elemento que tiene la función específica en la economía del agua en la planta, ya que interviene en el aguste de la apertura de los estomas y al activar su cierre, limita la transpiración como se dijo anteriormente, ya que el medio de cultivo se basa principalmente en

agua; debido a que la planta asimila ávidamente el potasio hasta cuando llega al estado de máximo follaje, en éste periodo relativamente corto debe haber una buena disponibilidad de potasio (Herrera, 2000). Es importante en la estructura de la molécula proteica y además como es un elemento móvil, actúa en los procesos de absorción iónica, síntesis, multiplicación y diferenciación celular.

El nitrógeno juega un papel muy importante en la fotosíntesis, lo que se puede observar en la figura N° 36 ya que la variedad Colorado lo tomó en un porcentaje del 61 %.

La alta absorción de $\text{SO}_4^{=}$ 34% se puede observar ya que el S estimula el crecimiento de la raíz, el color verde oscuro de las hojas, el vigor de la planta y la producción de semillas. (COMPLEMAN, 1985).

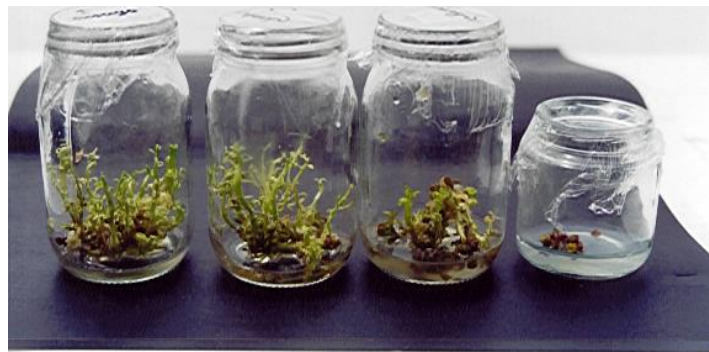


Figura N° 32. Plántulas de papa de variedad Colorado en protocolo P9 con una mezcla hormonal 0.1 mg / L de GA3 y 0.045 mg/ L de quinetina. Etapa de transerencia.

Los explantes de papa se sembraron en la etapa de siembra en recipientes de 100 cc tipo compota; en la etapa de multiplicación y enraizamiento en recipientes de 100 cc y 250 cc tipo mayonesa, los explantes difieren en parámetros como número de hojas y longitud de entrenudos, dependiendo del volumen del recipiente en el que se cultivaron. En general un mayor crecimiento de los explantes (frondosidad) se obtuvo en los recipientes de 250 cc esto nos sugiere que el tipo de recipiente afectaría la distribución de la biomasa sin implicar esto un alto aumento en la cantidad de medio; el efecto se puede observar en la figura N° 6



Figura N° 33. Plántulas de papa de variedad Parda pastusa, a los 60 días, cultivada en protocolo P₃. Efecto del tamaño del envase.

CONCLUSIONES

- Se adquirió destreza en el manejo de las técnicas de cultivo de tejidos para la micro propagación in vitro de tres variedades de papa.
- Se aprendió a llevar los respectivos registros de la preparación de medio de cultivo, de inventario de soluciones stock y el de evaluación de protocolos.
- Se obtuvo el medio de cultivo óptimo para cada etapa de la micro propagación in vitro de las tres variedades siendo el protocolo P3 para la variedad parda, el protocolo P9 para Y. de huevo y Colorada.
- El medio líquido para las variedades yema de huevo y colorada, en la etapa de transferencia es muy adecuado ya que permite la mayor absorción de nutrientes, las plantas presentan mayor vigor y se sostienen fácilmente, lo que nos indica, que se puede omitir el agar y de esta manera se permite el ahorro de reactivos; en cambio la variedad parda necesita medio sólido.
- El tipo de envase es un factor que interviene en la micropropagación in vitro, esto se pudo observar en las plántulas de las variedades yema de huevo y colorada, indicando que al tener mayor espacio y con

prácticamente la misma cantidad de medio, las plantas se desarrollan mejor.

- El retardado crecimiento de las plántulas de papa de las variedades parda pastusa se debe a su período vegetativo, ya que este es de 6 a 7 meses, mayor que el de la variedad yema de huevo 4 meses y colorada 4 – 5 meses.
- De los datos obtenidos en el análisis químico, se puede deducir que las plántulas toman muy poca cantidad de los micro nutrientes, ya que ellas los necesitan en muy poca cantidad, por tal motivo se puede sugerir una disminución en la concentración de estos o se podría aumentar el tiempo de permanencia de las plántulas en el medio de cultivo, y de esta manera se ahorrarían costos ya que el medio sobrante se desecha. Esto también podría evitarnos que se presentara alguna toxicidad.
- La alta absorción de K por la planta en las 3 variedades se debe a que el potasio, la papa lo absorbe en grandes cantidades durante las etapas tempranas de crecimiento.
- La absorción de Ca esta entre 36 y 41 % para las tres variedades, indicando que hay baja absorción de este elemento.
- Se mostró la importancia de realizar análisis estadísticos para dar validez a los resultados obtenidos

- Se demuestra que el análisis químico del medio de cultivo es indispensable al determinar un medio de cultivo para cualquier variedad de plantas ya que se pueden formular las cantidades apropiadas de nutrientes de un medio de cultivo in vitro, para siembra, transferencia y multiplicación.
- Con el análisis se puede afirmar con mayor exactitud en que tiempo la planta ha tomado la mayoría de los nutrientes suministrados al medio.

BIBLIOGRAFIA

1. ALCHANATIS, V. PELEG, K ZIU, H. Morphological and mensuration of potato from tissue cultures for automated micropopagation. Plant cell, Tissue and organ Culture. 1994.36(3)331-338.
2. Borah, M.N. and Milthorpe, F.L. Growth of potato as influenced by temperature. Indian Journal of Plant Physiology. 1962. 5, 53-72.
3. **BOX, Mateo. Biotecnología, Agricultura y alimentación. Madrid. 1993. 56 p.**
4. Bradford, K.J. and Yang, S.F. Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid , an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. Plant Physiology (1980). 65, 322-326.
5. BRAVO, Isabel; Giraldo, Efrén, Manual de prácticas de química agrícola: Análisis de suelos, 1999. 54-76.
6. **BU´LOCK, John, y Bjorn, Kristiansen. Biotecnología básica. España.1991. 533 p.**
7. Busnell, JThe effect of temperature on the potato plant. Proceedings of the American Society of Horticultural Science .(1923). 20, 307-310.
8. Butenko, R.G. Nutrition in tissue culture. In: Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis, pp 31-33. (Ed M.K. Chailekhyan). Israel Prog for Scientific Translation. 1968
9. CAÑON, Luis. Producción de semilla de papa de buena calidad, para mejorar

- la productividad en zonas. PLANTE, Municipio de Silvia Cauca, 2000.
10. CARMENATE, Ramiro, Balbin, Maria Irene. Elementos de Fitoquímica y biología. Producción biológica. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la Habana. 1997. 4-6, 10-14.
 - 11. CASTRO, Dagoberto y Restrepo, Aura. Programa para la producción de tubérculos - semilla de papa mediante las técnicas del cultivo de tejidos in vitro. Colombia. 1993.**
 12. CASTRO, Dagoberto, Programa para la producción de tubérculos-semilla de papa mediante las técnicas de cultivo in vitro. Universidad Católica de Oriente UCO, 1993.
 13. Catchpole, A.H. and Hillman, J. (1969). Effect of ethylene on tuber initiation in *Solanum tuberosum* L. *Nature* 223, 1387-1388.
 14. CERÓN, María del Socorro. Et al. Producción y almacenamiento de semilla de papa. CORPOICA. Boyacá - Cundinamarca. 1998.
 15. CHAPARRO, Catalina, Protocolo de micropropagación de papa (*Solanum tuberosum*) CORPOICA, Unidad de producción de semillas tecnológicas avanzadas de propagación in vitro de papa, yuca y plátano, 2000.
 16. Chapman, H.W. Tuberization in the potato plant. *Physiologia Plantarum* 1958. 11, 215-224.
 17. COMPLEMAN. Papel de los nutrientes en el desarrollo de las plantas con especial referencia al manganeso. *Manganesos Colombia*, 1985. 1-22p.
 18. Conger, B.V. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Raton, USA. 1981.
 19. Cornish, K. and Zeevaart, J.A.D. Abscisic acid accumulation by roots of *Xanthium strumarium* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. In relation to water stress. *Plant physiology* 1985. 79, 653-658.

20. CORSO, Pedro. **Producción biotecnológica de semilla de papa. CORPOICA. Santa Fe Bogotá, D.C. 1999.**
21. DEBABRATA SARKAT, ARMES CHANDRA; Effect of inoculation density on potato micropropagation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 48(63-86)1997.
22. DEVLIN, Robert. *Fisiología vegetal*. Barcelona, 1981. 304-316p.
23. Dodds, J.H. Biotechnological techniques applied to potato and sweet potato improvement for developing countries. In: *Plant Biotechnologies for Developing Countries- Proceedings of an international symposium organized by the CTA and FAO*, 1989. pp 221-227. Luxembourg.
24. ESPINOZA Nelson, Lizárraga Rolando. *Cultivo de tejidos: Micropropagación, conservación y exportación de germoplasma*, 1989. 2-20.
25. ESPINOZA, N.O., Estrada, R., Tovar, P., Silva-Rodriguez, D., Bryan, J.E. and Dodds, J.H. *Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germplasm*. CIP Specialized Technology Document. Lima, Peru, CIP. (1984).
26. ESPINOZA, N; Estrada, R.: Tovar, P. Bryan, H.; Dodds, J.H. *Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm*. Specialized Technology Document 1. International Potato Center, Lima, Peru. 1984.20 p.
27. GARCIA-Torres, L. and Gomez-Campo, C. *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. *Potato research* . (1973). 16, 73-79.
28. GARNER, N. and Blake, J. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany* 63, (1989). 663-674.
29. GRAHAN, Robin. Effect of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular to the trace elements. *Bot. Res. Academic press*. Vol 10,

222-257p.

30. GREGORY, L.E. Some factors for tuberization in the potato plant. *American Journal of Botany* 43, 1956). 281-288.
31. HARMEY, M.A., Crowley, M.P. and Clinch, P.E.M. (The effect of growth regulators on tuberisation of cultured stem pieces of *Solanum tuberosum*. *European Potato Journal* 9, 1966). 146-151.
32. HAVERKORT, A.J. MARINUS, J; Effect of giberellic acid and multiples harvest on production and reproductive value of seed potatoes produces above group on stems cultirgs. *Potato research(netherlands)*, 1995. 38(2)125-131.
33. HENSHAW, G. Technical aspect of tissue culture storage for genetic conservation. In: Frankel, O.H.; Hawkes, J.G. (eds.). *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge1975... 349-358 p.
34. HERRERA, Carlos. Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual técnico. CORPOICA, Tibaitatá. Noviembre 2000.
35. HU, C.Y.; Wang, P.J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. I. MacMillan, New York1983... 177-227. p
36. HUSSEY, G.. In vitro propagation of horticultural and agricultural crops. In: Smith, H. (ed.). *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge1983.. 111-138 p.
37. IGAG. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, sede Central. Determinación de Boro. 2000.
- 38. JARAMILLO, Sonia. Primer encuentro sobre control de calidad en procesos biotecnológicos. COLCIENCIAS. Medellin. 1993.**
- 39. JAYASINGHE, U y Salazar, L.F. Manual de técnicas en virología de**

plantas. Dpto de Patología. CIP.

40. LEVY, D, Propagation of potato by the transfer of transplants of "in vitro" proliferated shoot cultivo, into the field. *Scientia horticulture* (Netherlands).1988. 36:165-171.
41. LIESELOTTE Schilde- Rentschler , Schmiediche Peter. El cultivo de tejidos: su pasado, presente y futuro. En Circular CIP. Vol. 11, No. 1, 1984. 2p.
42. LOPEZ D.H., Zavala Q.T. CADENA H., M. Obtención y conservación de genotipo de papa libres de virus. Folleto misceláneo N° 3, Chapingo, México, 1985. 16p.
43. LUJAN, L. Semilla de papa en Colombia. En: la papa. FEDEPAPA, 2000.
44. MARETZKI, A., Thom, M. and Nickell, L.G.. Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. In: *Tissue Culture and Plant Science*, (1974) 329-361 p. (
45. MAUK, C.S. and Langille, R. Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Plant physiology* 62, (1978). 438-442.
46. MELLOR, F.C and Stace-Smith, R.. Virus-free potatoes by tissue culture. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant cell, Tissue and Organ Culture*, (1977) 618-625 p.
47. MENZEL, C.M. . Tuberization in potato at high temperatues: responses to gibberellin and growth inhibitors. *Annals of Botany* 46, 1980:259-265P.
48. -----, C.M.. Tuberization in potato at high temperatues: interaction between shoot and root temperatures. *Annals of Botany* 52, 1983 65-69.
49. -----C.M. Tuberization in potato at high temperatures: intercation between temperature and irradiance. *Annals of Botany* 55, (1985). 35-39.
50. MOREL, G.. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In: Frankel, O.H.; Hawkes, J.G. (eds.). *Crops Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge. 1975. 327-332

p.

- 51.-----, G.; Martin, G.. Guérison de dahlias atteintes d'une maladie a virus. Comp Renel 1952235:1324-1325P.
- 52.MURASHIGE T.. Plant propagation through tissue culture. Annual Reviews Plant Physiology 25: 1974135-166P.
53. , -----T. And Skoog, f.. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. In Physiol. Plant. 15: 1962. 151-497P.
- 54.----- T.; Skoog, F.. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum 1962. 15:473-497P.
- 55.NIETZSCHE, W.. Germplasm preservation. IN: Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and Breeding. Edited by D.A. Evans et. Al. Macmillan publishing Co. 1,1982: 782-805P.
- 56.PEREA, Dallos y Navarro Willy. Técnicas in vitro, para la producción y mejoramiento de plantas. CONICIT. 1998.
- 57.REDEPAPA. Boletín de la papa, diciembre 15, vol 2, N° 23. 2000.
- 58.ROCA, W.M.; Bryan, J.E.; Roca, M.R. 1979. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. Am. Potato J. 56:1-11P.
- 59.ROCA, W.M.; Espinoza, N.O.; Roca, M.R.; Bryan, J.E. 1978. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. Am. Potato J. 59:691-701P.
- 60.ROCA, William. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 1993.
- 61.ROJAS , Manuel. Fisiología Vegetal Aplicada. México, 1993. 121-135 p.
- 62.ROSELL, Cadmo H. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales.CIAT. Roma. 1990. 3-5p.

63. SALISBURY, Frank. Fisiología vegetal. México. 1994. 138-147p.
64. SCHILDE-RENTSCHLER, L.; Espinoza, N.O.; Estrada, R.; Lizarraga, R. In vitro storage and distribution of potato germplasm. Proc. 5th International Plant Tissue Culture Congress, Tokio.. 1982. 781-782 p.
65. SEABROOK, J.A., DOUGLAS, L.K. reduction in vigour of hapless potato culturing in vitro. Potato Research(Netherlands)1994. 37(4):365-371.
66. SEETOHUL, S. A study of the effects of carbohydrates in tissue culture of *Nicotiana tabacum*. Dissertation for requirement of B.Sc, University of Mauritius, Mauritius. 1995.
67. STYER, D.J. y CHIN, C.K.. Meristem and shoot-tip culture propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. 5, 1983. 221-227p.
68. TISDALE, S.L. Fertilidad de los suelos y fertilizantes . Barcelona, 760p.
69. TOLEDO Judit, ESPINOZA Nelson y GOLMIRZA Ali. Manual de Capacitación CIP. Manejo de plántulas in vitro en la producción de semilla de papa, 1998. 1-20p.
70. WILKINS, C.P.; Dodds, J.J.. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. Science Progress 68: 1982281-307.
71. WITHERS, L.A. Tissue culture storage for genetic conservation. Technical Report. IBPGR, Rome, 1980.. 22 p.

Anexo B. Test de Normalidad

Tests of Normality

TTO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
ENTRENUD	1	.353	11	.000	.656	11	.010**
	2	.311	8	.022	.738	8	.010**
	3	.333	10	.002	.797	10	.016
	4	.275	9	.048	.785	9	.018
	5	.471	9	.000	.536	9	.010**
	6	.272	10	.035	.803	10	.019
	7	.471	9	.000	.536	9	.010**
	8	.360	7	.007	.659	7	.010**
	9	.356	9	.002	.660	9	.010**
	10	.360	7	.007	.659	7	.010**
	11	.307	12	.003	.770	12	.010**
	12	.443	8	.000	.601	8	.010**
GROSOR	1	.353	11	.000	.656	11	.010**
	2	.251	8	.147	.891	8	.299
	3	.245	10	.091	.824	10	.035
	4	.414	9	.000	.621	9	.010**
	5	.519	9	.000	.386	9	.010**
	6	.240	10	.105	.888	10	.208
	7	.272	9	.054	.807	9	.032
	8	.360	7	.007	.659	7	.010**
	9	.356	9	.002	.660	9	.010**
	10	.338	7	.015	.768	7	.026
	11	.333	12	.001	.620	12	.010**
	12	.327	8	.012	.810	8	.044
HOJAS	1	.227	11	.120	.825	11	.027
	2	.228	8	.200*	.837	8	.078
	3	.433	10	.000	.598	10	.010**
	4	.223	9	.200*	.841	9	.070
	5	.389	9	.000	.685	9	.010**
	6	.318	10	.005	.637	10	.010**
	7	.389	9	.000	.685	9	.010**
	8	.435	7	.000	.598	7	.010**
	9	.471	9	.000	.536	9	.010**
	10	.345	7	.012	.728	7	.010**
	11	.375	12	.000	.765	12	.010**
	12	.455	8	.000	.566	8	.010**
LONG	1	.175	11	.200*	.900	11	.252
	2	.210	8	.200*	.881	8	.247
	3	.211	10	.200*	.917	10	.377
	4	.253	9	.101	.805	9	.031
	5	.274	9	.051	.788	9	.019
	6	.298	10	.012	.871	10	.113
	7	.234	9	.166	.917	9	.407
	8	.256	7	.182	.832	7	.091
	9	.335	9	.004	.752	9	.010**
	10	.267	7	.141	.917	7	.452
	11	.427	12	.000	.459	12	.010**
	12	.185	8	.200*	.959	8	.775

** . This is an upper bound of the true significance.

* . This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Anexo C. Test de homogeneidad de varianzas

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ENTRENUD	2.221	11	97	.019
GROSOR	5.146	11	97	.000
HOJAS	1.446	11	97	.165
LONG	1.719	11	97	.080

Anexo D Test de ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: LONG

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Corrected Model	118.228 ^b	11	10.748	74.546	.000	820.002	1.000
Intercept	4027.091	1	4027.091	27930.877	.000	27930.877	1.000
TTO	118.228	11	10.748	74.546	.000	820.002	1.000
Error	13.986	97	.144				
Total	4364.440	109					
Corrected Total	132.214	108					

a. Computed using alpha = .05

b. R Squared = .894 (Adjusted R Squared = .882)

Anexo E. Test de interacción de Duncan

LONG

Duncan^{a,b,c}

TTO	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
2	8	4.7125					
10	7	4.7286					
6	10	4.9500					
4	9		5.7889				
12	8		5.8250	5.8250			
9	9		5.9333	5.9333	5.9333		
5	9			6.1889	6.1889		
1	11				6.2818		
8	7					6.6714	
3	10					7.0200	
11	12						7.7750
7	9						7.9778
Sig.		.219	.455	.058	.070	.056	.264

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .144.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.860.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- Alpha = .05.

Anexo F. Test de Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	ENTRENUD	GROSOR	HOJAS
Chi-Square	77.617	98.546	92.202
df	11	11	11
Asymp. Sig.	.000	.000	.000

- Kruskal Wallis Test
- Grouping Variable: TTO

