

I. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad la papa es consumida en casi todos los pueblos del Mundo y es junto al trigo, maíz y arroz uno de los cuatro cultivos básicos en la alimentación humana.

En Bolivia se cultivan 180.000 hectáreas de papa con producción de 975.000 toneladas métricas con rendimiento promedio de 5,4 Tm/hectárea distribuidos en seis departamentos (La Paz, Cochabamba, Potosí, Oruro, y parte de Chuquisaca y Tarija), de los cuales las mayores superficies cultivadas están en los departamentos de La Paz (30.000 Ha), Potosí (28.000 Ha) y Cochabamba (26.000 Ha). (INE 2011)

En Tarija se cultivan 10.000 Hectáreas de papa con producción de 61.000 toneladas y un rendimiento promedio de 6,1 Tm/Ha, Tarija produce el 6% de la papa en Bolivia.

Por su gran interés agrícola y económico la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los principales cultivos de cosecha a nivel mundial, sin embargo existen grandes pérdidas debido tanto a factores bióticos como abióticos.

La biotecnología, como herramienta asociada a procesos de fitomejoramiento, ofrece posibilidades para hacer más eficiente la generación de nuevas variedades. Por ejemplo, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha convertido en una de las herramientas de gran utilidad para la obtención de material completamente sano en cortos periodos de tiempo y sin abarcar grandes espacios.

El tubérculo de papa es el órgano más utilizado para el cultivo de esta especie. La microtuberización proporciona ventajas en el almacenamiento, transporte de germoplasma libre de patógenos y también pueden ser adaptados para una producción de semilla a gran escala.

Los microtubérculos pueden plantarse directamente en el suelo y presentan las mismas características bioquímicas y morfológicas que los producidos en el campo.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, se presenta un serio problema para los agricultores para poder obtener semillas de alta calidad, libre de patógenos y principalmente libre de virus. Aspecto que se ha tornado como una limitante en el manejo del cultivo, razón por la cual los promedios del rendimiento son bajos.

El INIAF (Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal), desarrolla un esquema de certificación de semilla, partiendo de plantas propagadas *in vitro*, las cuales son aclimatadas en invernaderos o jaulas antiáfidos. Sin embargo, los inconvenientes principales en la producción de semilla de papa mediante las técnicas del cultivo *in vitro* se han presentado en el traslado y plantación desde la fase de aclimatización a condiciones de campo.

El costo de producción de la semilla pre-básica a través de la producción de vitroplantas, es alto, tornándose inaccesible para los productores de semillas, en algunos casos la producción de semilla básica es subvencionada por instituciones gubernamentales y no gubernamentales.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Se justifica la realización del presente trabajo de investigación porque la microtuberización se constituye como un método alternativo, que proporciona ventajas en comparación con las vitroplantas también producidas *in vitro*, las mismas tienen que pasar por diferentes fases como el enraizamiento y la aclimatación. Fases que se suprimen con la microtuberización, los microtubérculos pueden ser plantados directamente en las cajoneras o almacigueras, con mayor facilidad de manejo en el invernadero y obteniéndose tubérculo-semillas de buena calidad libres de patógenos debido a la total asepsia con que se trabaja.

Además, atraviesan un periodo de dormancia que los protege de peligros ambientales, permitiendo la disponibilidad de material para intercambio y la facilidad en la distribución y manejo del material debido a su escaso tamaño, su mayor resistencia a las condiciones de transporte, que no requieren de condiciones especiales para su

traslado y que pueden ser almacenados en la oscuridad y a bajas temperaturas durante periodos más largos que las vitroplantas sin sufrir ningún daño.

La microtuberización, se constituye una alternativa de producción de semilla pre-básica, más accesible económicamente frente a la producción de semilla pre-básica a través de vitroplantas.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la producción de microtubérculos en cultivo *in vitro* de tres variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) utilizando diferentes medios de cultivo.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la variedad de papa que tiene mayor respuesta a la microtuberización.
- Evaluar el efecto de tres medios de cultivo con concentraciones de fitorreguladores de crecimiento en la tuberización de vitroplantas de papa.
- Evaluar el comportamiento de las vitroplantas en tres diferentes fotoperiodos que permitan la inducción a la tuberización.

1.5 HIPÓTESIS

En la microtuberización *in vitro*, la oscuridad permanente es un factor que induce a la formación de mayor número de microtubérculos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia del Cultivo de papa

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo que ha ganado considerable importancia en las últimas décadas. Aunque se originó en América se cultiva en Europa, Asia y África. China es el mayor productor de este tubérculo. Es hoy uno de los cultivos más importantes para la producción de alimentos. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

2.2 Taxonomía de la papa

La taxonomía del cultivo de papa es la siguiente:

Reino: Vegetal

Phylum: Tracheophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Anthophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Grado Evolutivo: Metachlamideae

Grupo de Ordenes: Tetraciclicos

Orden: Polemoniales

Familia: Solanaceae

Nombre Científico: *Solanum tuberosum* L.

Nombre Común: papa

(Herbario Universitario, 2015)

2.3 Descripción morfológica de la papa

2.3.1 Raíces

Las plantas de papa pueden desarrollarse a partir de una semilla o de un tubérculo. Cuando crecen a partir de una semilla, forman una delicada raíz axonomorfa con ramificaciones laterales. Cuando crecen de tubérculos, primero forman raíces adventicias en la base de cada brote y luego encima de los nudos en la parte subterránea de cada tallo.

Ocasionalmente se forman raíces también en los estolones. En comparación con otros cultivos, la papa tiene un sistema radicular débil, por lo cual necesita un suelo de muy buenas condiciones físicas y químicas para su desarrollo. (Inostroza, J. 2009)

2.3.2 Tallos

El sistema de tallos de la papa consta de tallos, estolones y tubérculos. Las plantas provenientes de semilla verdadera tienen sólo un tallo principal mientras que las provenientes de tubérculos-semilla pueden producir varios tallos. Los tallos laterales son ramas de los tallos principales.

En el corte transversal, los tallos de papa presentan formas entre circulares y angulares. A menudo, en los márgenes angulares se forman alas o costillas. Las alas pueden ser rectas, onduladas o dentadas. El tallo generalmente es de color verde y algunas veces puede ser de color marrón-rojizo o morado. (Inostroza, J. 2009)

2.3.3 Estolones

Morfológicamente descritos, los estolones de la papa son tallos laterales que crecen horizontalmente por debajo del suelo a partir de yemas de la parte subterránea de los tallos.

Los estolones largos son comunes en las papas silvestres y el mejoramiento de la papa tiene como una de las metas obtener estolones cortos. Los estolones pueden formar tubérculos mediante un agrandamiento de su extremo terminal. Sin embargo, no todos

los estolones llegan a formar tubérculos. Un estolón no cubierto con suelo, puede desarrollarse en un tallo vertical con follaje normal. (Inostroza, J. 2009)

2.3.4 Tubérculos

Los tubérculos de papa son tallos modificados y constituyen los principales órganos de almacenamiento de la planta de papa. Un tubérculo tiene dos extremos: el basal, o extremo ligado al estolón, que se llama talón, y el extremo expuesto, que se llama extremo apical o distal.

Los ojos del tubérculo de papa corresponden a los nudos de los tallos, las cejas representan las hojas, y las yemas del ojo representan las yemas axilares. Las yemas de los ojos pueden llegar a desarrollarse para formar un nuevo sistema de tallos principales, tallos laterales y estolones. Generalmente, cuando el tubérculo ha madurado, las yemas de los ojos están en un estado de reposo y, por ello, no pueden desarrollarse. Al cabo de cierto tiempo, dependiendo de la variedad, las yemas del ojo apical son las primeras en salir del reposo.

Esta característica se llama dominancia apical. Más tarde, las yemas de los otros ojos se desarrollan para convertirse en brotes. (Inostroza, J. 2009)

2.3.5 Hojas

Las hojas están distribuidas en espiral sobre el tallo. Normalmente, las hojas son compuestas, es decir, tienen un raquis central y varios folíolos. Cada raquis puede llevar varios pares de folíolos laterales primarios y un folíolo terminal. La parte del raquis debajo del par inferior de folíolos primarios se llama pecíolo. Cada folíolo puede estar unido al raquis por un pequeño pecíolo llamado peciolulo, o puede estar unido directamente, sin peciolulo, y en este caso se llama folíolo sécil. En la base de cada pecíolo se encuentran dos hojuelas laterales llamadas seudoestípulas.

Desde el punto de inserción del pecíolo pueden extenderse hacia abajo, las alas o costillas del tallo. (Inostroza, J. 2009)

2.3.6 Inflorescencia, Flor

El pedúnculo de la inflorescencia está dividido generalmente en dos ramas, cada una de las cuales se subdivide en otras dos ramas.

De esta manera se forma una inflorescencia llamada cimosa. De las ramas de las inflorescencias salen los pedicelos, en cuyas puntas superiores se encuentran los cálices. Cada pedicelo tiene una coyuntura o articulación en la cual se desprenden del tallo las flores o los frutos. Las flores de la papa son bisexuales (tienen ambos sexos), y poseen las cuatro partes esenciales de una flor: cáliz, corola, estambres y pistilo. (Inostroza, J. 2009)

2.3.7 Fruto, Semilla

Al ser fertilizado, el ovario se desarrolla para convertirse en un fruto llamado baya, que contiene numerosas semillas. El fruto generalmente es esférico, pero en algunas variedades son ovoides o cónicos. Normalmente, el fruto es de color verde, y en algunas variedades cultivadas tienen puntos blancos o pigmentados, o franjas o áreas pigmentadas. El número de semillas por fruto llega a más de 200 según la fertilidad de cada cultivar.

Las semillas son planas, ovaladas y pequeñas (1.000-1.500 semillas/gramo). Cada semilla está envuelta en una capa llamada testa que protege al embrión y un tejido nutritivo de reserva llamado endospermo. Las semillas son también conocidas como semilla verdadera o botánicas, para distinguirlas de los tubérculos-semillas, usados para la producción. (Inostroza, J. 2009)

2.4 Principales enfermedades, virus, nemátodos e insectos del cultivo de la papa

2.4.1 Tizón Tardío (*Phytophthora infestans*)

A pesar de que existen medidas efectivas de control, el tizón tardío sigue siendo el problema más grave entre las enfermedades fungosas en muchas regiones productoras de papa.

En el follaje aparecen lesiones de aspecto húmedo que en pocos días se vuelven de color castaño cuando están secas o negras cuando están húmedas. En condiciones de humedad se hace visible una esporulación blanca parecida al mildiu, en particular en el envés de la hoja. Las esporas que la lluvia lava de las hojas y del tallo penetran en el suelo e infectan los tubérculos causándoles decoloración superficial. Las temperaturas entre 10 °C y 25 °C, junto con rocío fuerte o lluvia, favorecen la enfermedad. (Mabbett, T. 1995)

2.4.2 Tizón temprano (*Alternaria solani*)

En las hojas y en menor grado en los tallos se forman manchas pardas, angulares y necróticas que al centro tiene una serie de anillos concéntricos. Las lesiones en las hojas rara vez son circulares porque son restringidas por las nervaduras principales. Aparecen generalmente en la florescencia y van aumentando en número a medida que van madurando las plantas. Las lesiones se forman primero en las hojas inferiores, pueden causar amarillamiento general, caída de las hojas o muerte precoz. La pudrición del tubérculo es de color oscuro. (Centro internacional de la papa.1983)

2.4.3 Marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*)

La marchitez bacteriana o pudrición parda es la enfermedad bacteriana más grave para la producción de papa. Con frecuencia restringe la producción. Los síntomas iniciales de la marchitez pueden ser observados primero en un solo lado de una hoja o en una rama y no en otra. Los síntomas avanzados son marchitez severa y muerte de la planta. Los haces vasculares se oscurecen y si se hace un corte transversal la planta exuda un mucilago de color entre gris y castaño. (Centro internacional de la papa.1983)

2.4.4 Sarna pulverulenta (*Spongospora subterranea*)

La sarna es un defecto del tubérculo que se encuentra en todas partes del mundo donde se cultiva la papa. El organismo causal ha entrado en la mayor parte de los suelos de este cultivo. (Centro internacional de la papa.1983)

En los tubérculos se aprecian los síntomas característicos, al principio como pequeñas verrugas que luego se transforman en protuberancias irregulares rasgadas que liberan

un polvo marrón formado por las esporas, los bordes de las lesiones quedan retorcidos hacia afuera. (Calderón, A. 1984)

2.4.5 Enrollamiento de las hojas (PLRV)

Se considera como el virus más importante a nivel mundial. En Bolivia ocasiona daños severos en zonas de valle donde existen condiciones favorables para sus vectores, los áfidos especialmente *Myzus persicae*. El PLRV es el principal responsable de la degeneración del cultivo de papa, a la que los agricultores la llaman “semilla cansada”. (Gabriel, J. et al. 2011)

2.4.6 Virus Y de la papa (PVY)

Es el segundo virus más importante en el mundo en Bolivia se encuentra en todas las zonas donde se produce papa. El virus PVY se transmite por áfidos. (Gabriel, J. et al. 2011)

Mosaico bien visible, gran rugosidad en las hojas, torsión de los bordes hacia abajo, a veces necrosis en la nervadura del envés, reducción del envés, reducción del tamaño de los tubérculos y baja producción. (Calderon, A. 1984)

2.4.7 Nemátodos del Quiste (*Globodera pallida* y *g. rostochiensis*)

Los nemátodos del quiste son una plaga severa en algunas de las principales zonas de cultivo de papa.

Los síntomas en las partes aéreas de la planta no son específicos. Es común que haya un crecimiento pobre, enanismo, amarillamiento y senescencia temprana. La única característica específica se encuentra en las raíces y a veces en los tubérculos: hembras diminutas esféricas, blancas o amarillas. Las hembras toman finalmente un color marrón y esto representa la fase del enquistamiento en la cual contienen huevos que son viables por largos periodos.

Esta plaga se disemina principalmente por suelo adherido a los tubérculos, la maquinaria, los recipientes y las herramientas de campo. (Centro internacional de la papa.1983)

2.4.8 Rosario de la papa (*Nacobbus aberrans*)

Los síntomas aéreos son similares a aquellos causados por otras enfermedades radiculares, por ejemplo enanismo y falta de vigor. Los síntomas radiculares consisten en agallas en forma de cuentas. Debido a la similitud con las agallas causadas por *Meloidogyne*, es fácil confundirlas. La presencia inadvertida de este nemátodo debajo de la piel de los tubérculos y su capacidad de sobrevivencia en el suelo seco adherido a los tubérculos contribuye a su diseminación. (Centro internacional de la papa.1983)

Este nemátodo está presente en el 80% de las zonas paperas de Bolivia. Se puede encontrar en los valles mesotérmicos de Cochabamba y Santa Cruz desde los 1.800 m.s.n.m. hasta más de los 3.000 m.s.n.m. (Gabriel, J. et al. 2011)

A través de la micropropagación se pueden obtener un gran número de plantas libres de patógenos causantes de enfermedades y pueden ser obtenidas de una sola planta en un periodo corto (Arce. C. 2013)

En el caso de papa, como en todas las especies de propagación agámica, los virus tienen una particular importancia por su acumulación en los materiales de propagación y su incidencia en los rendimientos.

La única herramienta disponible actualmente para obtener plantas y semilla de papa libres de virus de manera eficiente y confiable, es utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. (Universidad Nacional de Córdoba. 2010)

2.4.9 Araña roja (*Tetranychus sp.*)

Los daños de esta plaga se acentúan en días secos y calurosos, pudiendo destruir íntegramente la cosecha. (Abcagro, 1997)

2.4.10 Polilla de la papa (*Pbtborimaea operculella* y *Scrobipalopsis solanivora*)

No sólo ataca a la papa sino a otras muchas solanáceas como el pimiento, la berenjena, el tomate o el tabaco.

Los daños se deben a las galerías que las larvas hacen dentro de los órganos aéreos (en el campo) y a las galerías que hacen en los tubérculos que además son puerta de entrada de enfermedades criptogámicas (en el almacén). (Abcagro, 1997)

2.4.11 Escarabajo de la papa (*Epitrix spp*)

El escarabajo de la papa es muy común. Los adultos de 2 a 3 mm de longitud, producen huecos pequeños y circulares de 1 mm de diámetro en las hojas, las hojas suelen secarse y morir. Las larvas tienen más de 1 mm de largo y se alimentan de las raíces y de los tubérculos. El daño en el tubérculo es el más importante y se nota a la vista como un labrado fino de túneles. Se asocia frecuentemente una infección de sarna común con el daño en el tubérculo. (Centro internacional de la papa.1983)

2.5 Descripción de las variedades de papa

2.5.1 Variedad Marcela

Rendimiento en condiciones óptimas: 40 Tm/Ha

Metodología de obtención: Por Cruzamiento entre Var. Alpha x Var. Huaycha y selección conjunta con productores e investigadores de Tarija

Características de la planta

- Ciclo vegetativo: 150 días
- Planta vigorosa de gran tamaño y porte semi-erecto
- Flor rosada
- Resistente a *Phytophthora infestans* (Tizón Tardío)
- Tolerante a heladas

Características del tubérculo

- Tubérculo redondeado, ojos profundos
- Piel rosada

- Pulpa blanca
- Muy harinosa, de rápido cocimiento. (Gabriel, J. et al. 2011)

2.5.2 Variedad Desirée

Características de la planta:

- Ciclo vegetativo: 90-120 días
- Resistente media a *Phytophthora infestans* (Tizón Tardío) y resistencia alta (*Fusarium spp*)
- Planta vigorosa de tamaño que alcanza de 50 a 60 cm.
- Flor violeta

Características del tubérculo:

- Tubérculo ovalado-largo
- Piel lisa y color rojo brillante
- Pulpa color crema
- Ojos superficiales
- Apropiaada para la preparación de papas fritas.

(Instituto de investigaciones agropecuarias. 1986)

2.5.3 Variedad Revolución

Origen.- Peruana desde el año 1973

Rendimiento: 40 Tm/Ha

Característica de la planta

- Tallo verde oscuro
- Hojas anchas
- Flor de color lila claro
- Ciclo vegetativo: 150-180 días

Característica del tubérculo

- Forma redonda
- Piel amarilla clara
- Pulpa amarilla
- Ojos violeta superficiales
- Utilidad y calidad culinarias.- Calidad culinaria buena, textura harinosa especial para frituras. (Texto de Agricultura General. 2010)

2.6 La Propagación vegetativa *in vitro*

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. (Gino, A. et al. 2010)

Micropropagar es el proceso de multiplicar plantas *in vitro*. A través de la micropropagación a partir de un fragmento de una planta madre, es posible obtener poblaciones uniformes en condiciones de asepsia. (Gomez, E. 2003)

2.6.1 Etapas de la propagación *in vitro*

Murashige (1974; 1977 a,b) y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera: (CIAT. 1991)

2.6.1.1 Etapa I

Es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial primario. (CIAT. 1991)

2.6.1.2 Etapa II

Es la etapa de multiplicación de brotes, o de multiplicación simplemente.

2.6.1.3 Etapa III

Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones de trasplante al suelo. (CIAT. 1991)

Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con cada una de las etapas mencionadas y cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones. Sin embargo, no se debe llegar a la deducción de que estas etapas son siempre completamente distintas y separables. (CIAT. 1991)

Además de las tres etapas mencionadas (propuestas inicialmente por Murashige, 1974) pueden considerarse otras dos como parte integral del procedimiento:

2.6.1.4 Etapa IV

Transferencia final a la etapa del medio ambiente.

2.6.1.5 Etapa 0

Etapa inicial que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte. (CIAT. 1991)

2.6.2 Factores que influyen en la micropropagación

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación.

A continuación se menciona aquellos más importantes acerca de los cuales se ha acumulado mayor información. (CIAT. 1991)

2.6.2.1 Planta que dona el explante

El estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogenética. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados

proviene de plantas en diferentes edades fisiológicas. Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro*. A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies. (CIAT. 1991)

2.6.2.2 El Explante

Como se mencionó anteriormente, el explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta. (CIAT. 1991)

Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Este método se usa extensivamente en coníferas y otras especies maderables. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes. (CIAT. 1991)

2.6.2.3 Factores físicos

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y en la noche, y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa. (CIAT. 1991)

Recientes investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis. Al respecto se ha observado en el caso de *Pinus radiata*, que la luz interacciona con una citocinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y

que la morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos dos componentes. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperiodo y la calidad; aunque se reconoce la importancia morfogenética de estos componentes, los estudios realizados con el fin de analizarlos son escasos. (CIAT. 1991)

2.7 Medios de cultivo

El crecimiento de las plántulas *in vitro* depende de factores nutricionales y ambientales. Los cuales interactúan para producir una plántula con características similares a las que crecen en el campo. Los factores nutricionales tienen como base el medio Murashige & Skoog (1962) compuesto de sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, reguladores de crecimiento, agentes quelatos y sustancias gelificantes.

El medio de tuberización contiene reguladores de crecimientos los cuales, a través de un estrés inducen la producción de microtubérculos. (Toledo, J. et al. 1998)

2.7.1 Macronutrientes

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas.

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fosforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo. (Gino, A. et al. 2010)

2.7.2 Micronutrientes

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y molibdeno (Mo). (Gino, A. et al. 2010)

2.7.3 Reguladores de crecimiento

Se entiende por reguladores de crecimiento a las hormonas vegetales, las mismas que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se traslocan a otro dónde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca a las sustancias, tanto de origen natural como sintetizadas en laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta. (Gino, A. et al. 2010)

2.7.4 Agente quelatos

López (1990) indica que son necesarios para la síntesis de la clorofila. Existen varios agentes quelantes, pero el más usado es el EDTA (ácido etilendiamin Tetra Acético) por ser menos tóxico que otros quelatos y que en combinación con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en bajas concentraciones, estimula el crecimiento permitiendo la disponibilidad de hierro al cultivo. (Gino, A. et al. 2010)

2.7.5 Carbohidratos

Margara (1998), señala que los tejidos *in vitro* son organismos heterótrofos y por esta razón es indispensable añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, como fuente de energía y regulador osmótico.

La sacarosa es la fuente de energía más utilizada en el cultivo *in vitro*, pero en ocasiones se emplea otros carbohidratos como la glucosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados. (Gino, A. et al. 2010)

2.7.6 Vitaminas

La única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y de órganos es la Tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específico. (Hurtado, D. et al. 1987)

2.7.7 Sustancias gelificantes

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte. Sin embargo fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. (Hurtado, D. et al. 1987)

2.8 El Proceso de tuberización

La planta de papa tuberiza en días cortos y noches frías. En ella cada brote tiene el potencial de tuberizar, y esta plasticidad inherente es definitivamente un obstáculo biológico hacia la comprensión de los mecanismos exactos del control de proceso de tuberización. Además de los estolones, prácticamente todas las yemas axilares en tallos o esquejes pueden formar un tubérculo, siempre que la planta haya inducido a tuberizar. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

La tuberización es un proceso morfofisiológico altamente coordinado que está influenciado por variables genéticas, fisiológicas o medioambientales y tiene lugar en los estolones subterráneos bajo la influencia de factores extrínsecos e intrínsecos. Sin embargo, después de décadas de investigación aún no se dispone de un modelo único que integre todos los eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que tienen lugar en la planta de papa ante la presencia de diferentes factores inductores de la tuberización. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

Las fluctuaciones en la duración del día son fundamentales para promover la diferenciación de los estolones en tubérculos. La duración del día se percibe en las hojas por el fitocromo B y en condiciones inductivas estas sintetizan una señal sistémica que se transporta a los estolones subterráneos para inducir el desarrollo del tubérculo. Los estolones subterráneos inducidos detienen su alargamiento, comienzan

a ensancharse y posteriormente se forman los tubérculos. Si el estolón no forma un tubérculo entonces emerge del suelo y forma un tallo aéreo. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

2.9 Propagación por métodos biotecnológicos

La propagación *in vitro* de papa es mediante el subcultivo de yemas axilares. Se pueden obtener tanto plantas *in vitro* como microtubérculos.

Las plantas de papa propagadas *in vitro* pueden producir microtubérculos cuando se colocan en condiciones adecuadas. Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

2.10 La Tuberización *in vitro*. Generalidades

Sluis y Rivera, indican que las técnicas *in vitro* han llegado a una fase especializada al producir microtubérculos. Pese a la compleja fisiología de la papa, no es complicado producir tubérculos *in vitro*, basta con producir ciertos factores de la tuberización del campo en laboratorio. Los tubérculos *in vitro* se forman también a partir de estolones pero en versión miniatura. (Estrella J. 1990)

Generalmente el proceso se desarrolla en dos etapas, una primera de crecimiento y desarrollo de los segmentos nodales y otra de tuberización. En los protocolos para la obtención de microtubérculos propuestos por diferentes autores las plantas *in vitro* en la etapa de tuberización se colocan en la oscuridad ya que se ha comprobado que en presencia de la luz, este proceso se puede retrasar. En dichas condiciones las yemas axilares se diferenciarán en un tubérculo en lugar de en una hoja. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

Evidencias experimentales apuntan a que la formación de tubérculos *in vitro* depende de la concentración de sacarosa, ya que estos se pueden obtener sin ningún tipo de adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.

Algunos autores han definido un doble papel de la sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos. Añadida al medio de cultivo, puede actuar como fuente de

carbohidratos, como sustancia osmótica o como ambas. Además de ser una fuente de carbono adecuada y fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierten en almidón en el desarrollo del microtubérculo, sacarosa a una concentración de 80,0 g l⁻¹, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo. (Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. 2012)

Se reportan que los microtubérculos no son iguales a los producidos en el campo. Aunque los tubérculos producidos en laboratorio son muy pequeños pueden estar completamente maduros, su tamaño por tanto no refleja madurez ni edad fisiológica. Además cada microtubérculo emite tallos dos veces más gruesos que los de otras plántulas *in vitro* tras plantadas al suelo. (Estrella J. 1990)

2.10.1 Concepto de microtubérculo *in vitro*

Los microtubérculos *in vitro* son unidades morfológicamente idénticas a los tubérculos producidos *in situ*, cada unidad es una porción caulinar engrosada en mayor o menor grado de crecimiento en la oscuridad o a bajas intensidades luminosas, son unidades ricas en sustancias de reserva (almidón, inulina), por su morfología y fisiología especiales, pueden generar nuevas plantas y tubérculos. (Estrella J. 1990)

2.10.2 Ventajas de la producción de microtubérculos *in vitro*

Las ventajas de producir microtubérculos se resumen en los siguientes puntos:

- Facilitar la tarea de aclimatación de las plantas cultivadas *in vitro*.
- Disponibilidad del material durante todo el año.
- Posibilidad de propagar el material en cuanto se recibe.
- La característica de fitosanidad.
- Economía de espacio y peso, lo cual reduce los costos.

(Estrella J. 1990)

2.10.3 Factores que Afectan la tuberización *in vitro*

2.10.3.1. Temperatura

La temperatura óptima para la tuberización *in vitro* es 20 °C; sobre los 28 °C las temperaturas resultan inhibitorias al igual que las temperaturas bajo los 12 °C.

La temperatura óptima para la tuberización *in vitro* se da en un rango de 20 °C a 25 °C.

2.10.3.2 Fotoperiodo

Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración tuberización, etc.) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta.

De forma análoga, el número de horas luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general el mejor fotoperiodo *in vivo* será también el mejor fotoperiodo *in vitro*. (Estrella J. 1990)

2.10.3.3 Fuentes de Carbono

La presencia de carbono en el medio es un factor primordial en la tuberización *in vitro*. Las fuentes de carbono intervienen directamente en la síntesis de carbohidratos.

En el cultivo de tuberosas, existen una relación inversa entre el crecimiento de tallos y de los tubérculos: el crecimiento de tallos virtualmente se define cuando se inicia la tuberización. La translocación de carbohidratos a los tubérculos solo se da en el momento en que los requerimientos de los tallos están plenamente saturados.

Los carbohidratos del medio se proveen por la adición de sacarosa. Wang Hu (1982), detectan un 8% como el óptimo para el proceso; aumentando la concentración se incrementa la precocidad de la tuberización *in vitro*. (Estrella J. 1990)

2.10.4 Promotores del crecimiento

2.10.4.1 Citoquininas

La tuberización *in vitro* ocurre si se usa citoquininas exógenas como la Benzilaminopurina (BAP) y la Kinetina (KIN); la ausencia de ellas generalmente provoca ausencia de tuberización. Se reporta que las citoquininas resultan efectivas en estimular la acumulación de almidón en los tallos *in vitro* de papa. (Estrella J. 1990)

2.10.4.2 Auxinas

Las auxinas no son esenciales en la tuberización *in vitro*; las altas concentraciones de auxinas suelen ser inhibitorias. Se ha observado que menos de 1 ppm de auxinas permite la inducción a la tuberización. (Estrella J. 1990)

2.10.4.3 Giberilinas

Promueven el crecimiento vegetativo e inhiben la tuberización; una concentración de 25 ppm elimina totalmente la tuberización con Coumarina. (Estrella J. 1990)

2.10.5 Inhibidores del crecimiento

2.10.5.1 Acido abscisico (ABA)

Se considera al ABA como un promotor de la tuberización; sin embargo su función en la inducción es todavía discutible. Aparentemente el papel de ABA es indirecto y actúa suprimiendo el crecimiento de tallos y estimulando el movimiento de carbohidrato hacia el tubérculo. El ABA posiblemente desempeña un papel en la diferenciación celular y de los órganos radiculares, inhibiendo la actividad meristemática apical y la elongación celular. (Estrella, J. 1990)

2.10.5.2 Cloruro de clorocolina (CCC)

El CCC o Cycocel es un retardante del crecimiento de uso común en muchos cultivos.

Su función es variable; en papa se usa para inducir la tuberización *in vivo* e *in vitro*. El CCC añadido en una concentración de 500 mg/l al medio de cultivo produce fácilmente microtubérculos. Es capaz de inducir tuberización en un amplio rango de genotipos. (Estrella, J. 1990)

2.10.6 Uso de los tubérculos producidos *in vitro*

Diversos autores resumen el uso de los microtubérculos en los siguientes aspectos:

1. Producción de material para semilla pre-básica libre de patógenos y virus para los programas de certificación de semilla.
2. Empleo de este material para el intercambio internacional de germoplasma, especialmente hacia aquellos países que carecen de personal adiestrado para manejar plantas *in vitro* o bien para facilitar el transporte de germoplasma.
3. Uso con fines de conservación de germoplasma a mediano plazo. (Estrella. 1990)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el departamento de Tarija, Provincia Cercado Zona el Tejar, en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In Vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15` de latitud sur y los meridianos 64° 21` y 65° 05` de longitud Oeste, con una altura promedio de 1850 m.s.n.m.

3.2 Material y Equipo

3.2.1 Equipo

- Agitador
- Balanza
- Microhondas
- Potenciómetro
- Autoclave
- Hornos
- Cámara flujo laminar

3.2.2 Material

- Frascos de vidrio
- Tubo de ensayo
- Magentas
- Probetas
- Pipetas
- Vasos de precipitado
- Pinzas
- Mecheros
- Bisturís

- Cajas Petri
- Plaquetas de vidrio

3.2.3 Material Biológico

- Variedad Desirée
- Variedad Revolución
- Variedad Marcela

3.3 Metodología

3.3.1 Preparación del medio de cultivo M&S para la fase de establecimiento

Se preparó el medio de cultivo M&S para la fase de establecimiento *in vitro* de las plantas madres de las variedades Marcela, Revolución y Desirée.

Los medios de cultivo se prepararon en los tubos de ensayos para luego ser esterilizados en autoclave automática.

El medio de cultivo está constituido de la siguiente manera:

- ✓ M1: Macroelementos
- ✓ M2: Microelementos
- ✓ M3: Vitaminas
- ✓ M4: Fuentes de hierro
- ✓ Sacarosa
- ✓ Reguladores de crecimiento
- ✓ Agar

3.3.2 Esterilización del medio de cultivo M&S

Se colocaron 20 ml de medio de cultivo M&S en tubos de ensayo y se depositaron dentro de un autoclave automática, para ser esterilizados durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo, bajo una presión interna de 1.2 atmosferas y una temperatura de 121°C. Luego el material fue enfriado y almacenado en un lugar fresco para ser utilizado en el menor tiempo posible para la fase de establecimiento *in vitro* de las plantas madres de papa.

3.3.3 Fase de establecimiento *in vitro*

Se realizó el establecimiento de plantas madre de papa de las variedades Marcela, Desirée procedentes de semilla pre-básica, se hizo el corte de los esquejes de aproximadamente 1 cm con un bisturí para luego someterlos al protocolo de desinfección que consiste en sumergir a los esquejes en detergente líquido, sumergir en alcohol al 70% por diez segundos, enjuagar con agua destilada estéril luego sumergir en hipoclorito de sodio al 2.5 % por diez minutos después enjuagar tres veces con agua destilada estéril por el tiempo de 3 minutos para posteriormente sembrar en los tubos de ensayo en la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia.

3.3.4 Preparación del medio de cultivo M&S para la fase de multiplicación

Se realizó el mismo procedimiento de preparación del medio de cultivo base M&S que en la fase de establecimiento *in vitro* con la diferencia que envés de depositarlos en tubos de ensayo se lo realizo en los frascos de vidrios para su respectiva esterilización en un autoclave automática.

3.3.5 Esterilización del medio de cultivo M&S

Se colocaron 30 ml de medio de cultivo M&S en frascos de vidrio y se depositaron dentro de un autoclave automática, para ser esterilizados durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo, bajo una presión interna de 1.2 atmosferas y una temperatura de 121 °C. Luego el material fue enfriado y almacenado en un lugar fresco para ser utilizado en el menor tiempo posible para la fase de multiplicación de las vitroplantas.

3.3.6 Esterilización de los materiales

Se esterilizaron los materiales como ser: Pinzas, cajas petri, bisturí, vasos de precipitados, tubo de ensayos y plaquetas de vidrio.

Estos materiales se envolvieron en periódicos para ser esterilizados en calor seco en un horno a una temperatura de 150 °C durante un tiempo de dos horas y media.

3.3.7 Fase de multiplicación

La fase de multiplicación se realizó en la cámara de flujo laminar en condiciones de asepsia, se trabajó con vitroplantas de papa de la variedad Marcela, Revolución y Desirée que provenían de la fase de establecimiento *in vitro* y de vitroplantas madres realizando el corte de esquejes y depositándolos en los frascos de vidrios que contenían el medio de cultivo previamente esterilizado para ser llevados a las cámaras bioclimáticas para su respectivo crecimiento de los esquejes.

3.3.8 Establecimiento y tamaño de los ensayos

Se utilizaron frascos de vidrio dónde se les adicionó 30 ml de medio de cultivo sólido de acuerdo a cada tratamiento y se colocaron cuatro vitroplantas de cuatro semanas de edad. Cada frasco fue sembrado en una cámara de flujo laminar en condiciones asépticas a los cuales se les puso un código que representaba cada tratamiento, representando cada frasco a una unidad experimental.

3.3.9 Siembra de ensayos

Para la inducción a la tuberización de las vitroplantas de papa se realizó el cambio del medio residual de propagación utilizado en la etapa de establecimiento y multiplicación, por diferentes medios de tuberización que contenían citoquininas, carragenina y mayor porcentaje de azúcar.

Se depositó cuatro vitroplantas de papa en cada frasco que constituían una unidad experimental, cada frasco contenía 30 ml del medio de tuberización, sellando los frascos y depositándolos en las cámaras con los diferentes fotoperiodos a una intensidad lumínica de 3500 lux.

3.4 Inducción a la tuberización bajo diferentes medios de cultivo

- **Medio de tuberización 1**

El medio de tuberización 1 está compuesto por el medio M&S base al cual se le adiciono carragenina en vez de agar y se le subió la concentración de azúcar a un 8% y no contenía ninguna citiquinina.

- **Medio de tuberización 2**

El medio de tuberización 2 está constituido por el medio M&S base al cual se le sustituyó el agar por la carragenina y de igual manera se le subió la concentración de azúcar a 8% y se le adicionó la citoquinina BAP (Benzilaminopurina).

- **Medio de tuberización 3**

El medio de tuberización 3 de igual manera está conformado por el medio M&S base y de igual forma contiene carragenina y concentración de azúcar de un 8% y se le adicionó la citoquinina KIN (Kinetina).

3.5 Inducción a la tuberización bajo diferentes fotoperiodos

Se determinó la formación de tubérculos *in vitro* sometidos bajo tres fotoperiodos; 0, 8 y 16 horas luz. Para ello se utilizaron vitroplantas de cuatro semanas de edad. Estas fueron incubadas durante 80 días bajo los diferentes tratamientos a una temperatura promedio de 23°C e intensidad lumínica promedio de 3500 lux.

- **Cámara con fotoperiodo de 0 horas luz**

Para que los tratamientos puedan estar en completa oscuridad, se los depositó en una caja para que no les llegara la luz donde permanecieron todo el tiempo que duró el ensayo.

- **Cámara con fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad**

Se acondicionó un estante donde se depositaron las unidades experimentales para que mantuvieran 8 horas de oscuridad y 16 horas luz.

Esta cámara se mantuvo a una intensidad lumínica promedio de 3500 lux y a una temperatura de 23°C de acuerdo a las mediciones realizadas periódicamente.

- **Cámara con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad**

Se realizó de igual manera, se acondicionó un estante donde se colocaron las unidades experimentales donde mantuvieron 16 horas luz y 8 horas oscuridad a una intensidad lumínica de 3500 lux y a 23°C de temperatura.

3.6 Temperatura

El factor de la temperatura se controló realizando mediciones diarias con termómetros de máxima y mínima colocados en las tres cámaras bioclimáticas utilizadas en los ensayos.

3.7 Variables a estudiar del ensayo

Una vez realizada la cosecha de los microtubérculos se procedió a realizar una evaluación al final del ensayo tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- **Número de microtubérculos a los 40 días**

La evaluación se lo realizó de forma visual a los 40 días de iniciado el ensayo contando cada uno de los microtubérculos que contenían cada planta en los diferentes tratamientos para su respectiva evaluación.

- **Número de microtubérculos a los 80 días**

De igual manera se realizó de forma visual una vez finalizado el ensayo que fue a los 80 días, se procedió a cosechar los microtubérculos y separarlos por tratamientos para hacer la respectiva evaluación.

- **Tamaño de los microtubérculos**

Para la evaluación de la variable “tamaño de los microtubérculos” se procedió a medir los diámetros con un vernier de precisión de 0,05 centésimas de milímetro.

- **Peso de los microtubérculos**

Para la variable “peso de los microtubérculos” se procedió a eliminar los residuos del medio de cultivo para llevarlos a pesar en la balanza analítica de precisión 0,1 miligramos.

- **Número de yemas**

Para realizar el conteo de las yemas se utilizó un estereoscopio para ver las yemas de cada microtubérculo y tener mayor exactitud en el conteo, debido a que algunos microtubérculos eran pequeños lo que dificultaba contar las yemas de forma visual.

3.8 Diseño Experimental

El diseño experimental empleado para determinar las diferencias significativas fue completamente al azar con un arreglo factorial $3 \times 3 \times 3$, un total de 27 tratamientos y con 3 réplicas haciendo un total de 81 unidades experimentales.

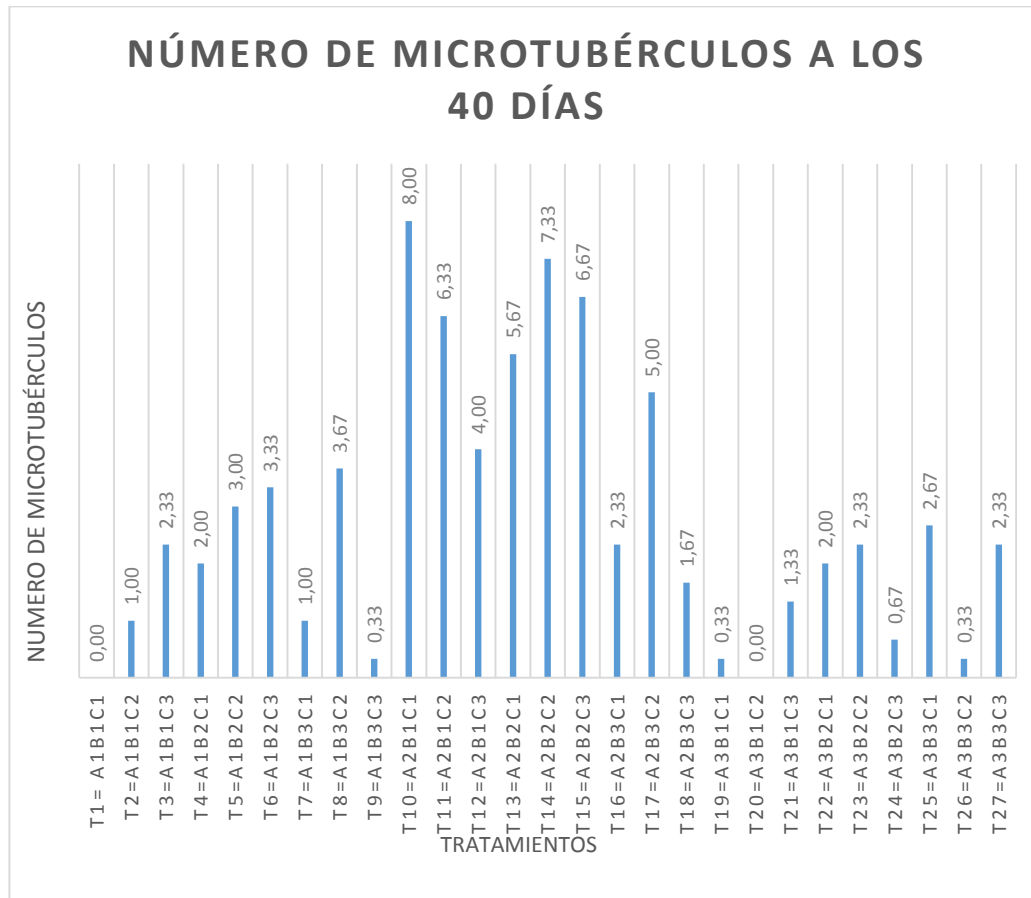
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 40 DÍAS

CUADRO N°1: NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 40 DÍAS

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
T1= A1B1C1	0	0	0	0	0,00
T2=A1B1C2	0	1	2	3	1,00
T3=A1B1C3	4	1	2	7	2,33
T4=A1B2C1	0	6	0	6	2,00
T5=A1B2C2	2	3	4	9	3,00
T6=A1B2C3	4	4	2	10	3,33
T7=A1B3C1	0	2	1	3	1,00
T8=A1B3C2	3	5	3	11	3,67
T9=A1B3C3	0	1	0	1	0,33
T10=A2B1C1	9	10	5	24	8,00
T11=A2B1C2	7	7	5	19	6,33
T12=A2B1C3	6	1	5	12	4,00
T13=A2B2C1	5	5	7	17	5,67
T14=A2B2C2	8	6	8	22	7,33
T15=A2B2C3	9	5	6	20	6,67
T16=A2B3C1	1	4	2	7	2,33
T17=A2B3C2	6	5	4	15	5,00
T18=A2B3C3	0	3	2	5	1,67
T19=A3B1C1	1	0	0	1	0,33
T20=A3B1C2	0	0	0	0	0,00
T21=A3B1C3	1	1	2	4	1,33
T22=A3B2C1	3	1	2	6	2,00
T23=A3B2C2	1	1	5	7	2,33
T24=A3B2C3	1	0	1	2	0,67
T25=A3B3C1	2	4	2	8	2,67
T26=A3B3C2	0	0	1	1	0,33
T27=A3B3C3	2	1	4	7	2,33
				227	

GRAFICA N°1: NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 40 DÍAS



Como se puede observar en el gráfico N°1, el tratamiento que presenta mayor número de microtubérculos es el N°10 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 0 horas luz y medio de cultivo sin citoquininas, este presentó una media de 8 microtubérculos, seguido del tratamiento N° 14 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo con BAP con una media de 7,33 número de microtubérculos y de igual manera el tratamiento N°15 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 8 horas luz y medio de cultivo con KIN con una media de 6,67 número de microtubérculos y finalmente el tratamiento N° 1 y tratamiento N° 20 que no tuberizaron.

4.1.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 40 DÍAS

CUADRO N°2: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/FOTOPERIODO

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
B1	10	55	5	70	2,59
B2	25	59	15	99	3,67
B3	15	27	16	58	2,15
Σ	50	141	36	227	
\bar{X}	1,85	5,22	1,33		

CUADRO N°3: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/MEDIO DE CULTIVO

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
C1	9	48	15	72	2,67
C2	23	56	8	87	3,22
C3	18	37	13	68	2,52
Σ	50	141	36	227	
\bar{X}	1,85	5,22	1,33		

CUADRO N°4: TABLA DE DOBLE ENTRADA FOTOPERIODO/MEDIO DE CULTIVO

	B1	B2	B3	Σ	\bar{X}
C1	25	29	18	72	2,67
C2	22	38	27	87	3,22
C3	23	32	13	68	2,52
Σ	70	99	58	227	
\bar{X}	2,59	3,67	2,15		

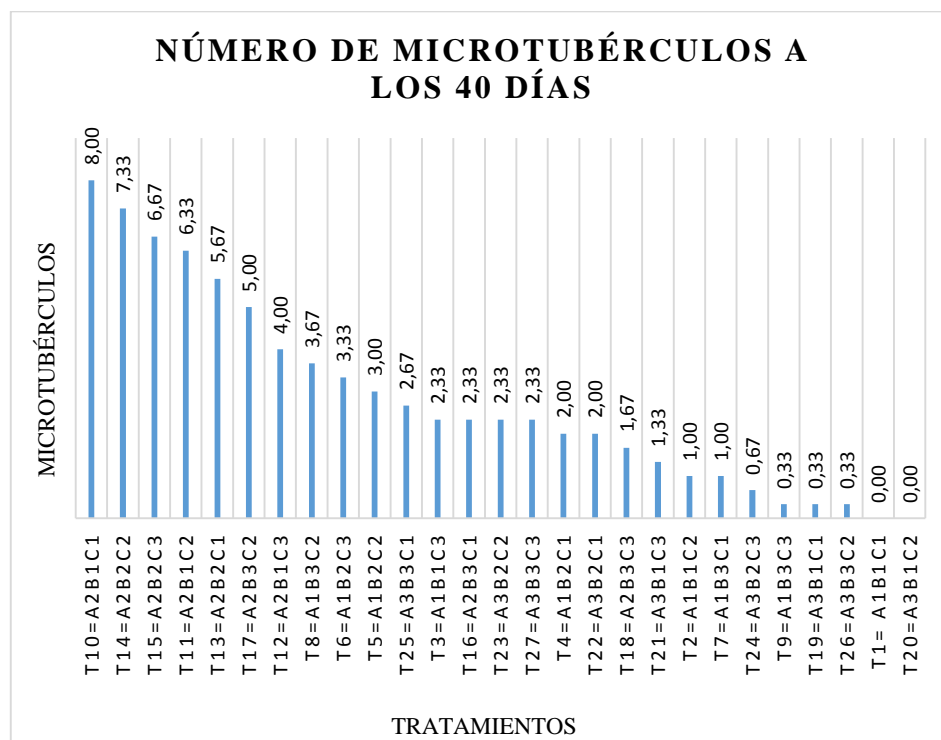
CUADRO N°5: ANVA

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft 1%	Ft 5%	
TOTAL	80	673,36					
TRAT	26	474,69	18,26	4,96	2,1	1,7	**
ERROR	54	198,67	3,68				
FA	2	324,17	162,09	44,06	5	3,17	**
FB	2	13,51	6,75	1,84	5	3,17	NS
FC	2	3,06	1,53	0,42	5	3,17	NS
FAB	4	59,46	14,86	4,04	3,6	2,5	**
FAC	4	23,90	5,98	1,62	3,6	2,5	NS
FBC	4	6,35	1,59	0,43	3,6	2,5	NS
FABC	8	44,25	5,53	1,50	2,8	2,1	NS

De acuerdo al ANVA se puede observar que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos, factor variedad y la interacción variedad/fotoperiodo, no encontrándose diferencias entre el factor medio de cultivo, factor fotoperiodo, la interacción fotoperiodo/medio de cultivo, interacción variedad/medio de cultivo.

4.1.2 PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS

GRÁFICA N°2: PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS



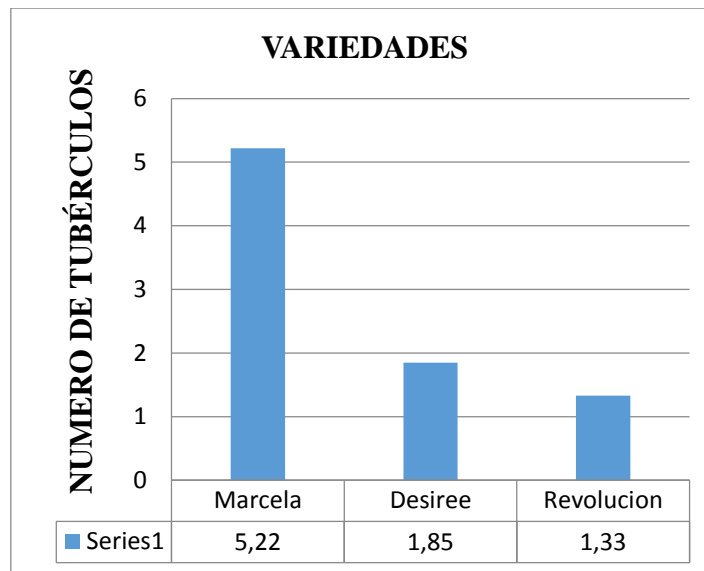
**CUADRO N°6: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

T10=A2B1C1	a
T14=A2B2C2	a b
T15=A2B2C3	a b
T11=A2B1C2	a b c
T13=A2B2C1	a b cd
T17=A2B3C2	b cde
T12=A2B1C3	c d e f
T8=A1B3C2	d e f g h
T6=A1B2C3	d e f g h
T5=A1B2C2	e f g h i
T25=A3B3C1	e f g h i
T3=A1B1C3	f g h i
T16=A2B3C1	f g h i
T23=A3B2C2	f g h i
T27=A3B3C3	f g h i
T4=A1B2C1	f g h i
T22=A3B2C1	f g h i
T18=A2B3C3	f g h i
T21=A3B1C3	f g h i
T2=A1B1C2	g h i
T7=A1B3C1	g h i
T24=A3B2C3	h i
T9=A1B3C3	i
T19=A3B1C1	i
T26=A3B3C2	i
T1= A1B1C1	j
T20=A3B1C2	j

De acuerdo a la prueba DUNCAN y como se demuestra en el cuadro N° 6, los tratamientos 10, 14, 15, 11 y 13 no presentan diferencias entre ellos, constituyéndose en los tratamientos que presentaron los mejores resultados en cuanto se refiere a la producción número de microtubérculos a los 40 días de iniciado el ensayo situándose en primer lugar el tratamiento 10 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de 0 horas luz y medio de cultivo sin citoquininas.

En el trabajo de investigación realizado por (Jaramillo, A. et al. 2003) quien logró los mejores promedios de microtubérculos con los tratamientos de oscuridad continua y medio de cultivo sin citoquininas y con BAP y la adición de CCC y concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación por que el tratamiento con fotoperiodo de 0 horas luz y medio de cultivo sin citoquininas dio los mejores promedios de microtubérculos seguido por las que contenían BAP.

GRAFICA N°3: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR VARIEDAD

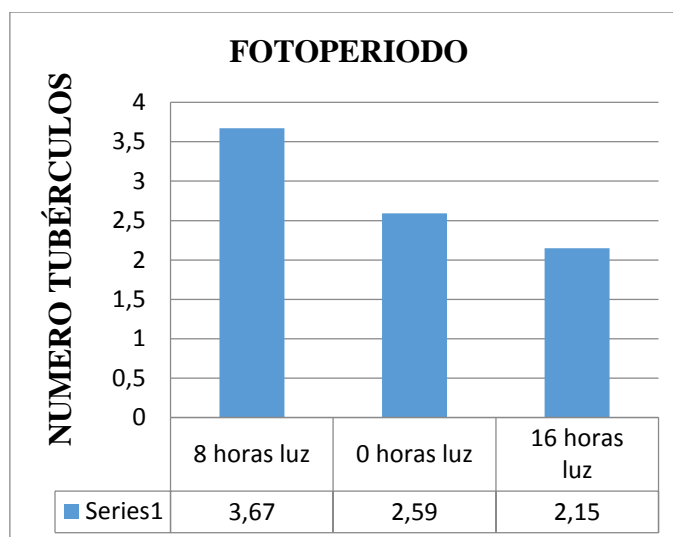


CUADRO N°7: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

A2	5.22 a
A1	1.85 b
A3	1.33 b

De acuerdo a la prueba DUNCAN realizada para el factor variedad se observa que la variedad Marcela presenta diferencias significativas con respecto a la tuberización de la variedad Desirée y la variedad Revolución. Las variedades que no presentaron diferencias en la tuberización fueron la variedad Desirée y la variedad Revolución, tal como se observa en el cuadro N°7.

GRAFICA N°4: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR FOTOPERIODO



CUADRO N°8: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

B2	3.67 a
B1	2.59 a
B3	2.15 a

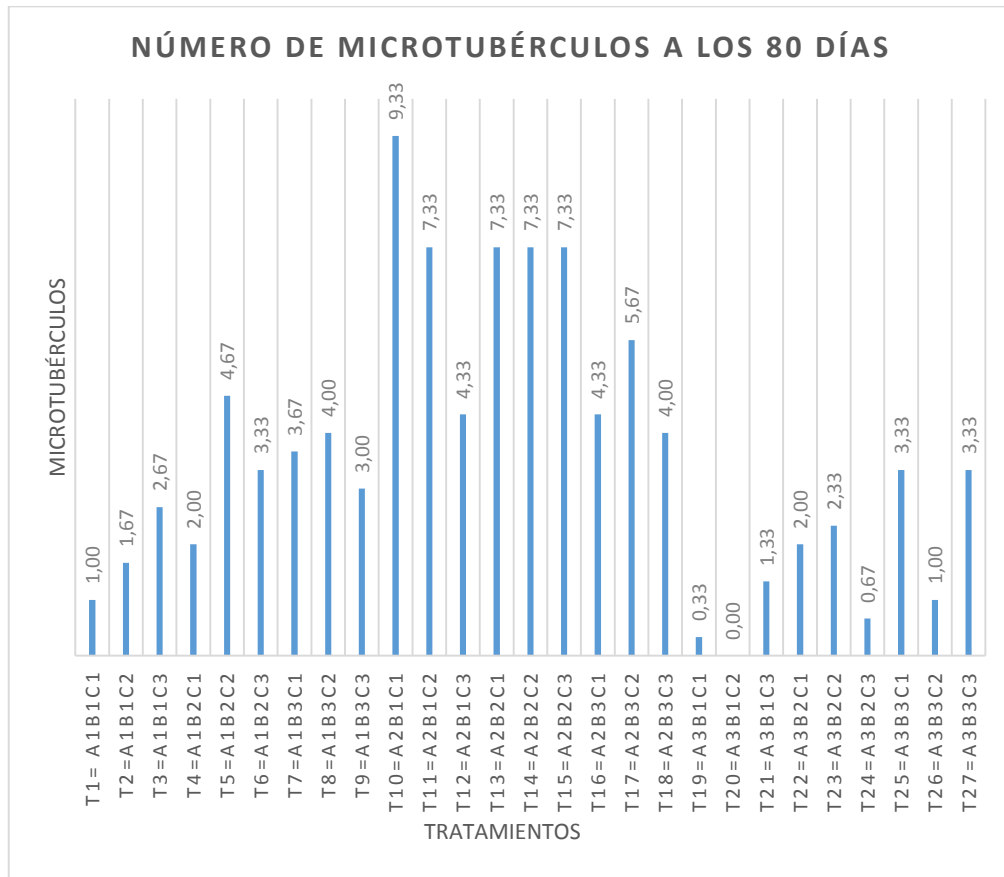
A través de la prueba DUNCAN realizada para el factor fotoperiodo se puede observar que no hay diferencia significativa entre los tres fotoperiodos con respecto al número de microtubérculos a los 40 días.

4.2 NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 80 DÍAS

CUADRO N°9: NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 80 DÍAS

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
T1=A1B1C1	2	1	0	3	1,00
T2=A1B1C2	1	1	3	5	1,67
T3=A1B1C3	4	2	2	8	2,67
T4=A1B2C1	0	6	0	6	2,00
T5=A1B2C2	5	4	5	14	4,67
T6=A1B2C3	4	4	2	10	3,33
T7=A1B3C1	2	5	4	11	3,67
T8=A1B3C2	3	5	4	12	4,00
T9=A1B3C3	3	5	1	9	3,00
T10=A2B1C1	11	11	6	28	9,33
T11=A2B1C2	8	9	5	22	7,33
T12=A2B1C3	7	1	5	13	4,33
T13=A2B2C1	12	4	6	22	7,33
T14=A2B2C2	8	6	8	22	7,33
T15=A2B2C3	10	5	7	22	7,33
T16=A2B3C1	2	7	4	13	4,33
T17=A2B3C2	8	5	4	17	5,67
T18=A2B3C3	3	5	4	12	4,00
T19=A3B1C1	1	0	0	1	0,33
T20=A3B1C2	0	0	0	0	0,00
T21=A3B1C3	1	1	2	4	1,33
T22=A3B2C1	3	1	2	6	2,00
T23=A3B2C2	1	1	5	7	2,33
T24=A3B2C3	1	0	1	2	0,67
T25=A3B3C1	2	4	4	10	3,33
T26=A3B3C2	0	1	2	3	1,00
T27=A3B3C3	3	1	6	10	3,33
				292	

GRÁFICA N°5: NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 80 DÍAS



La gráfica N°5 indica que el tratamiento que presenta mayor número de microtubérculos a los 80 días es el tratamiento N°10 que está constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de cero horas luz y medio de cultivo sin citoquininas que presento una media de 9,33 microtubérculos, seguido del tratamiento N°11 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de cero horas luz y medio de cultivo con BAP con una media de 7,33 microtuberculos al igual que los tratamientos N°13 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo sin hormonas, el tratamiento N°14 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo con BAP y el tratamiento N°15 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo con KIN.

4.2.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE MICROTUBÉRCULOS A LOS 80 DÍAS

**CUADRO N°10: TABLA DE DOBLE ENTRADA
VARIEDAD/FOTOPERIODO**

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
B1	16	63	5	84	3,11
B2	30	66	15	111	4,11
B3	32	42	23	97	3,59
Σ	78	171	43	292	
\bar{X}	2,89	6,33	1,59		

CUADRO N°11: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/MEDIO DE CULTIVO

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
C1	20	63	17	100	3,70
C2	31	61	10	102	3,78
C3	27	47	16	90	3,33
Σ	78	171	43	292	
\bar{X}	2,89	6,33	1,59		

CUADRO N°12: TABLA DE DOBLE ENTRADA FOTOPERIODO/MEDIO DE CULTIVO

	B1	B2	B3	Σ	\bar{X}
C1	32	34	34	100	3,70
C2	27	43	32	102	3,78
C3	25	34	31	90	3,33
Σ	84	111	97	292	
\bar{X}	3,11	4,11	3,59		

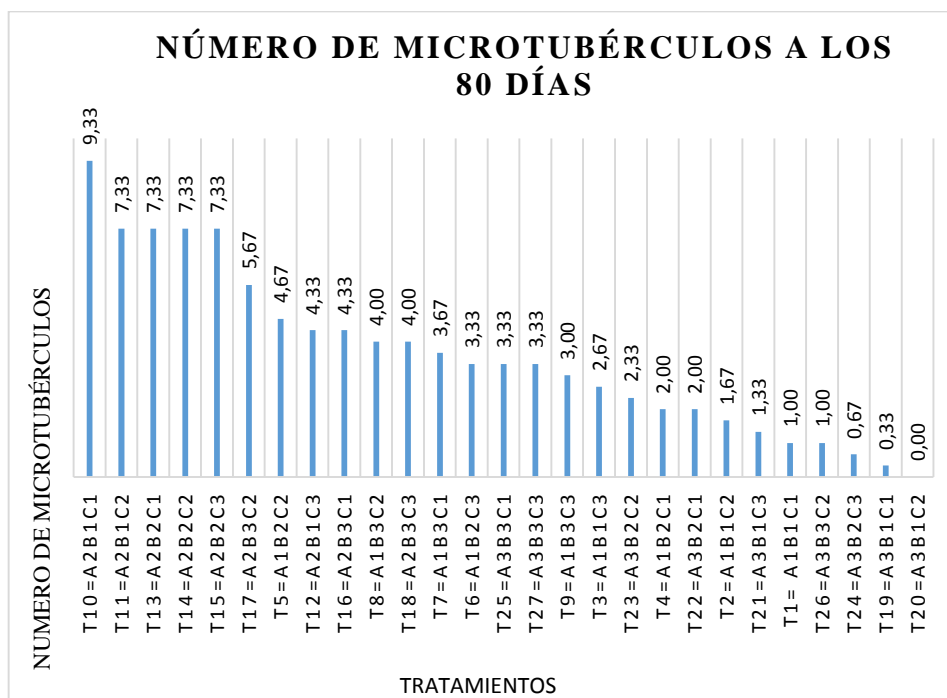
CUADRO N°13: ANVA

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft 1%	Ft 5%	
TOTAL	80	673,36					
TRAT	26	474,69	18,26	4,96	2,1	1,7	**
ERROR	54	198,67	3,68				
FA	2	324,17	162,09	44,06	5	3,17	**
FB	2	13,51	6,75	1,84	5	3,17	NS
FC	2	3,06	1,53	0,42	5	3,17	NS
FAB	4	59,46	14,86	4,04	3,6	2,5	**
FAC	4	23,90	5,98	1,62	3,6	2,5	NS
FBC	4	6,35	1,59	0,43	3,6	2,5	NS
FABC	8	44,25	5,53	1,50	2,8	2,1	NS

Como se puede observar en el cuadro N°13 no existe diferencia significativa para el factor fotoperiodo, factor medio de cultivo, interacción variedad/medio de cultivo, interacción fotoperiodo/medio de cultivo y la interacción variedad/fotoperiodo/medio de cultivo y existe diferencia altamente significativa para los tratamientos, factor variedad y la interacción variedad/fotoperiodo.

4.2.2 PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS

GRÁFICA N°6: PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS



**CUADRO N°14: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

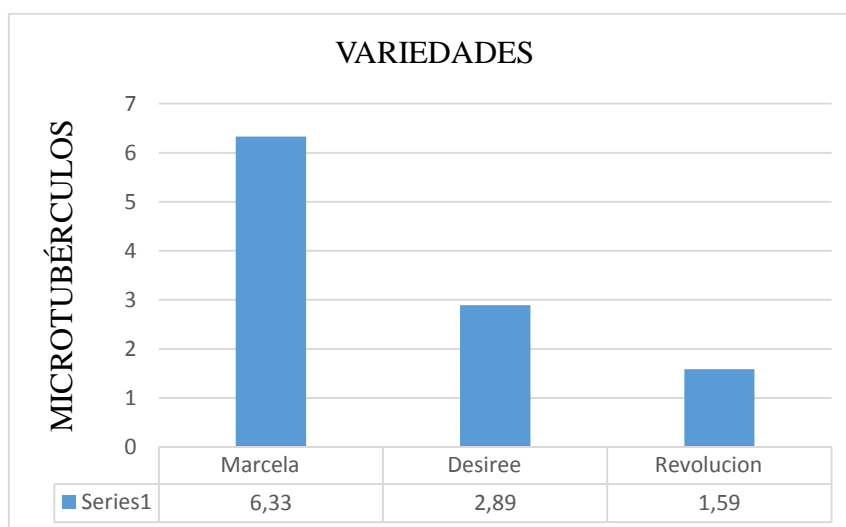
T10=A2B1C1	a
T11=A2B1C2	a b
T13=A2B2C1	a b
T14=A2B2C2	a b
T15=A2B2C3	a b
T17=A2B3C2	b c
T5=A1B2C2	b c d
T12=A2B1C3	b c d e
T16=A2B3C1	b c d e
T8=A1B3C2	b c d e f
T18=A2B3C3	b c d e f
T7=A1B3C1	c d e f g
T6=A1B2C3	c d e f g
T25=A3B3C1	c d e f g
T27=A3B3C3	c d e f g
T9=A1B3C3	c d e f g
T3=A1B1C3	c d e f g
T23=A3B2C2	c d e f g
T4=A1B2C1	d e f g
T22=A3B2C1	d e f g
T2=A1B1C2	d e f g
T21=A3B1C3	d e f g
T1= A1B1C1	e f g
T26=A3B3C2	e f g
T24=A3B2C3	e f g
T19=A3B1C1	f g
T20=A3B1C2	g

Como se puede observar y en el cuadro N°14 el tratamiento 10 presento el mejor resultado en cuanto se refiere a la producción de microtubérculos a los 80 días no variando con la primera evaluación realizada a los 40 días siendo no significativo con los tratamientos 11,13, 14 y el tratamiento 15.

De igual manera los datos obtenidos concuerdan con los datos obtenidos por (Valbuena, S. 2008) quien logro los mejores promedios de microtubérculos con los tratamientos de oscuridad continua de igual forma que el presente trabajo de

investigación se logró el mayor número de microtubérculos bajo el fotoperiodo de 0 horas luz.

GRÁFICA N°7: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR VARIEDAD



CUADRO N°15: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

Marcela	6,33 a
Desiree	2,89 b
Revolución	1,59 b

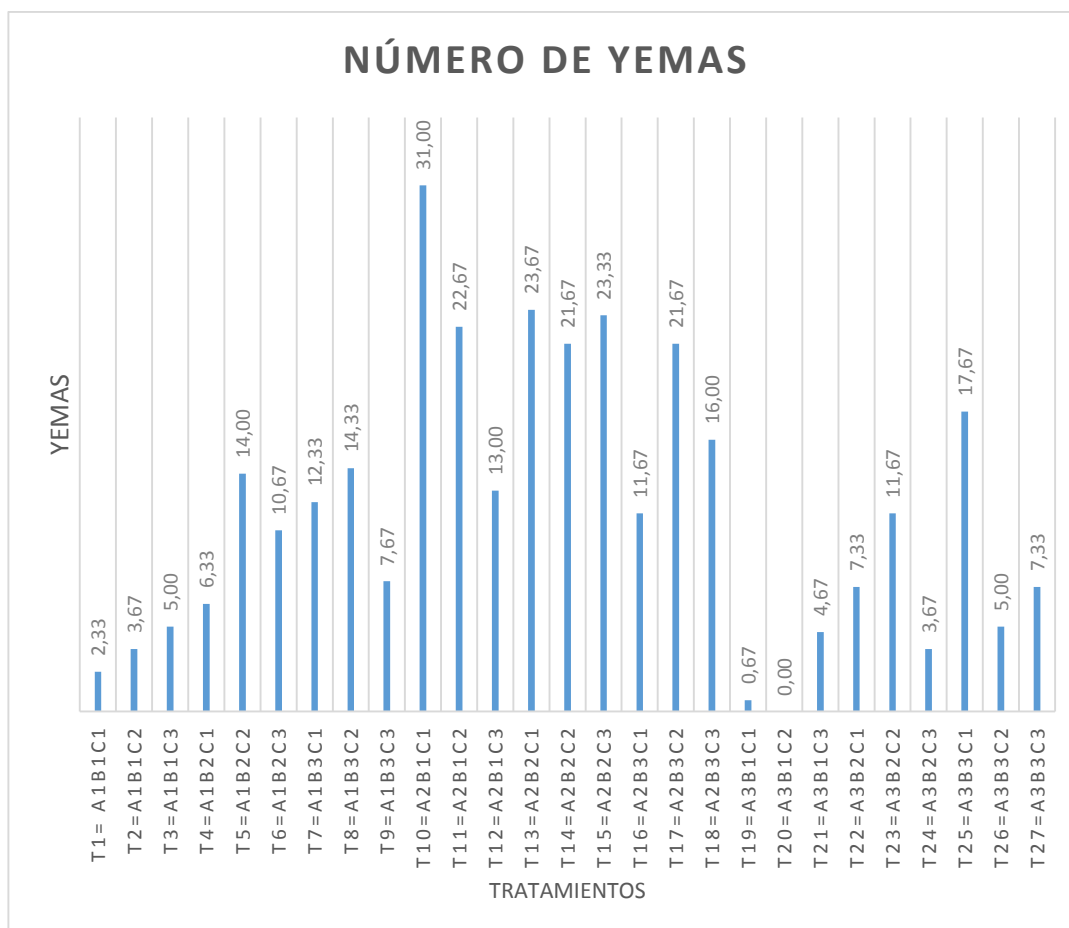
De acuerdo a la prueba DUNCAN realizada para el factor variedad se observa que la variedad Marcela presento diferencia significativa con respecto a la variedad Desiree y la variedad Revolución. Las variedades que no presentaron significancia fueron la variedad Desiree y la variedad Revolución tal como se observa en el cuadro N°15.

4.3 NÚMERO DE YEMAS

CUADRO N°16: NÚMERO DE YEMAS

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
T1= A1B1C1	4	3	0	7	2,33
T2=A1B1C2	2	3	6	11	3,67
T3=A1B1C3	8	5	2	15	5,00
T4=A1B2C1	0	19	0	19	6,33
T5=A1B2C2	15	15	12	42	14,00
T6=A1B2C3	14	13	5	32	10,67
T7=A1B3C1	4	18	15	37	12,33
T8=A1B3C2	14	15	14	43	14,33
T9=A1B3C3	6	14	3	23	7,67
T10=A2B1C1	43	34	16	93	31,00
T11=A2B1C2	27	28	13	68	22,67
T12=A2B1C3	19	4	16	39	13,00
T13=A2B2C1	45	12	14	71	23,67
T14=A2B2C2	28	25	12	65	21,67
T15=A2B2C3	39	17	14	70	23,33
T16=A2B3C1	4	22	9	35	11,67
T17=A2B3C2	29	19	17	65	21,67
T18=A2B3C3	15	19	14	48	16,00
T19=A3B1C1	2	0	0	2	0,67
T20=A3B1C2	0	0	0	0	0,00
T21=A3B1C3	4	3	7	14	4,67
T22=A3B2C1	11	3	8	22	7,33
T23=A3B2C2	3	4	28	35	11,67
T24=A3B2C3	5	0	6	11	3,67
T25=A3B3C1	11	22	20	53	17,67
T26=A3B3C2	0	7	8	15	5,00
T27=A3B3C3	6	12	4	22	7,33
				957	

GRÁFICA N°8: NÚMERO DE YEMAS



Como se puede observar en la gráfica N°8 el tratamiento que presenta mayor número de yemas es el tratamiento N°10 que está constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de cero horas luz y medio de cultivo sin hormonas que presentó una media de 31 yemas en segundo lugar el tratamiento N°13 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 8 horas luz y medio de cultivo sin hormonas con una media de 23,67 yemas seguido de los tratamientos N°15 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo con KIN y el tratamiento N°11 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de 0 horas luz y medio de cultivo con BAP.

4.3.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE NÚMERO DE YEMAS

**CUADRO N°17: TABLA DE DOBLE ENTRADA
VARIEDAD/FOTOPERIODO**

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
B1	33	200	16	249	9,22
B2	93	206	68	367	13,59
B3	103	148	90	341	12,63
Σ	229	554	174	957	
\bar{X}	8,48	20,52	6,44		

**CUADRO N°18: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/MEDIO DE
CULTIVO**

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
C1	63	199	77	339	12,56
C2	96	198	50	344	12,74
C3	70	157	47	274	10,15
Σ	229	554	174	957	
\bar{X}	8,48	20,52	6,44		

**CUADRO N°19: TABLA DE DOBLE ENTRADA FOTOPERIODO/MEDIO
DE CULTIVO**

	B1	B2	B3	Σ	\bar{X}
C1	102	112	125	339	12,56
C2	79	142	123	344	12,74
C3	68	113	93	274	10,15
Σ	249	367	341	957	
\bar{X}	9,22	13,59	12,63		

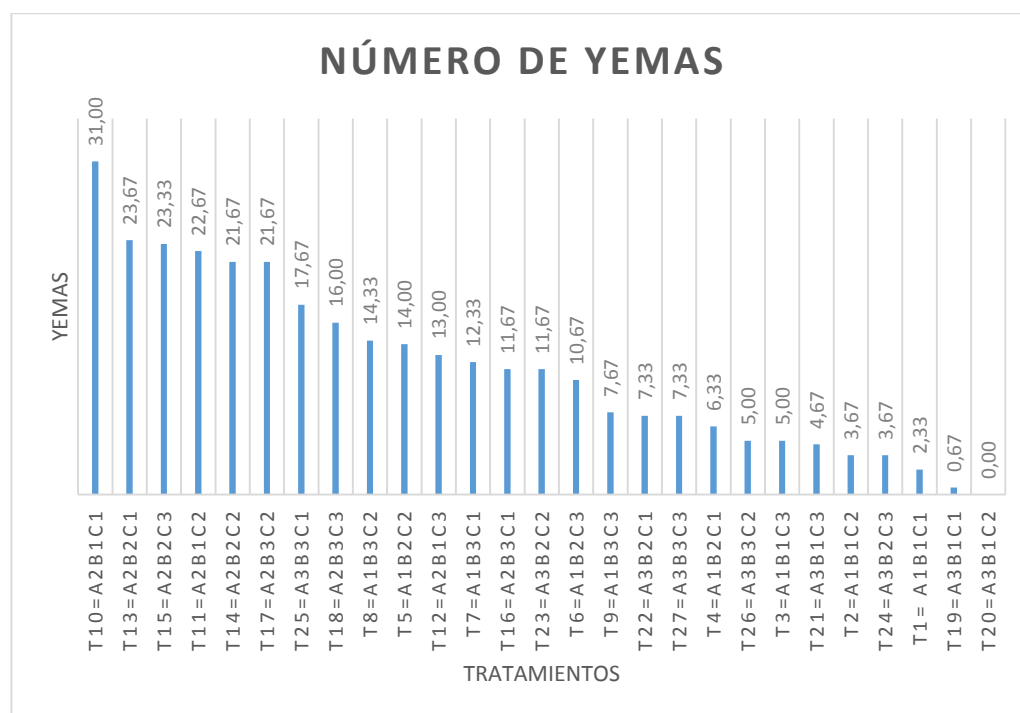
CUADRO N°20: ANVA

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft 1%	Ft 5%	
TOTAL	80	245,28					
TRAT	26	138,68	5,33	2,70	2,1	1,7	**
ERROR	54	106,60	1,97				
FA	2	20,25	10,12	5,13	5	3,17	**
FB	2	35,65	17,83	9,03	5	3,17	**
FC	2	2,80	1,40	0,71	5	3,17	NS
FAB	4	34,37	8,59	4,35	3,6	2,5	**
FAC	4	10,11	2,53	1,28	3,6	2,5	NS
FBC	4	9,42	2,36	1,19	3,6	2,5	NS
FABC	8	26,08	3,26	1,65	2,8	2,1	NS

Como se puede observar en el cuadro N°20 no existe diferencia significativa para el factor medio de cultivo, interacción variedad/medio de cultivo, interacción fotoperiodo/medio de cultivo y la interacción variedad/fotoperiodo/medio de cultivo y existe diferencia altamente significativa para los tratamientos, factor variedad, factor fotoperiodo y la interacción variedad/fotoperiodo.

4.3.2 PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS

GRÁFICA N°9: PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS



**CUADRO N°21: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

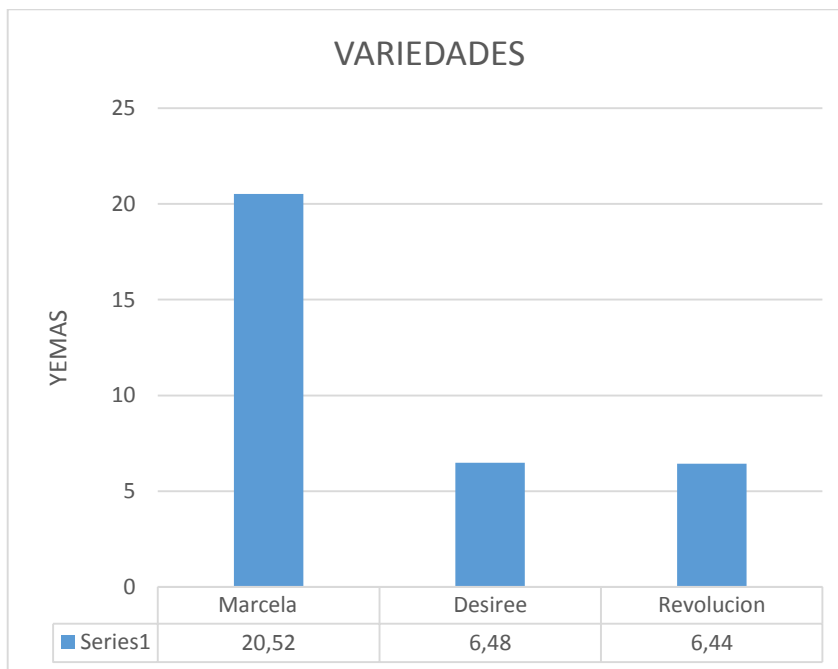
T10=A2B1C1	a
T13=A2B2C1	a b
T15=A2B2C3	a b
T11=A2B1C2	a b
T14=A2B2C2	a b
T17=A2B3C2	a b c
T25=A3B3C1	b c d
T18=A2B3C3	b c d e
T8=A1B3C2	b c d e f
T5=A1B2C2	b c d e f
T12=A2B1C3	b c d e f
T7=A1B3C1	b c d e f
T16=A2B3C1	b c d e f
T23=A3B2C2	b c d e f
T6=A1B2C3	b c d e f
T9=A1B3C3	c d e f
T22=A3B2C1	c d e f
T27=A3B3C3	c d e f
T4=A1B2C1	d e f
T26=A3B3C2	d e f
T3=A1B1C3	d e f
T21=A3B1C3	d e f
T2=A1B1C2	d e f
T24=A3B2C3	d e f
T1= A1B1C1	e f
T19=A3B1C1	F
T20=A3B1C2	F

Según los resultados de la prueba DUNCAN y como se muestra en el cuadro N°21 se puede observar que los tratamiento N° 10,13, 15, 11 y 14 no son significativos situándose en primer lugar el tratamiento 10 que presenta el resultado más alto de número de yemas.

De acuerdo a los datos obtenidos por (Jaramillo, A. et al. 2003) con el fotoperiodo de 8 y 0 horas luz obtuvo los microtuberculos con mayor número de yemas, al igual que

el presente trabajo se obtuvo mayor número de yemas de igual manera con los tratamientos de 0 y 8 horas luz.

GRÀFICA N°10: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR VARIEDAD

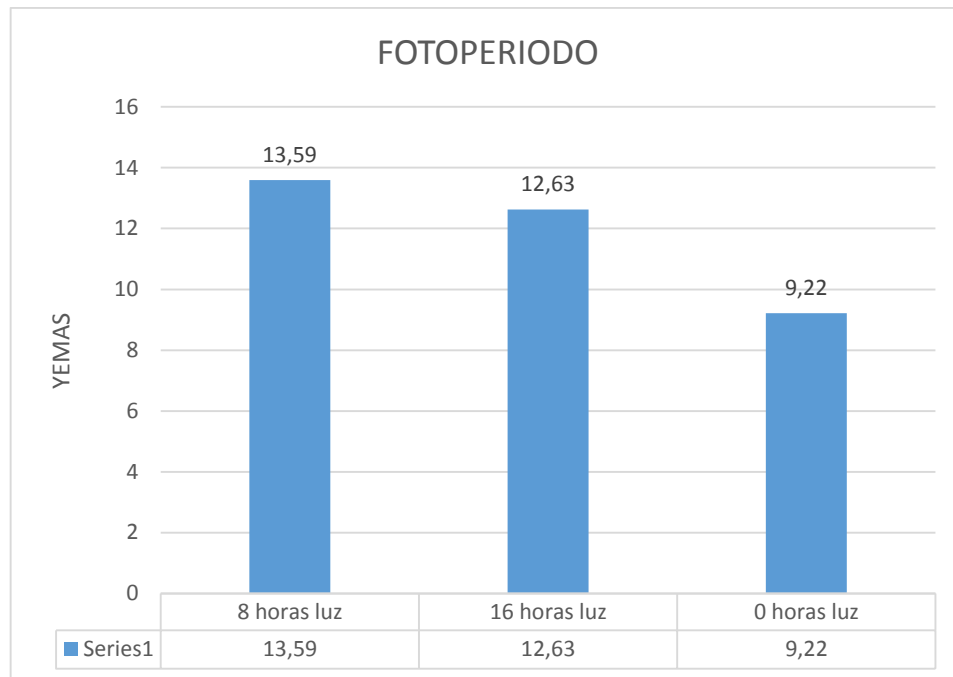


CUADRO N°22: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

A2	20,52 a
A1	6,48 b
A3	6,44 b

Según los resultados de la prueba DUNCAN se puede observar que la variedad Marcela es significativa con respecto a la variedad Desirée y la variedad Revolución, siendo la variedad Marcela la que presentó los mayores números de yemas de los microtubérculos.

GRÁFICA N°11: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR FOTOPERIODO



CUADRO N° 23: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

B2	13,59 a
B3	12,63 a
B1	9,22 a

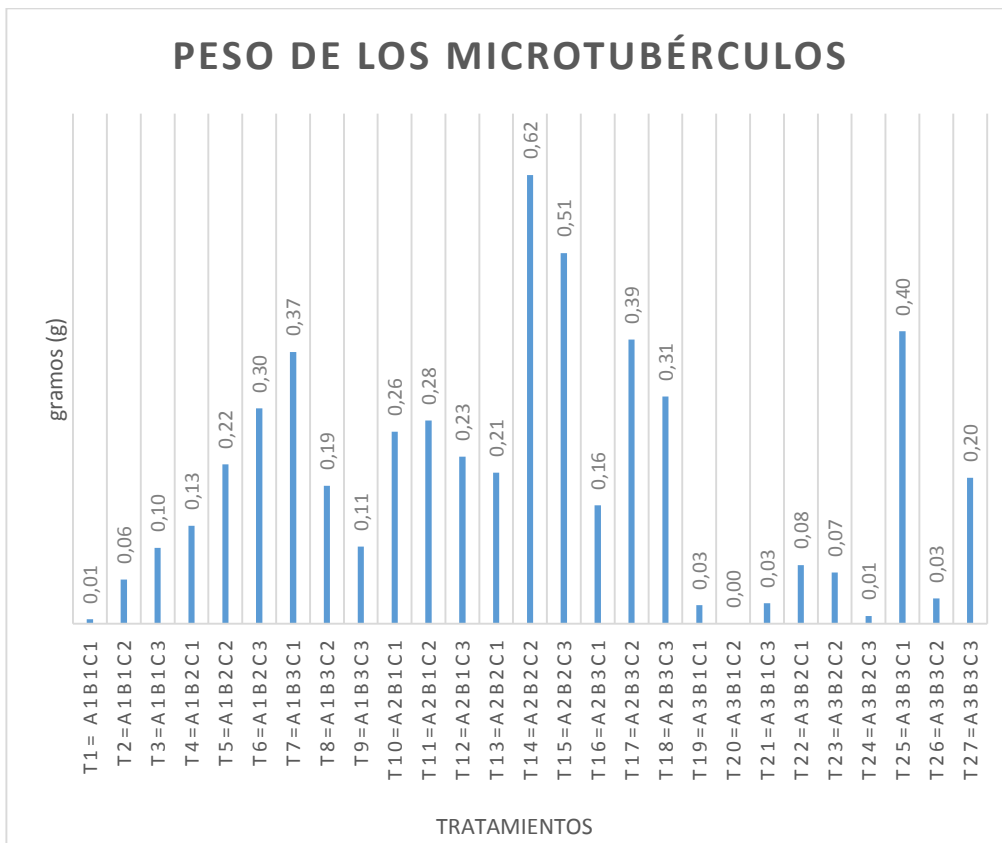
De acuerdo a los resultados de la prueba de DUNCAN para el factor fotoperiodo se puede observar no existe diferencia significativa entre los tres fotoperiodos los cuales no difieren en la formación de yemas de los microtubérculos, situándose en primer lugar el fotoperiodo de 8 horas luz.

4.4 PESO DE LOS MICROTUBÉRCULOS

CUADRO N° 24: PESO DE LOS MICROTUBÉRCULOS

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
T1= A1B1C1	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01
T2=A1B1C2	0,02	0,09	0,07	0,18	0,06
T3=A1B1C3	0,14	0,06	0,12	0,31	0,10
T4=A1B2C1	0,00	0,40	0,00	0,40	0,13
T5=A1B2C2	0,12	0,23	0,31	0,66	0,22
T6=A1B2C3	0,39	0,30	0,20	0,89	0,30
T7=A1B3C1	0,13	0,56	0,43	1,12	0,37
T8=A1B3C2	0,15	0,10	0,32	0,57	0,19
T9=A1B3C3	0,06	0,21	0,05	0,32	0,11
T10=A2B1C1	0,13	0,42	0,24	0,79	0,26
T11=A2B1C2	0,42	0,17	0,25	0,84	0,28
T12=A2B1C3	0,23	0,08	0,38	0,69	0,23
T13=A2B2C1	0,28	0,15	0,20	0,62	0,21
T14=A2B2C2	1,05	0,29	0,51	1,85	0,62
T15=A2B2C3	0,48	0,54	0,51	1,53	0,51
T16=A2B3C1	0,21	0,12	0,16	0,49	0,16
T17=A2B3C2	0,26	0,64	0,26	1,17	0,39
T18=A2B3C3	0,10	0,31	0,53	0,94	0,31
T19=A3B1C1	0,08	0,00	0,00	0,08	0,03
T20=A3B1C2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T21=A3B1C3	0,04	0,02	0,03	0,08	0,03
T22=A3B2C1	0,11	0,04	0,09	0,24	0,08
T23=A3B2C2	0,05	0,05	0,11	0,21	0,07
T24=A3B2C3	0,01	0,00	0,02	0,03	0,01
T25=A3B3C1	0,36	0,53	0,31	1,20	0,40
T26=A3B3C2	0,00	0,07	0,04	0,10	0,03
T27=A3B3C3	0,19	0,10	0,32	0,60	0,20
				15,92	

GRÁFICA N°12: PESO DE MICROTUBÉRCULOS



Como se puede observar en la gráfica N°12 el tratamiento que presenta el mayor peso de microtubérculos es el tratamiento N°14 que está constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 8 horas luz y medio de cultivo con BAP que presento una media de 0,62 gramos en segundo lugar se encuentra el tratamiento N°15 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de 8 horas luz y medio de cultivo con KIN con una media de 0,51 gramos seguidamente el tratamiento N°25 compuesto por la variedad Revolución, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo sin hormonas y posteriormente el tratamiento N°17 conformado por la variedad Marcela, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo con BAP.

4.4.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE PESO DE MICROTUBÉRCULOS

**CUADRO N°25: TABLA DE DOBLE ENTRADA
VARIEDAD/FOTOPERIODO**

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
B1	0,51	2,31	0,16	2,99	0,11
B2	1,95	4,00	0,48	6,43	0,24
B3	2,00	2,59	1,91	6,51	0,24
Σ	4,47	8,90	2,56	15,92	
\bar{X}	0,17	0,33	0,09		

CUADRO N°26: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/MEDIO DE CULTIVO

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
C1	1,54	1,90	1,52	4,96	0,18
C2	1,41	3,85	0,31	5,58	0,21
C3	1,52	3,15	0,72	5,38	0,20
Σ	4,47	8,90	2,56	15,92	
\bar{X}	0,17	0,33	0,09		

CUADRO N°27: TABLA DE DOBLE ENTRADA FOTOPERIODO/MEDIO DE CULTIVO

	B1	B2	B3	Σ	\bar{X}
C1	0,89	1,27	2,81	4,96	0,18
C2	1,02	2,71	1,84	5,58	0,21
C3	1,09	2,45	1,85	5,38	0,20
Σ	2,99	6,43	6,51	15,92	
\bar{X}	0,11	0,24	0,24		

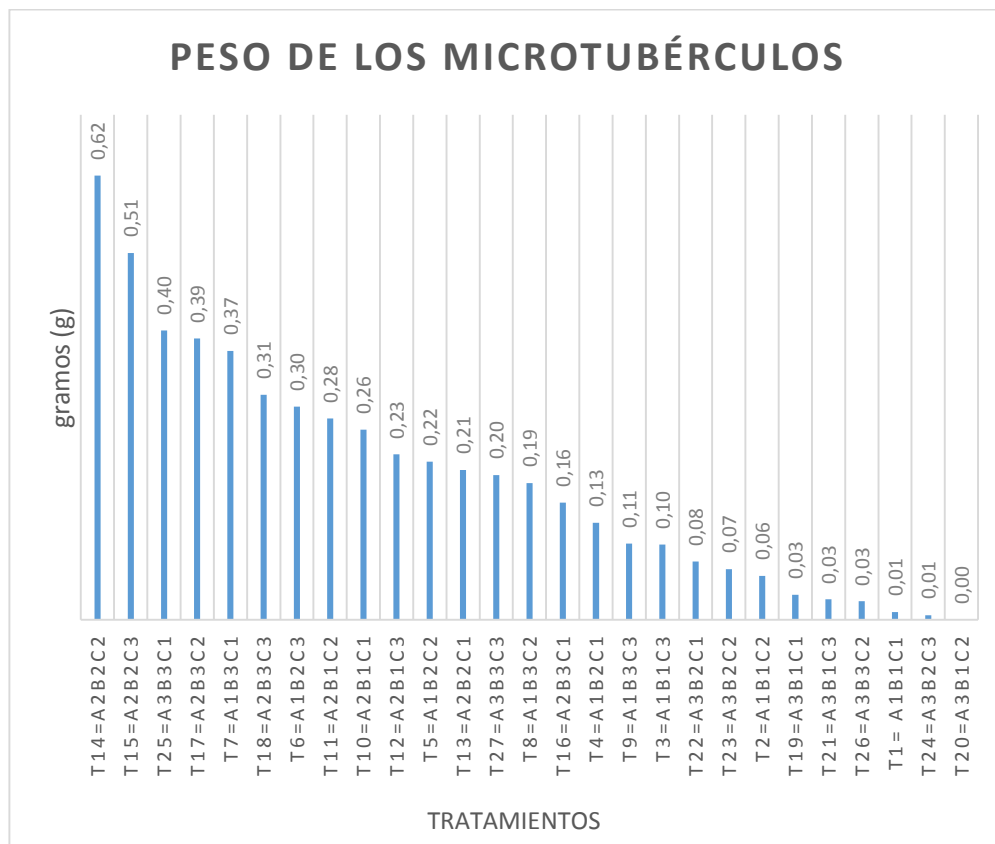
CUADRO N°28: ANVA

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft 1%	Ft 5%	
TOTAL	80	3,03					
TRAT	26	2,05	0,08	28,96	2,1	1,7	**
ERROR	54	0,99	0,02				
FA	2	0,79	0,39	144,52	5	3,17	**
FB	2	0,30	0,15	54,93	5	3,17	**
FC	2	0,01	0,00	1,34	5	3,17	NS
FAB	4	0,23	0,06	21,36	3,6	2,5	**
FAC	4	0,30	0,07	27,17	3,6	2,5	**
FBC	4	0,20	0,05	17,94	3,6	2,5	**
FABC	8	0,23	0,03	10,70	2,8	2,1	**

Como se puede observar en el cuadro ANVA existe diferencia altamente significativa para todas fuente de variación, excepto para el factor medio de cultivo.

4.4.2 PRUEBA DE DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS

GRÁFICA N°13: PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS



**CUADRO N°29: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

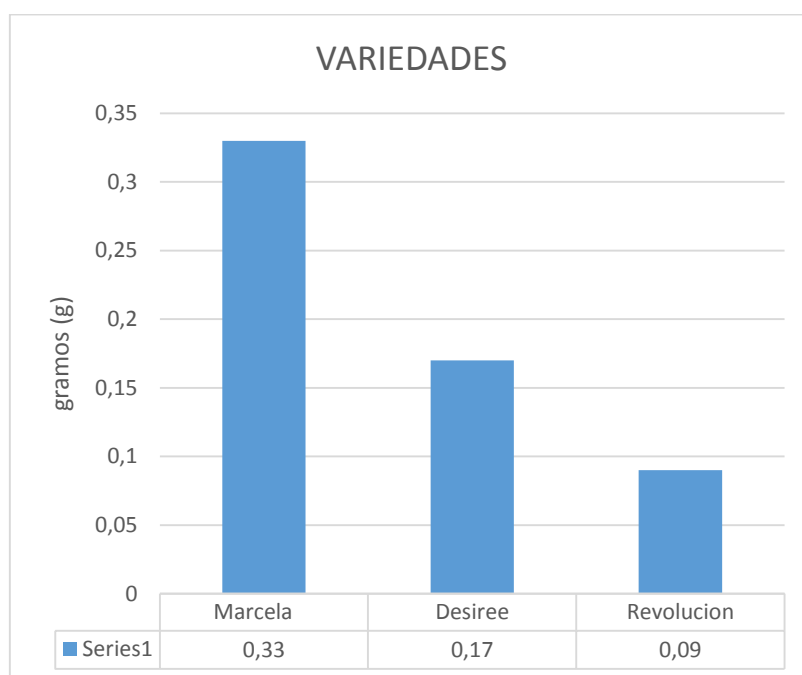
T14=A2B2C2	a
T15=A2B2C3	a b
T25=A3B3C1	a b c
T17=A2B3C2	a b c d
T7=A1B3C1	b c d
T18=A2B3C3	b c d e
T6=A1B2C3	b c d e f
T11=A2B1C2	b c e f g
T10=A2B1C1	c d e f g h
T12=A2B1C3	c d e f g h
T5=A1B2C2	c d e f g h
T13=A2B2C1	c d e f g h
T27=A3B3C3	c d e f g h
T8=A1B3C2	c d e f g h
T16=A2B3C1	c d e f g h
T4=A1B2C1	d e f g h
T9=A1B3C3	e f g h
T3=A1B1C3	e f g h
T22=A3B2C1	e f g h
T23=A3B2C2	e f g h
T2=A1B1C2	e f g h
T19=A3B1C1	f g h
T21=A3B1C3	g h
T26=A3B3C2	g h
T1= A1B1C1	g h
T24=A3B2C3	g h
T20=A3B1C2	h

De acuerdo a los resultados de la prueba DUNCAN se puede observar que el tratamiento 14, 15, 25 y 17 no presentan significancia entre ellos siendo el mejor resultado en cuanto al peso de los microtubérculos obteniendo el primer lugar el tratamiento 14 compuesto por la variedad Marcela, fotoperiodo de ocho horas luz y medio de cultivo con BAP.

Estos datos se asemejan a los obtenidos por (Lugo, G. 2009) quien logró los pesos de microtubérculos más altos con un promedio de 0.68 g utilizando la adición a los medios de cultivo la citoquinina BAP en el desarrollo de su trabajo.

Según (DODDS et al. 1992); CARHUAZ et al. 1991) citado por (JARA, G. 1996) quienes señalan que para considerar a los tubérculos *in vitro* en un programa de multiplicación de semillas el peso de los microtubérculos debe fluctuar entre valores mayores de 45-50 mg respectivamente.

GRÁFICA N°14: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR VARIEDAD

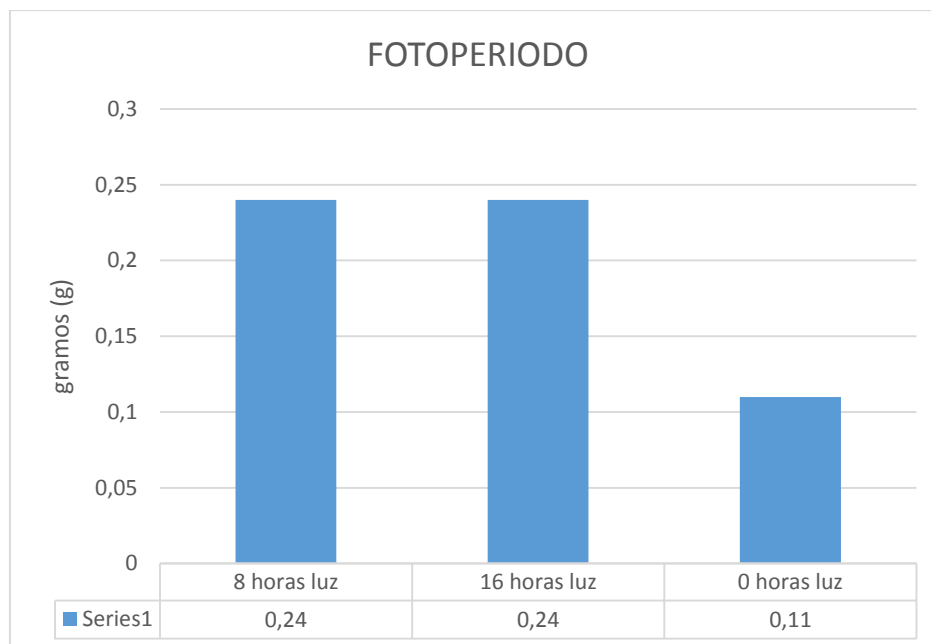


CUADRO N°30: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

A2	0,33 a
A1	0,17 b
A3	0,09 b

De acuerdo al cuadro N°30 se puede observar que la variedad Marcela es significativa presentando el mejor resultado en cuanto se refiere al peso de los microtubérculos. La variedad Desirée y la variedad Revolución no presentan diferencias significativas en lo que se refiere al peso de los microtubérculos.

GRÁFICA N°15: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR FOTOPERIODO



CUADRO N°31: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5% DE PROBABILIDAD

B2	0,24 a
B3	0,24 a
B1	0,11 a

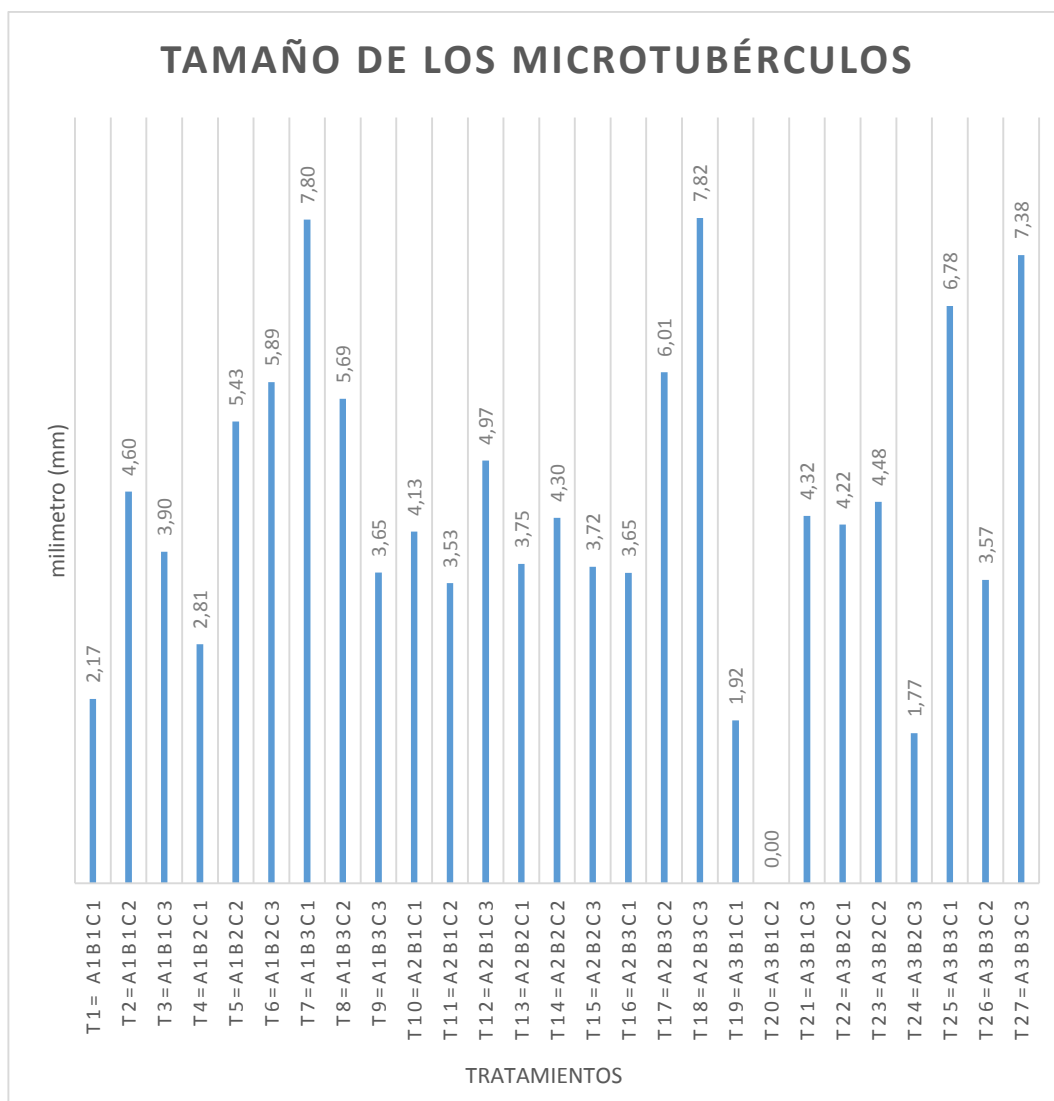
De acuerdo a los resultados de la prueba DUNCAN para el factor fotoperiodo se puede observar no existe diferencia significativa entre los tres fotoperiodos los cuales no difieren en el peso de los microtubérculos, situándose en primer lugar el fotoperiodo de 8 y 16 horas luz.

4.5 TAMAÑO DE LOS MICROTUBÉRCULOS

CUADRO N°32: TAMAÑO DE LOS MICTOTUBÉRCULOS

TRATAMIENTOS	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
T1= A1B1C1	2,95	3,55	0	6,5	2,17
T2=A1B1C2	3,1	6,1	4,61	13,81	4,60
T3=A1B1C3	4,77	3,47	3,45	11,69	3,90
T4=A1B2C1	0	8,43	0	8,43	2,81
T5=A1B2C2	4,73	6,62	4,93	16,28	5,43
T6=A1B2C3	6,41	5,71	5,55	17,67	5,89
T7=A1B3C1	6,55	8,2	8,65	23,4	7,80
T8=A1B3C2	5,88	5,05	6,15	17,08	5,69
T9=A1B3C3	3,45	2,51	5	10,96	3,65
T10=A2B1C1	3,7	4,1	4,6	12,4	4,13
T11=A2B1C2	4,11	3,21	3,26	10,58	3,53
T12=A2B1C3	4,52	5,2	5,19	14,91	4,97
T13=A2B2C1	1,09	5,92	4,25	11,26	3,75
T14=A2B2C2	5,11	4,64	3,14	12,89	4,30
T15=A2B2C3	3,89	3,11	4,16	11,16	3,72
T16=A2B3C1	3,47	3,62	3,86	10,95	3,65
T17=A2B3C2	4,4	5,46	8,16	18,02	6,01
T18=A2B3C3	6,53	7,95	8,97	23,45	7,82
T19=A3B1C1	5,75	0	0	5,75	1,92
T20=A3B1C2	0	0	0	0	0,00
T21=A3B1C3	4,65	5,45	2,85	12,95	4,32
T22=A3B2C1	4,4	4,15	4,1	12,65	4,22
T23=A3B2C2	3,95	4,45	5,05	13,45	4,48
T24=A3B2C3	3,15	0	2,15	5,3	1,77
T25=A3B3C1	9,1	5,88	5,37	20,35	6,78
T26=A3B3C2	0	7,2	3,5	10,7	3,57
T27=A3B3C3	9,15	8,4	4,6	22,15	7,38
				354,74	

GRÁFICA N°16: TAMAÑO DE LOS MICROTUBÉRCULOS



Como se puede observar en el gráfico N°16 el tratamiento que presenta mayor tamaño de microtubérculos es el N°18 que está constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo con KIN con una media de 7,82 milímetros, es segundo lugar se encuentra el tratamiento N°7 compuesto por la variedad Desirée, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo sin hormonas, y en tercer lugar se puede observar al tratamiento N° 27 compuesto por la variedad Revolución, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo con KIN.

4.5.1 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE TAMAÑO DE LOS MICROTUBÉRCULOS

**CUADRO N°33: TABLA DE DOBLE ENTRADA
VARIEDAD/FOTOPERIODO**

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
B1	32	37,89	18,7	88,59	3,28
B2	42,38	35,31	31,4	109,09	4,04
B3	51,44	52,42	53,2	157,06	5,82
Σ	125,82	125,62	103,3	354,74	
\bar{X}	4,66	4,65	3,83		

CUADRO N° 34: TABLA DE DOBLE ENTRADA VARIEDAD/MEDIO DE CULTIVO

	A1	A2	A3	Σ	\bar{X}
C1	38,33	34,61	38,75	111,69	4,14
C2	47,17	41,49	24,15	112,81	4,18
C3	40,32	49,52	40,4	130,24	4,82
Σ	125,82	125,62	103,3	354,74	
\bar{X}	4,66	4,65	3,83		

CUADRO N° 35: TABLA DE DOBLE ENTRADA FOTOPERIODO/MEDIO DE CULTIVO

	B1	B2	B3	Σ	\bar{X}
C1	24,65	32,34	54,7	111,69	4,14
C2	24,39	42,62	45,8	112,81	4,18
C3	39,55	34,13	56,56	130,24	4,82
Σ	88,59	109,09	157,06	354,74	
\bar{X}	3,28	4,04	5,82		

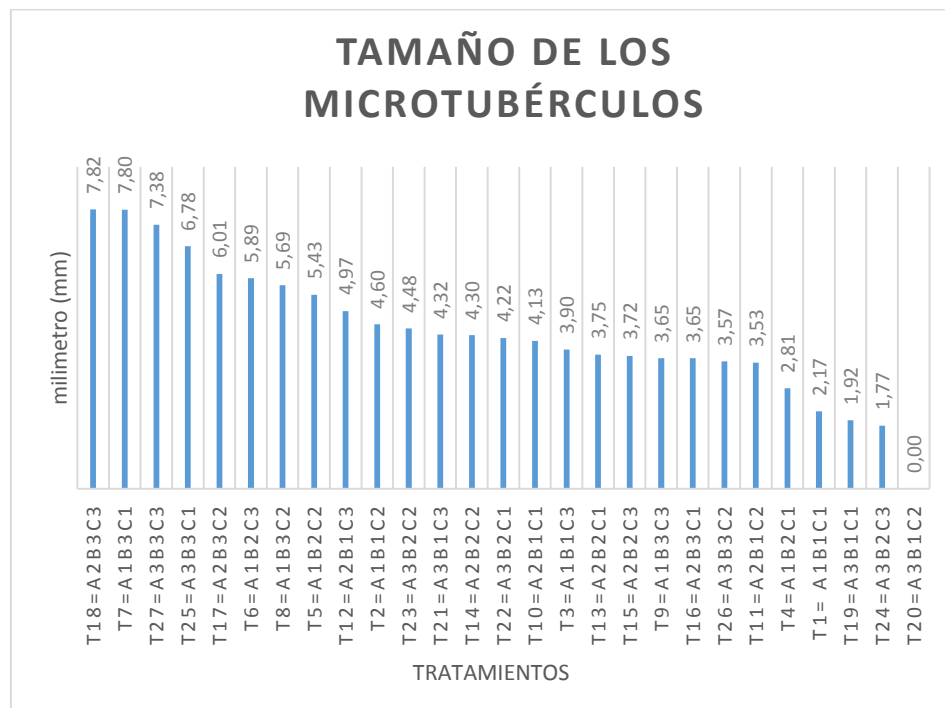
CUADRO N°36: ANVA

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft 1%	Ft 5%	
TOTAL	80	441,63					
TRAT	26	268,54	10,33	3,22	2,1	1,7	**
ERROR	54	173,08	3,21				
FA	2	12,41	6,21	1,94	5	3,17	NS
FB	2	91,48	45,74	14,27	5	3,17	**
FC	2	8,01	4,01	1,25	5	3,17	NS
FAB	4	16,12	4,03	1,26	3,6	2,5	NS
FAC	4	26,92	6,73	2,10	3,6	2,5	NS
FBC	4	22,78	5,69	1,78	3,6	2,5	NS
FABC	8	90,83	11,35	3,54	2,8	2,1	**

Como se puede observar en el Cuadro ANVA existe diferencia significativa para los tratamientos, factor fotoperiodo y la interacción variedad/fotoperiodo/medio de cultivo y no existe diferencia para el factor variedad, factor medio de cultivo, interacción variedad/medio de cultivo, interacción fotoperiodo/medio de cultivo y la interacción variedad/fotoperiodo.

4.5.2 PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS

GRÁFICA N°17: PRUEBA DUNCAN PARA LOS TRATAMIENTOS



**CUADRO N°37: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

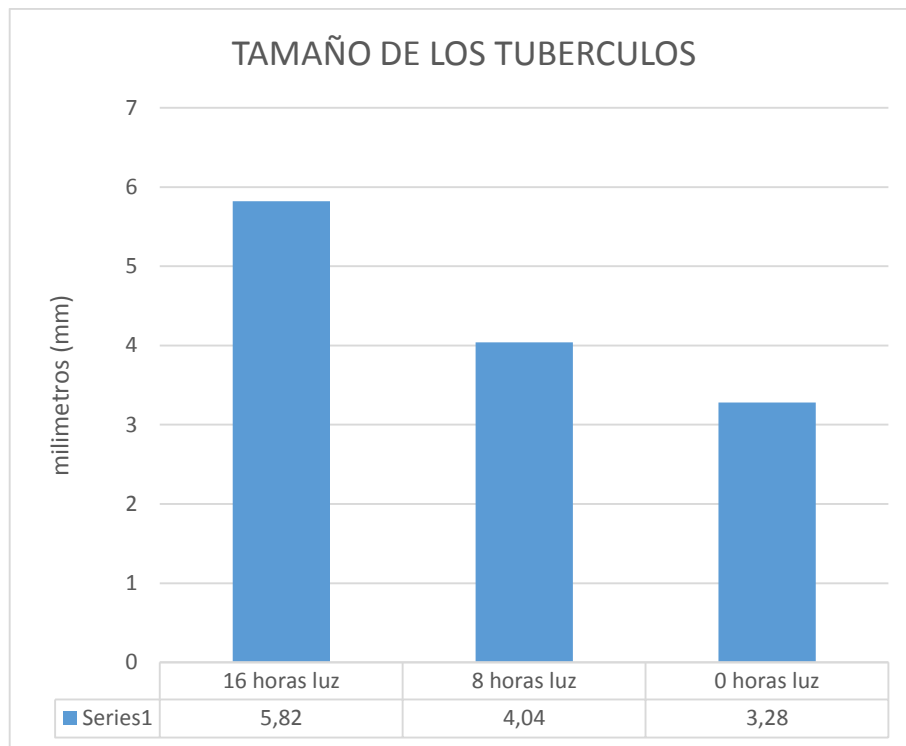
T18=A2B3C3	a
T7=A1B3C1	a b
T27=A3B3C3	a b
T25=A3B3C1	a b c
T17=A2B3C2	a b c d
T6=A1B2C3	a b c d
T8=A1B3C2	a b c d
T5=A1B2C2	a b c d e
T12=A2B1C3	a b c d e f
T2=A1B1C2	b c d e f
T23=A3B2C2	b c d e f
T21=A3B1C3	b c d e f
T14=A2B2C2	b c d e f
T22=A3B2C1	b c d e f
T10=A2B1C1	c d e f
T3=A1B1C3	c d e f
T13=A2B2C1	c d e f
T15=A2B2C3	c d e f
T9=A1B3C3	c d e f
T16=A2B3C1	c d e f
T26=A3B3C2	c d e f g
T11=A2B1C2	c d e f g
T4=A1B2C1	d e f g
T1= A1B1C1	e f g
T19=A3B1C1	f g
T24=A3B2C3	f g
T20=A3B1C2	g

De acuerdo al cuadro N°37 se puede observar que el tratamiento N°18, 27, 25, 17, 6, 8, 5 y el tratamiento N°12 no presentan diferencias significativas entre ellos representando los valores más altos en el tamaño de los microtubérculos obteniendo el primer lugar el tratamiento N°18 constituido por la variedad Marcela, fotoperiodo de 16 horas luz y medio de cultivo con KIN.

Según (DODDS et al. 1992); (CARHUAZ et al. 1991) citado por (JARA, G. 1996) quienes señalan que para considerar a los tubérculos *in vitro* en un programa de multiplicación de semillas el tamaño de los microtubérculos debe fluctuar entre valores mayores de 3-4 mm.

(Valbuena, S. 2008) al realizar el análisis estadístico en su trabajo de investigación en la ciudad de Colombia permitió obtener un promedio entre los genotipos y se encontró que el genotipo Diacol capiro presentó los valores más altos con un valor de 7,74 mm. Este valor coincide con el presente trabajo de investigación debido a que se obtuvo con la variedad Marcela un promedio de diámetro de 7,82.

GRÁFICA N°18: PRUEBA DUNCAN PARA EL FACTOR FOTOPERIODO



**CUADRO N°38: LETRAS IGUALES SEGÚN DUNCAN NO DIFIEREN A 5%
DE PROBABILIDAD**

B3	5,82 a
B2	4,04 a
B1	3,28 a

Según la prueba de DUNCAN para el factor fotoperiodo se puede observar que no existen diferencias significativas entre los tres fotoperiodos obteniendo el promedio más alto de tamaño de los microtubérculos el fotoperiodo de 16 horas luz.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Tomando en cuenta en número de microtubérculos, peso, y número de yemas la variedad Marcela presenta la mayor respuesta a la microtuberización *in vitro* obteniendo diferencias significativas en comparación a las variedades Desirée y Revolución.
- En cuanto se refiere a la tuberización *in vitro* de las tres variedades papa no hubo mucha diferencia entre los tres medios de tuberización que contenían diferentes concentraciones de fitohormonas dando como resultado no significativo.
- La oscuridad permanente no es un factor para inducir a la tuberización, tomando en cuenta los fotoperiodos en general no se encontró diferencia significativa según los análisis estadísticos realizados.
- El tratamiento que obtuvo el mayor número de microtubérculos es el de la variedad Marcela, con un fotoperiodo de 0 horas luz.
- Los tratamientos que obtuvieron el mayor peso es el que estaba compuesto por la variedad Marcela, con un fotoperiodo de 8 horas luz.
- El tratamiento que obtuvo el mayor número yemas es el de la variedad Marcela, con un fotoperiodo de 0 horas luz.
- En cuanto se refiere al tamaño se pudo evidenciar que los tratamientos sometidos a 16 horas luz dieron los microtubérculos de mayores diámetros pero cabe resaltar que se obtuvieron tubérculos *in vitro* deformes debido a la mayor exposición de luz.

5.2 RECOMENDACIONES

- Para obtener mayor número de microtubérculos se debe trabajar con fotoperiodos de oscuridad continua ya que bajo estas condiciones hay mayor precocidad en la producción de microtubérculos producidos *in vitro*.
- Para obtener mayor peso y diámetro de microtubérculos se recomienda trabajar bajo fotoperiodo de 8 horas luz ya que dieron los mejores resultados permitiendo calificar como tubérculo-semilla.
- No se debe trabajar con el fotoperiodo de 16 horas luz debido a que se obtuvo microtubérculos deformes porque estaban expuestos a largos fotoperiodos.
- Se debe probar otras concentraciones de fitorreguladores para poder verificar en qué manera influye en el medio de cultivo debido a que las citoquininas añadidas al medio inducen a la microtuberización *in vitro*.
- Trabajar con vitroplantas de diferentes edades para poder verificar si existe influencia de la edad en la microtuberización *in vitro* porque se trabajara con vitroplantas de diferentes características.
- Para obtener mayores resultados en la producción de microtubérculos *in vitro* se debe probar retardantes del crecimiento como el Cloruro de clorocolina para añadirlos al medio y ver su eficacia como inductor a la microtuberización.
- Se debe seguir trabajando sobre el tema de la microtuberización *in vitro* para obtener más bibliografía para futuros trabajos de investigación.