

CONSERVACIÓN *EX SITU* DE 10 ACCESIONES DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM L. SUBSP. ANDIGENA*) MEDIANTE TÉCNICAS *IN VITRO*

CONSERVATION *EX SITU* OF 10 POTATOES ACCESSIONS (*SOLANUM TUBEROSUM L. SUBSP. ANDIGENA*) THROUGH TECHNIQUES *IN VITRO*

¹Romero Aleida, ²Montero Sintya, ³Acebey, Roberto.

¹Docente investigadora Responsable Banco de Germoplasma BIORENA. Facultad de Ciencias Agrarias. E-mail: saromeroo@gmail.com

²Investigadora Banco de Germoplasma BIORENA Facultad de Ciencias Agrarias.

³Docente Investigador Responsable Unidad Agroecológica y Forestal BIORENA, Facultad de Ciencias Agrarias

Enviado 14 de mayo aceptado 17 de agosto

Resumen

El presente trabajo de investigación se realizó en laboratorios del Banco de Germoplasma BIORENA en el Centro de Investigación e Innovación en Ciencias Agrarias Villa Carmen Yotala, a 15 km de la ciudad de Sucre, a partir de la gestión 2017 al 2019. El objetivo fue aplicar una metodología que permita mantener y conservar explantes de papa (*Solanum tuberosum L. Subsp. andigena*) bajo condiciones de crecimiento mínimo. El diseño experimental utilizado fue bifactorial con 10 accesiones de papa (12-A, Imilla negra, Bol 1207, Morena, Chiar Imilla, Yungay, Sani Imilla, 6-B, Vera, Imilla) y 3 concentraciones de estabilizadores osmóticos en el medio de conservación (MS con Manitol 40gr/l, MS Sorbitol 30gr/l y Sorbitol 40gr/l) con 4 repeticiones. Dentro del método de investigación se indujo a la brotación de los tubérculos los cuales fueron sembrados con un pH de 5,7 y mantenidos en la sala de crecimiento durante 30 días con condiciones

físicas de fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad a 21 ° C de temperatura, intensidad lumínica de 3200 lux, y 50-70% de humedad relativa. Se realizaron seis multiplicaciones - a partir de las vitro-plantas obtenidas - usando esquejes menores a 1 cm, mantenidos en la sala de crecimiento. Finalmente, se colocaron las vitroplantas a los medios de conservación, utilizando nudos medios, durante ocho meses en la cámara de crecimiento. Se concluye que las accesiones mostraron caracteres deseables en el medio de conservación con Manitol 40 gr/l con un promedio de altura de 17,39 mm, 7 hojas por vitroplanta, pero menor número de raíces en las accesiones (3,97 raíces). El medio de conservación con Sorbitol 40gr/l fue el que obtuvo número mayor de raíces en las accesiones con una media de 5,16 raíces. Se concluye que el medio de conservación con resultados satisfactorios para la conservación por el método de crecimiento mínimo para las

10 accesiones de papa con las que se trabajó fue el Medio de conservación con Sorbitol al 0,4.

Palabras clave: vitroplantas, accesiones, medios de conservación.

Abstract

This research work was carried out at the BIORENA Germplasm Bank Laboratories at the Center of Research and Innovation in Agricultural Sciences - Villa Carmen Yotala located at 15 km from the city of Sucre, from 2017 to 2019.

The objective was to develop a methodology that allows maintaining and preserving potato explants (*Solanum tuberosum* L subsp. *Andigena*), under minimum growth conditions. The experimental design used in this research was bifactorial with 10 potato accessions (12-A, Imilla negra, Bol 1207, Morena, Chiar Imilla, Yungay, Sani Imilla, 6-B, Vera, Imilla) and 3 concentrations of osmotic stabilizers in the middle of conservation (MS with Mannitol 40gr/l, MS Sorbitol 30gr/l and Sorbitol 40gr/l) with 4 repetitions.

Within the research method, the sprouting of tubers was induced, which were sown with a pH of 5.7 and kept in the growth room for 30 days with physical photoperiod conditions of 16 light hours and 8 dark hours at 21 °C of temperature, light intensity of 3200 lux, and 50-70% relative humidity. Besides, six multiplications were made from the vitroplants obtained using cuttings smaller than 1 cm, kept in the growth room.

Finally, the vitroplants were placed in the conservation mediums, using half nodes (*medios nudos*) for eight months in the growth chamber. It is concluded that the accessions

showed desirable characters in the conservation mediums with Mannitol 40 gr/l with an average height of 17,39 mm, 7 leaves per vitroplant, but fewer roots in the accessions (3,97 roots). The conservation medium with Sorbitol 40gr/l was the one that obtained the highest number of roots in the accessions with an average of 5,16 roots.

It is concluded that the conservation mediums with satisfactory results for conservation by the minimum growth method for the 10 accessions of potatoes with which it was worked, was the conservation Medium with Sorbitol at 0,4.

Key words:

Vitro plants, accessions, conservation media.

Introducción

A la luz de los conocimientos actuales sobre el origen o centro de domesticación de la papa, se afirma que la mayor riqueza de ecotipos y variedades de papas o patatas (*Solanum tuberosum* L), como son conocidas en todo el mundo, se encuentra distribuida en la región Andina del Perú y Bolivia. En la región andina boliviana, el área circunlacustre del Lago Titicaca, que comprende el área geográfica diversa como el Altiplano, la Puna Montañosa y los valles de la cordillera Real de La Paz, es el lugar donde aún en la actualidad se conserva la práctica ancestral del cultivo de una variedad de papas nativas, de colores sabores y formas agradables e impresionante a la vista de propios y extraños (Coca Morante, 2012).

La conservación del recurso genético debe ser enfocado de forma integral, no solo deben participar los agricultores que producen este alimento, que es de mucha importancia en la dieta alimenticia, sino también las políticas nacionales o regionales que garanticen al

productor un manejo sostenible de este recurso alimenticio. Por otra parte la importancia de la conservación de este recurso, está referido a la alta diversidad biológica, en el país se tiene más de 700 variedades de papa (PROINPA, 2018), por ello debemos buscar formas de conservar esa riqueza, que presenta amenazas por los avances tecnológicos que se van dando en la agricultura, a nombre de buscar variedades resistentes a plagas y enfermedades o resistentes a otros factores como el clima, lo que está conduciendo al uso limitado de solo algunas variedades, o siendo manipuladas genéticamente, como los llamados cultivos transgénicos, que hacen mucho daño a esa variabilidad genética y a un sistema de producción agroecológica, que tiene como principio el manejo de la biodiversidad y de los suelos. Ahí la importancia de los bancos de germoplasma que tienen como objetivo el de conservar esa variabilidad genética de los cultivos, para de esa forma garantizar la sostenibilidad y la seguridad alimentaria en el país y que los agricultores mantengan esa riqueza genética en el tiempo.

La diversidad de las papas nativas está dispersa en una cantidad de comunidades campesinas vinculadas por características geográficas, de clima y cultura. Esta vinculación, que viene desde tiempos ancestrales, ha conformado referencias geográficas, que con el correr de los años, vinieron a ser denominados “microcentros de diversidad genética”. Estos microcentros están distribuidos, principalmente, en los departamentos de La Paz, Cochabamba y Potosí. (Coca Morante, 2012)

El germoplasma de los cultivos nativos de papa ha sido conservado desde la década de los años 60 en la Estación de Toralapa, actualmente el Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos Andinos cuenta con un total de 2056 accesiones de tubérculos y raíces andinas, siendo la

colección más importante la de papa. Esta colección cuenta con más de 1200 accesiones entre las cuales se pueden encontrar alrededor de 700 variedades diferentes provenientes de toda la zona andina del país que fueron recolectadas, clasificadas, conservadas y valorizadas (Ugarte & Iriarte, s.f.).

La conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos y de plantas libres de virus representa una alternativa para apoyar los programas de mejoramiento genético y de producción de semilla certificada. La adición de osmorreguladores como el manitol ha resultado en una reducción sustancial del crecimiento, pero poco se conoce sobre los efectos posteriores del periodo de almacenamiento en las plantas (Paéz & Gómez, 1996).

El problema de la conservación de recursos genéticos es la pérdida del material que se almacena, así los Bancos de Germoplasma deben combinar estrategias para evitar la pérdida de semillas de especies cuya vida se acorta si no se regenera en campo, en este marco las colectas de papa, especialmente de altura tiene un tiempo de almacenaje de pocos meses y se debe regenerar *in situ*, en campo, para evitar la pérdida de accesiones.

De acuerdo a lo anteriormente planteado este tipo de conservación constituye parte esencial de la estrategia general para la conservación y el intercambio de recursos fitogenéticos en el Banco de Germoplasma BIORENA, que ha priorizado para la conservación de 10 accesiones de Papa (*Solanum tuberosum* L Subsp. *andigena*) la técnica *in vitro* utilizando estabilizadores osmóticos que retarden el desarrollo de la vitro planta para su conservación en el Banco de Germoplasma en el CIICA Villa Carmen, Yotala.

Métodos

Las unidades experimentales se distribuyeron bajo un Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial y 4 repeticiones por tratamiento. Para la realización del análisis de varianza y la prueba de Duncan se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22 para Windows y para la realización de gráficos de medias, el paquete Excel.

Las Variables dependientes fueron: Altura de vitroplanta, Número de raíces, Número de hojas, Porcentaje de contaminación y porcentaje de sobrevivencia.

En el Cuadro 1 se muestra que las Variables independientes fueron las dosis y las 10 accesiones.

Cuadro 1. Factores en estudio.

Factor A: (10)		Factor B:(3)			n:(4)
Accesiones de papa		Medios de cultivo			Repeticiones
A ₁	12-A	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₂	ING (Imilla negra)	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₃	Bol 1207	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₄	Morena	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₅	Chiar Imilla	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₆	Yungay	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₇	Sani Imilla	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₈	6-B	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₉	Vera	M ₁	M ₂	M ₃	4
A ₁₀	Imilla	M ₁	M ₂	M ₃	4

Dónde:

A₁₋₁₀ = Accesiones de papa

M₁ = Medio de conservación 1 (concentración de Manitol al 0,4%)

M₂ = Medio de conservación 2 (concentración de Sorbitol al 0,3%)

M₃ = Medio de conservación 3 (concentración de Sorbitol al 0,4%)

La colecta se realizó a productores de asociaciones en la Feria de papa en mayo del año 2017 en la localidad de Betanzos (Departamento de Potosí) y ciudad de Sucre (Departamento de Chuquisaca), en los cuales se encuentran variedades de papa nativa y se completó la documentación de cada accesión recolectada.

Para el inicio de la experimentación se definieron áreas separadas para adoptar procedimientos de asepsia y mantener los cultivos libres de contaminación; estos son:

El área de lavado y preparación de cultivo con equipos y herramientas adecuadas para

preparación del medio de cultivo, ajustar el pH, calentar el medio y esterilizarlo, se pesaron los distintos reactivos a utilizarse en la balanza analítica, fueron añadidos con la ayuda de pipeta y micropipeta a la preparación de soluciones.

En el Área de siembra se realizó la transferencia de los explantes a los medios de cultivo y en el cuarto de crecimiento se colocaron tubos de ensayo a una temperatura de 20-22° C, Iluminación de 3200 lux, con un Fotoperiodo de 19 horas luz y Humedad relativa de 50-70%.

Para la conservación se utilizó la cámara germinadora en condiciones de fotoperiodo

de 16 horas luz, la humedad relativa de 60% e intensidad de iluminación de 1000 lux.

establecimiento y multiplicación, como para la conservación.

Medios de cultivos in vitro utilizados

El procedimiento para la preparación del medio de cultivo fue el mismo tanto para la fase de

En los Cuadros 2 y 3 se tiene los diferentes medios de cultivo y las dosis que se usaron de acuerdo al requerimiento en las diferentes fases.

Cuadro 2. Medio para establecimiento y Multiplicación.

Componente	Unidad	Cantidad
MS	gr.	4.33
Azúcar	gr	25
Myo-inositol	mgr.	100
Tiamina	ml	0.4
PaCa	ml	2
AG3	ml	0.3
Piridoxina HCl	ml	0,5
Ácido nicotínico	ml	0,5
Phytagar	gr	6.5
pH		5.7

Dosis por tubo de ensayo: 3 ml.
Fuente: INIAF

Cuadro 3. Medios para conservación.

Reactivos	M1	M2	M3
MS	2.16 gr.	2.16 gr.	2.16 gr
Azúcar	12,5 gr.	12,5 gr.	12,5 gr
Myo-inositol	100 mgr,	100 mgr,	100 mgr
Tiamina	0,4 mgr	0,4 mgr	0,4 mgr
Piridoxina HCl	0,5 mgr	0,5 mgr	0,5 mgr
Ácido nicotínico	0,5 mgr	0,5 mgr	0,5 mgr
Manitol	40 gr.		
Sorbitol		30 gr	40 gr
Phytagar	6,5 gr.	6,5 gr	6,5 gr
pH	5,7	5,7	5,7

Fuente INIAF CIP CIP

Dosis por tubo de ensayo: 4 ml

En el cuadro 2, se observan los distintos reactivos y dosis utilizados en el medio de establecimiento y multiplicación los cuales se utilizaron en base al protocolo del Banco de germoplasma de Toralapa Cochabamba (Calle, et al., s.f.).

En el cuadro 3 se detallan los reactivos y dosis utilizados en el medio de conservación los cuales están en base a los documentos de los autores (Calle, et al., s.f.) y (Aguirre V., et al., 2016).

Fases para la conservación in vitro de papa

Fase 0: Preparativa

Selección de la planta donante.

Se seleccionaron dos tubérculos de cada accesión de acuerdo a las características de rendimiento que obtuvo la planta.

Brotación de la semilla de papa.

La brotación se realizó en una cámara germinadora o de aclimatación para acelerar la brotación en un mes y medio. Una vez obtenidos los brotes de las accesiones de papa se procedió a continuar el procedimiento. En la cámara se tuvieron problemas de contaminación por infestación de cochinillas lo cual se controló realizando un desinfectado con hipoclorito al 2%, para evitar daños en el explante, a pesar de este manejo se tuvieron problemas en el establecimiento como en la multiplicación.

Fase 1: Establecimiento de los cultivos.

Selección y desinfección del explante.

En un azulejo bien limpio, se dispusieron los brotes de papa previamente disecados con la ayuda de un bisturí, de modo que se separaron fragmentos de aproximadamente 1,5 cm.

Seguidamente se prosiguió a hacer el lavado de los brotes en una solución de agua y detergente, lo cual ayudo a que la tensión superficial sea menor para tener una mejor desinfección del material vegetal, luego se aclaró con agua tres veces durante 3 minutos.

Una vez los brotes se encontraron dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a la desinfección con alcohol al 70% durante 30 seg., y se aclaró tres veces durante 2 minutos con agua destilada previamente esterilizada.

Luego se sumergieron los explantes en una solución desinfectante de hipoclorito agitando suavemente durante 2 minutos, seguidamente se aclaró tres veces durante 2 minutos con agua destilada (esterilizada).

Establecimiento del explante.

El establecimiento se realizó con los brotes ya obtenidos anteriormente desinfectados se hizo cortes solo de la parte del ápice se pusieron de tres a dos brotes según el tamaño en el medio anteriormente preparado y desinfectado se dejó durante un mes en el cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 5 horas oscuridad y 19 horas luz a una temperatura de 20 a 22 °C.

Pasados los 30 días se escogieron las accesiones con menos porcentaje de contaminación y el resto fueron desechados.

Fase 2: Multiplicación.

La multiplicación se comenzó a realizar el mes siguiente del establecimiento de las plantas la segmentación de los explantes se realizó teniendo en cuenta el tamaño del explante no mayor a 1 cm. En cada tubo de ensayo se colocaron dos explantes cada uno con dos nudos cada planta que se multiplicaron extrayendo cuatro plantas nuevas.

Durante la multiplicación se tuvieron problemas con la contaminación por cochinilla y hongos por lo cual se tuvo que descartar varias accesiones y se tuvieron que seleccionar las plantas libres de contaminación, con este procedimiento se pudo obtener un número favorable a lo largo de seis meses de plantas libre de contaminación.

Fase 3: Conservación.

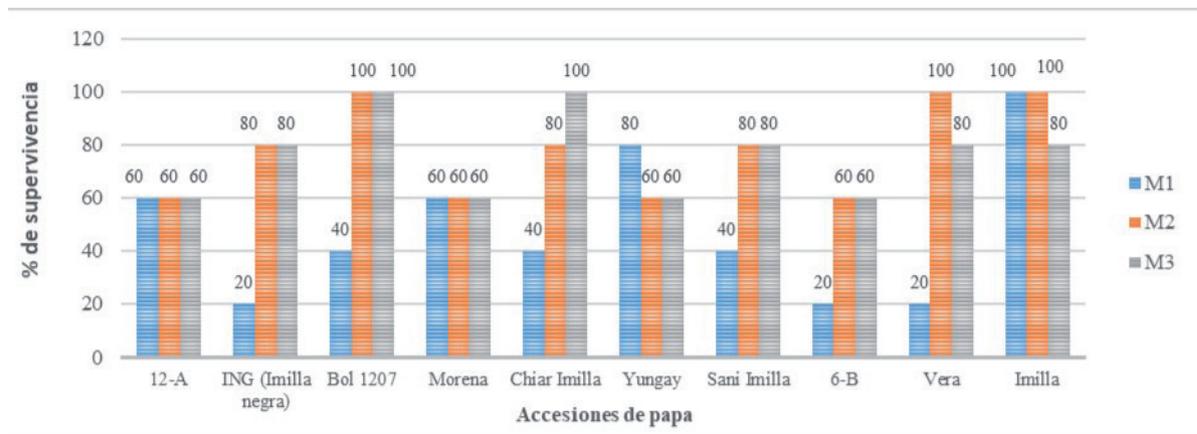
número de raíces, porcentaje de contaminación y porcentaje de sobrevivencia.

Resultados

Porcentaje de sobrevivencia de las diferentes accesiones en los tres medios de conservación

En la Gráfica 1, se presenta el porcentaje de sobrevivencia de 10 accesiones después 120 días en conservación.

Gráfica 1. Porcentaje de sobrevivencia de 10 accesiones de papa.



Durante esta fase se procedió con tres protocolos de conservación (cuadro 2) los cuales son los que reducen la capacidad de asimilación de los nutrientes y componen el medio de cultivo.

Se tomó la parte media del explante por ser la parte que más tarda en regenerarse de la cual se obtuvieron dos explantes nuevos, en un total de 40 plantas por protocolo y 30 por accesión en total 120 unidades experimentales teniendo en cuenta el diseño estadístico de la investigación.

Se hizo un seguimiento de las unidades experimentales durante tres meses cada 15 días en los cuales se evaluaron las variables de: tamaño de vitroplanta, número de hojas,

Se observa en la Gráfica 1 el Medio de conservación 1 (con Manitol al 0,4%) es el que menores porcentajes de sobrevivencia obtuvo durante el experimento, sin embargo, la accesión Imilla tuvo el 100% de sobrevivencia y la variedad Yungay con 80% de sobrevivencia.

En el Medio de conservación 2 (con Sorbitol al 0,3%) el menor porcentaje de sobrevivencia fue de las accesiones 12-A, Morena, Yungay y 6-B con 60% y el mayor porcentaje (100%) fueron Bol 1207, Vera e Imilla.

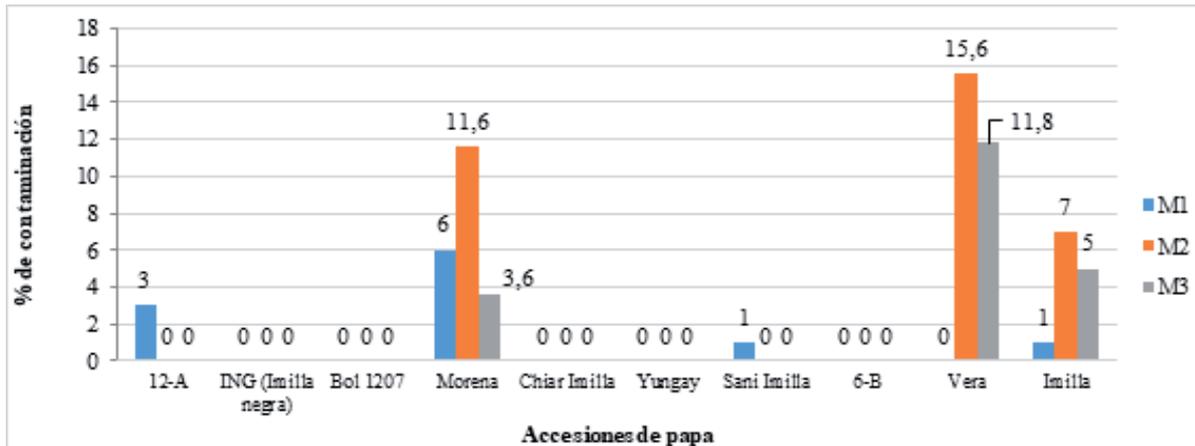
En el Medio de conservación 3 (con Sorbitol al 0,4%) se obtuvieron los menores porcentajes de sobrevivencia (60%) en las accesiones 12-

A, Morena, Yungay y 6-B, el mayor presentó la Bol 1207 y Chiar imilla, con 100%.

Porcentaje de contaminación en las 10 accesiones en los tres medios de conservación.

Respecto a los porcentajes de contaminación de las accesiones en estudio se presenta la gráfica 2, mediante esta técnica.

Gráfica 2. Porcentaje de Contaminación de las Unidades Experimentales.



La Gráfica 2 muestra que la accesión Morena presento problemas de contaminación en los tres medios de conservación; el medio de conservación 1 (Manitol al 0,4 %) con 6% de contaminación; con 11,6% de contaminación en el medio de conservación 2 (Sorbitol al 0,3%) y 3,6% en el medio de conservación 3 (Sorbitol al 0,4%). La accesión Imilla tuvo 1% de contaminación en el medio de conservación 1 (Manitol al 0,4 %), 7% en el medio de conservación 2 (Sorbitol al 0,3%) y 5% en el medio de conservación 3 (Sorbitol al 0,4%).

La accesión Vera tuvo contaminación en dos medios de cultivo, con 15,6% en el medio de conservación 2 (Sorbitol al 0,3%) y 11,8% en el medio de conservación 3 (Sorbitol al 0,4%). La accesión Sani Imilla presento 1% de contaminación en el medio de conservación 1 (Manitol al 0,4 %).

Las Accesiones ING (Imilla negra), Bol 1207, Yungay, Chiar Imilla, 6-B no presentaron

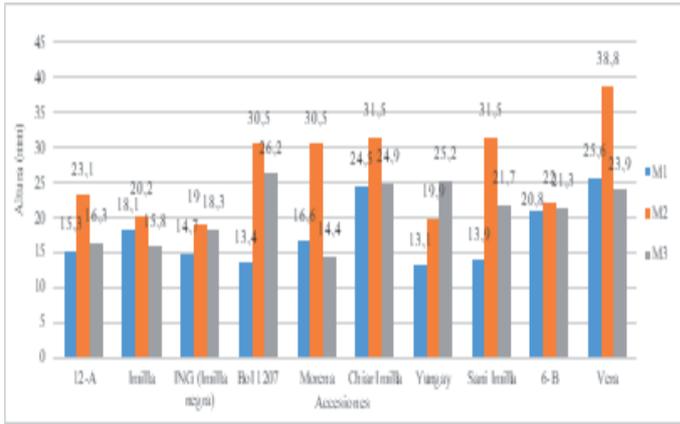
contaminación en ninguno de los medios de conservación.

Desarrollo de las plántulas de papa en los tres medios de conservación evaluados a los 120 días después del trasplante.

La Gráfica 3 muestra la altura de vitro planta medida a los 120 días según los medios de conservación.

En la Gráfica 3 se observa que el medio de conservación M1 (con Manitol al 0,4%) obtuvo alturas mínimas de 13,1 mm, siendo 6 accesiones que se encuentran en alturas menores a su promedio (12-A, ING, Bol 1207, Morena, Yungay y Sani Imilla) teniendo un menor crecimiento en este medio de conservación. En el medio de conservación M3 (con Sorbitol al 0,4%) tuvo alturas de 14,4mm a 26,2 mm, siendo la accesión Morena con menor crecimiento en este medio. En el medio de conservación M2 (con Sorbitol al 0,3%) tuvo un desarrollo mayor en el tiempo

Gráfica 3. Altura de vitro planta en (mm).



Estadísticos descriptivos	Altura (mm)
Media	21,70
Desviación estándar	8,69
Rango	52,44
Mínimo	10,33
Máximo	62,77
% CV	40,05

de evaluación con 19 mm la accesión ING (imilla negra). Respecto, al análisis estadístico la media obtenida con los tres medios fue de

21,70 mm, la desviación estándar fue de 8,96 y su coeficiente de variación del 40,05%.

Para la variable altura de vitro planta (Cuadro 4) se presenta los datos obtenidos:

Cuadro 4. Análisis de Varianza altura de vitro planta (mm).

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	4758,567a	29	164,089	3,491	0,000
Interceptación	56511,357	1	56511,357	1202,177	0,000
Accesión	1713,1	9	190,344	4,049	0,000**
Medio	1708,912	2	854,456	18,177	0,000**
Accesión * Medio	1336,556	18	74,253	1,580	0,082 NS
Error	4230,678	90	47,008		
Total	65500,602	120			
Total corregido	8989,245	119			

Respecto a las accesiones y Medio de conservación en el Cuadro 4 se muestra que son altamente significativos (**), mientras la interacción Accesión*Medios de conservación es no es significativo (NS).

Según la prueba de Duncan al 5%, para la altura de planta, se formaron tres grupos; un primer grupo lo conforman las accesiones ING (Imilla negra), Imilla, Yungay, Morena, 6-B, Sani Imilla y Bol 1207 son estadísticamente iguales con alturas de 17,33 mm a 23,39 mm

siendo estas las alturas menores obtenidas. El segundo grupo conformado por las accesiones

6-B, Sani Imilla, Bol 1207 y Chiar Imilla son estadísticamente iguales con alturas de 21,33 mm a 26,96 mm. El tercer grupo conformado por las accesiones Chiar Imilla y Vera con alturas de 26,96 mm y 29,45 mm siendo estadísticamente iguales y mayores a los anteriores grupos.

La comparación de medias por la prueba de Duncan al 5 % de significancia la altura de vitro plantas de acuerdo a los medios en estudio

(Sorbitol al 0,3%) con una altura de 26,70 mm siendo mayor que los anteriores grupos.

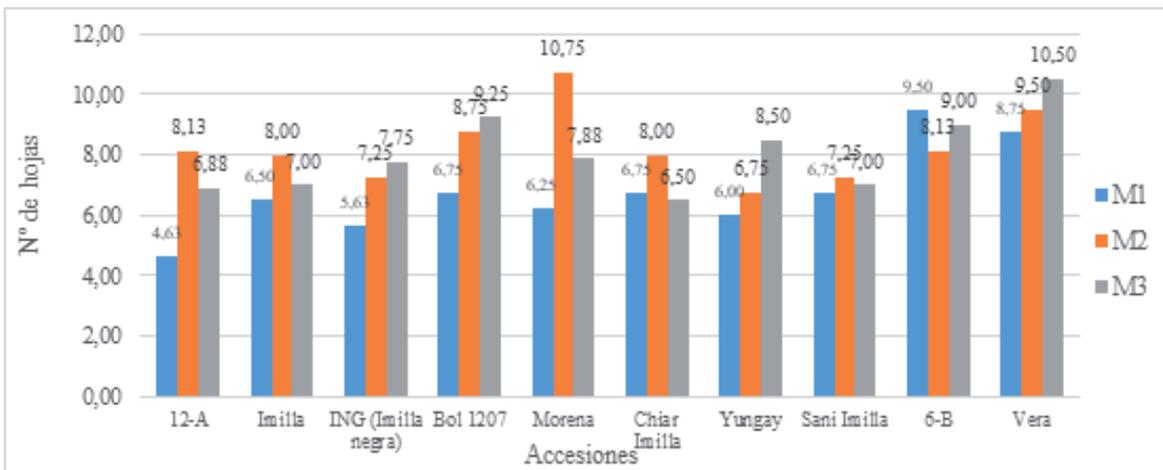
Número de hojas de vitro planta.

La Gráfica 4 muestra el número de hojas de vitro planta medida según medios de conservación en estudio después de 120 días en conservación.

Número de hojas de vitro planta.

En la Gráfica 4 el medio de conservación M1 (Manitol al 0,4%), la accesión 12-A fue la que obtuvo menor número de hojas (4,63) y la accesión 6-B tuvo mayor número de 9,50 hojas.

Gráfica 4. Número de hojas de vitro planta.



se formaron tres grupos distintos siendo el M1 (Manitol al 0,4%) el menor con una media de 17,59 mm, seguido por M3 (Sorbitol al 0,4%) con una media de 20,81 mm y por último el M2

El medio de conservación M2 (Sorbitol al 0,3%) la accesión Yungay fue el que menor número de 6,75 hojas seguido de la accesión Vera 9,50 hojas siendo mayor a las anteriores.

Cuadro 5. Análisis estadístico de número de hojas por accesión.

Estadísticos descriptivos	Número de hojas
Media	7,98
Desviación estándar	2,34
Rango	12,00
Mínimo	4,00
Máximo	16,00
% CV	29,31

En el Cuadro 5, se muestra que respecto al número de hojas las vitro plantas alcanzaron medidas máximas de 16 y mínimos de 4, la desviación estándar de los datos obtenidos fue de 2,34, su coeficiente de variación fue de 29,31 %.

Para la variable número de hojas de vitro planta

tres grupos los cuales fueron: en el primer grupo 12-A, ING (Imilla negra), Sani Imilla, Yungay, Chiar imilla e Imilla las cuales son estadísticamente iguales con una media de números de hojas de 6,54 a 7,17 hojas en el segundo grupo conformado por ING (Imilla negra), Sani Imilla, Yungay, Chiar imilla, Imilla, Bol 1207 y Morena las cuales son

Cuadro 6. Análisis de varianza de número de hojas de vitro planta.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	233,700a	29	8,059	3,328	0,000
Interceptación	7068,675	1	7068,675	2919,265	0,000
Accesión	109,575	9	12,175	5,028	0,000**
Medio	52,35	2	26,175	10,810	0,000**
Accesión * Medio	71,775	18	3,988	1,647	0,065 NS
Error	217,925	90	2,421		
Total	7520,3	120			
Total corregido	451,625	119			

(Cuadro 6) se tomaron datos después de 120 días en conservación.

Respecto a las accesiones y Medio de conservación el Cuadro 6 muestra que son altamente significativos (**), mientras que el análisis de varianza de la interacción Accesoión - Medios de conservación es No significativo (NS).

La prueba de Duncan para el parámetro de acuerdo a las accesiones en estudio y al 5 % de significancia, presento los resultados en

estadísticamente iguales con un número de hojas de 6,87 a 38,29 hojas y el tercer grupo conformado Bol 1207, Morena, 6-B y Vera los cuales son estadísticamente iguales y mayores a los demás grupos con número de hojas de 8,25 a 9,58 hojas.

Según Duncan el parámetro de número de hojas de vitro planta al 5% de significancia muestra que los valores se dividieron en dos grupos: el primero fue el M1 (Manitol al 0,4%) con una media de 6,75 hojas.

El segundo grupo conformado por los

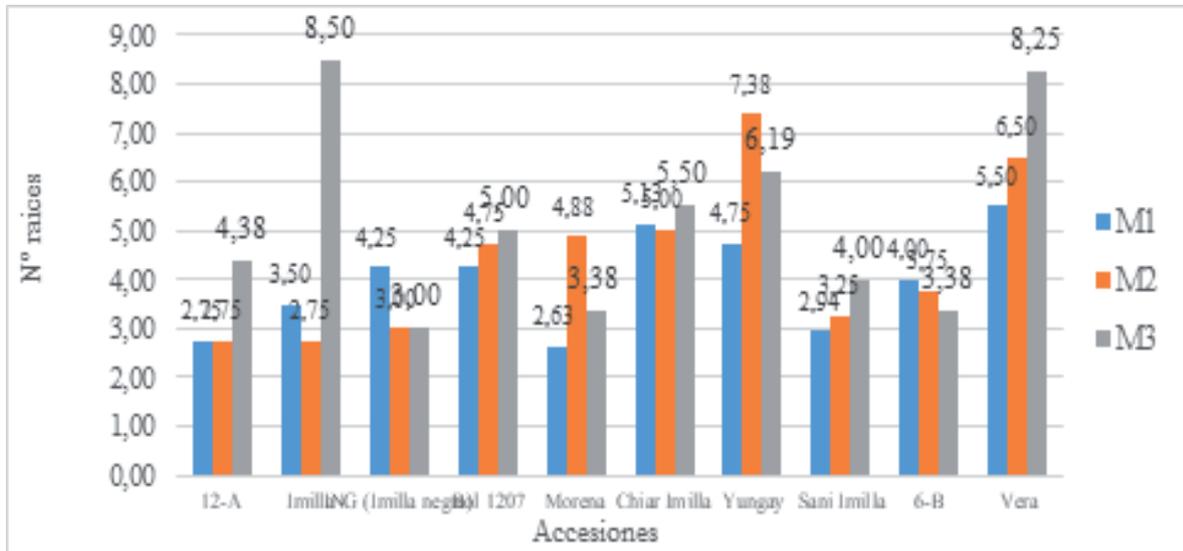
medios de conservación los M2 (Sorbitol al 0,3%) y M3 (Sorbitol al 0,4%) con una media de 8,03 y 8,25 hojas siendo estadísticamente iguales y mayor que el primer grupo.

Número de Raíces de vitro planta.

de raíces fue 6,19 raíces por vitro planta de la accesión Yungay.

Respecto a la altura alcanzaron valores máximos de 12 raíces y mínimos de 2 raíces, con un rango de 10 raíces. La desviación

Gráfica 5. Número de raíces de vitro planta.



La Gráfica 5 muestra número de raíces de vitro planta medida a los 120 días según los medios de conservación.

Se observa en la Gráfica 5, el medio de conservación M1 (Manitol al 0,4%) que obtuvo el menor número de raíces la accesión Morena con un promedio de 2,63 raíces por vitro planta, la accesión que obtuvo un mayor número de raíces en este medio de conservación fue Vera con un promedio de 5,50 raíces. El medio de conservación M2 (Sorbitol al 0,3%) alcanzo un promedio menor de 2,75 raíces de las accesiones 12-A y la accesión Imilla. Por último, tenemos al medio de conservación M3 (Sorbitol al 0,4%) en este medio de conservación la accesión ING (Imilla Negra) con un promedio de 3 raíces que fue el menor a las demás el mayor promedio

estándar de los datos obtenidos fue de 2,07 y su coeficiente de variación fue del 45,81%, indicando la dispersión de datos respecto a la media.

El ANVA para la variable número de raíces de vitro planta tomados a los (Cuadro 7) 120 días después del trasplante.

Cuadro 7. Análisis de varianza de número de raíces de vitro planta.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	C u a d r á t i c o promedio	F	Sig.
M o d e l o corregido	297,085a	29	10,244	4,379	0,000
Interceptación	2439,008	1	2439,008	1042,652	0,000
Accesión	163,002	9	18,111	7,742	0,000**
Medio	28,907	2	14,454	6,179	0,003**
Accesión * Medio	105,176	18	5,843	2,498	0,002**
Error	210,531	90	2,339		
Total	2946,625	120			
Total corregido	507,617	119			

Se muestra en el Cuadro 7, respecto a las accesiones, medios de conservación e interacción de ambos factores en el Análisis de Varianza es altamente significativo (**).

Con la prueba de Duncan al 5% de significancia se presentaron cinco grupos: el primero conformado por las accesiones Morena, Chiar Imilla, 6-B, Vera, 12-A, Sani imilla, ING (Imilla negra), Morena, 6-B y Bol 1207 las cuales tienen una media de 3,29 a 4,67 raíces por vitro planta las cuales son estadísticamente iguales y menores a los demás grupos. El segundo conformado por Morena, 6-B y Bol 1207 e Imilla con una media de 3,63 a 4,92 de raíces por vitro planta las cuales son estadísticamente iguales. El tercer grupo conformado por las accesiones Bol 1207, Imilla y Chiar Imilla con una media de 4,67 a 5,21 raíces las cuales son estadísticamente iguales. El cuarto grupo conformado por Imilla, Chiar Imilla e Yungay los cuales son estadísticamente iguales con una media de 4,92 a 6,10 raíces las cuales

son estadísticamente iguales. El quinto grupo conformado por Yungay y Vera con una media de 6,10 y 6,75 los cuales son estadísticamente iguales y mayores los grupos anteriores.

La comparación de medias realizada con la Prueba de Duncan al 5% de significancia mostro dos grupos diferentes el primero el medio de conservación M1 (con Manitol al 0,4%) y medio de conservación M2 (con Sorbitol al 0,3) con una media de 3,97 y 4,40 raíces por vitro planta las cuales son estadísticamente iguales, el segundo grupo conformado por medio de conservación M3 (con Sorbitol al 0,4%) estadísticamente diferente y mayor al primer grupo con una media de 5,26 raíces por vitro planta.

Discusiones

Para el medio de conservación se utiliza el Medio E (4,0% de Sorbitol, 2,0% Sacarosa y 0,8% de agar), que reduce la tasa de crecimiento por la alta presión osmótica, produciendo

entrenados cortos. Este medio puede ser utilizado para un almacenamiento a 25°C y el material solo necesita ser transferido una vez al año, Si la temperatura puede bajarse a 8°C el periodo entre transferencias aumenta de dos a tres años. (Espinoza , et al., 1992).

La etapa de conservación los explantes se almacenaron en cámara fría a 8°C, intensidad de luz de 1600 lux y un 60 % de humedad relativa. (Calle, et al., s.f.).

En la investigación realizada se utilizó fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, humedad relativa de 60% e intensidad lumínica de 1000 lux como en las anteriores investigaciones realizadas las condiciones físicas para la conservación *in vitro* tiene una gran relación con las mismas por lo tanto en las investigaciones realizadas y en la investigación actual concuerda con las investigaciones realizadas anteriormente.

Por otro lado, la concentración ½MS muestra un grupo de accesiones que registran los valores más altos de sobrevivencia entre 95,8 a 100% en las accesiones 10, 105, 175, 575, 860, 1190. La accesión 164 con 91,6% y con menor porcentaje de sobrevivencia la accesión 734 (85,5 %). (Calle, et al., s.f.),

Los genotipos de papa estudiados, obtuvieron porcentajes de sobrevivencia superiores a 83.33%, logrando establecerse satisfactoriamente *in vitro*. (Gutiérrez Quispe, 2009), como podemos ver en los medios de cultivo utilizados en las investigaciones anteriores obtuvieron un alto nivel de sobrevivencia de los explantes mientras que en la investigación realizada los porcentajes de sobrevivencia fueron muy bajos en las accesiones, en los resultados obtenidos el Medio de conservación 1 (con Manitol al 0,4%) es el que menores porcentajes de

sobrevivencia ha mostrado, perdiéndose por completo 2 accesiones y con un promedio de sobrevivencia de 44% lo cual no concuerda con las investigaciones anteriormente realizadas. En cambio, el Medio de conservación 2 (con Sorbitol al 0,3%) fue con un promedio de sobrevivencia de 78% superior a los medios de conservación M1 y M3. En el M3 (con Sorbitol al 0,4%) se tuvo un porcentaje de sobrevivencia promedio de 76%.

En el tema de contaminación los autores (Calle, et al., s.f.), (Eloy, 2012) y (Gutiérrez Quispe, 2009) afirman que no sufrieron porcentajes de contaminación, en la presente investigación se tuvo problemas de contaminación en las accesiones Morena, Imilla, Vera, Sani Imilla, aunque fueron porcentajes de contaminación menores a 18%.

La accesión 734, presentó un crecimiento de 3.6 cm, la cual se considera una altura óptima en promedio para la conservación *in vitro*. El grupo conformado por las accesiones 10, 175, 1190, 105 y 575 presentan una altura promedio de 4,25 cm. Un tercer grupo que también muestra diferencias significativas ante los otros conforman las accesiones 164 y 860 que tienen una altura de 5 y 6.3 cm respectivamente. Se deduce que cada accesión tiene una altura variable, y que está en función del genotipo de la planta (Calle, et al., s.f.) .

En la etapa de conservación, las vitro plantas retardan su crecimiento al proporcionarle manitol y una menor cantidad de sacarosa (0,5 %), dando como resultado un desarrollo morfológico menor a diferencia de la adición de mayores concentraciones (2.5% y 3%), que muestran un mayor desarrollo de las mismas; las concentraciones de sacarosa al aumentan el desarrollo de las vitro plantas, como en el caso de los genotipos Phitikilla y Yaco con alturas

de 2.76 y 2.29cm respectivamente. (Gutiérrez Quispe, 2009).

Al respecto las alturas conseguidas fueron de 2,76 cm hasta 6,3 cm las cuales concuerdan con la investigación realizada ya que las alturas en el medio de conservación M1 (con Manitol al 0,4%) fueron entre 13,07 mm de la accesión Yungay y 25,56 mm de la accesión Vera. El Medio de conservación 3 (con Sorbitol al 0,4%) obtuvo una altura de 14,45 mm (accesión Morena) y 26,23 mm en la accesión Bol 1207. Por último, el M2 (con sorbitol al 0,3%) fue el que tuvo las medidas más bajas, de 18,99 mm de altura (accesión ING Imilla negra) y la altura más alta fue de la accesión Vera con 38,84 mm.

El mayor número de raíces lo obtuvo el genotipo Imilla roja (2.73 raíces), y el menor número Pala roja (1.43 raíces). (Gutiérrez Quispe, 2009). El análisis de número de raíces no fue significativo en el análisis de ANVA. Se observó el desarrollo normal de raíces en las ocho accesiones evaluadas durante los seis meses. (Calle, et al., s.f.). en la investigación realizada el análisis de varianza es significativo por lo cual se procede con la prueba de Duncan al 5% de significancia la cual arrojaron los resultados las cuales fueron menor número de raíces 12-A, Sani imilla, ING (Imilla negra), Morena, 6-B y Bol 1207 las cuales tienen una media de 3,29 a 4,67 de número de raíces por vitro planta y el mayor número de raíces conformado por las accesiones Yungay y Vera con una media de 6,10 a 6,75 de número de raíces por vitro planta. Resultados que refuerzan la investigación del autor (Gutiérrez Quispe, 2009). Los mismos no concuerdan con los autores de la segunda investigación ya que la interacción de ambos factores (accesión y medio de conservación) es significativa.

Conclusiones

La conservación de germoplasma de papa in vitro varía según el nivel de estabilizadores osmóticos que se añada en el medio de cultivo.

El porcentaje de sobrevivencia en el medio de conservación 2 presento mejores porcentajes en todas las accesiones con un promedio de 78% de sobrevivencia seguido del medio de conservación 3 con un promedio de sobrevivencia de 76% el medio de conservación 1 tuvo un promedio de 48% de sobrevivencia siendo ésta muy baja.

Se concluye que las accesiones mostraron preferencia en el medio de conservación 1 con un promedio de altura de 17,39 mm. Las accesiones que mostraron preferencia en este medio de conservación fueron Chiar Imilla y Vera con una media de 24,48 mm y 25,56 mm En medio de conservación 3 con un promedio de altura de 20,81 mm las accesiones ING (Imilla negra), Bol 1207, Yungay, Sani imilla, 6-B con alturas de 18,35 mm a 23,95 mm.

En cuanto el número de hojas en el medio de conservación el M1 fue quien tuvo menor número de hojas con una media de 6,75 hojas de todas las accesiones Chiar Imilla y Vera con medias de 6,75 y 8,75 hojas. En el medio de conservación 3 se obtuvieron medias de 8,03 y 8,35 hojas las accesiones ING (Imilla negra), Bol 1207, Yungay, Sani imilla, y 6-B con una media de 7 a 9 hojas.

En el número de raíces se concluye que en el medio de conservación 1 se obtuvieron menor número de raíces en las accesiones con una media de 3.97 raíces siendo las accesiones Chiar Imilla, Bol 1207, Yungay y Vera con una media de 4,25 a 5,50 raíces. El medio de conservación 3 fue el que obtuvo número mayor de raíces en las accesiones con una media de

5,16 raíces siendo las accesiones ING (Imilla negra), Morena, Sani Imilla, Sani imilla, y 6-B con número de 3 a 5 raíces por vitro planta.

Finalmente, se concluye que se obtuvieron óptimos resultados en el porcentaje de contaminación, porcentaje de sobrevivencia y desarrollo en las 10 accesiones de papa en el Medio de conservación con sorbitol al 40% (M3) para la conservación por el método de crecimiento mínimo.

Bibliografía

Aguirre V., G., Pierre B., J., & Leigue A., L. (2016). *Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos*. Cochabamba, Bolivia: Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias.

Calle, M., Vaca, L., & Vicente, J. J. (s.f.). Efecto de tres concentraciones de sales minerales en ocho accesiones de papa (*Solanum Tuberosum*) para la conservación in vitro. *Revista científica de investigación*.

Cedrés Gazo, M., Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo in vitro* (Primera ed.). (U. N. Forestales, Ed.) La Plata: Edulp.

Coca Morante, M. (2012). *Las papas en Bolivia Una representación a la realidad del mejoramiento del cultivo de la papa en Bolivia* (Primera ed.). Cochabamba, Bolivia. Recuperado el 22 de Marzo de 2017, de <https://redepapa.org/2012/10/08/las-papas-en-bolivia/>

Coca Morante, M. (2012). Una mirada al cultivo de la papa en Bolivia. En U. M. Simón (Ed.), *Las papas en Bolivia Una representación*

a la realidad del mejoramiento del cultivo de la papa en Bolivia. Cochabamba.

Coca Morante, M. (21 de 04 de 2015). Estado actual de la producción de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la región andina. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 19(1), 59. Obtenido de file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-EstadoActualDeLaProduccionDePapaSolanumTuberosumLE-5512102%20(1).pdf

EcuRed. (s.f.). Recuperado el 2017 de Mayo de 7, de https://www.ecured.cu/Medios_de_cultivo_para_la_propagaci%C3%B3n_in_vitro

Eloy, L. M. (2012). Conservación in vitro de germoplasma de papas nativas de pulpa de color de la Región La Libertad, Peru. En *REBIOL REVISTA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA*. Trujillo: LA ESCUELA DE SEGUNDA ESPECIALIDAD DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Espinoza, N., Lizárraga, R., Sigueñas, C., Buitrón, F., Bryan, J., & Doods, J. H. (1992). *CULTIVOS DE TEJIDOS: MICROPROPAGACIÓN, CONSERVACIÓN Y EXPORTACION DE GRAMOPLASMA DE PAPA*. Lima: CIP.

Evans, D., Shar, W., Ammirato, P., & Yamada, Y. (1984). *Handbook of plant cell culture, techniques and applications*. Nueva York: Macmillan Publishig.

FAO. (2011). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura*. Recuperado el 29 de Marzo de 2017, de <http://www.fao.org/wiews/glossary/es/>

Gabriel, J., Pereira, R., & Gandarillas, A. (2011). *Catálogo de Nuevas Variedades de Papa en Bolivia*. Cochabamba, Bolivia.

García Aguila, L., de Feria, M., & Acosta, K. (2007). Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Bioteecnología Vegetal*, 7(2), 68.

gutierrez quispe, d. n. (2009). *comportamiento morfológico y conservación in vitro de diez genotipos comerciales de papa (solanum sp.) procedentes de las provincias: aroma, ingavi y los andes*. universidad mayor de san andrés facultad de agronomía carrera de ingeniería agronómica, la paz, bolivia.

Herrera F., R. (11 de 8 de 2011). *Club Gourmet de Bolivia*. Obtenido de Club Gourmet de Bolivia: <http://clubgourmetdebolivia.blogspot.com/2011/08/tesoro-de-los-andes.html>

Hurtado, D., & Merino, M. (1994). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Ediciones Trillas.

Igarza Castro, J., Agramonte, D., Alvarado Capo, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla. *Biotecnología Vegetal*, 12(1), 5.

Igarza Catro, J., Agramonte, D., Alvarado Capo, Y., de Feria, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12, 3.

Inostroza F., J., Méndez L., P., & Sotomayor T., L. (2009). I. BOTÁNICA Y MORFOLOGÍA DE LA PAPA. En *Manual de papa La Araucanía Manejo y Plantación* (págs. 7-13). Torruco, Chile: Instituto de Investigación Agropecuaria, Ministerio de Agricultura Centro Regional Carillanca.

Páez de Cáseres, J., & Gonzáles, R. (2002). Conservación In Vitro de Dos Variedades de Papa (*Solanum tuberosum* L.) Bajo Condiciones de Crecimiento Mínimo. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 13, 125-132.

Patiño Valera, F. (1997). CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS. En *RECURSOS GENÉTICOS DE Swietenia Y Cedrela EN LOS NEOTROPICOS*. Roma, Italia.

<http://www.fao.org/3/ad111s/AD111S00.htm#TOC>

Paéz, O., & Gómez, L. (1996). *EFFECTO DEL MANITOL SOBRE EL CRECIMIENTO in vitro Y REGENERACION POSTERIOR DE PLANTAS DE TRES VARIEDADES DE PAPA*. Centro de Investigaciones Agronómicas, Laboratorio de fisiología Vegetal, Costa Rica.

PROBIOTEK. (s.f.). Recuperado el 29 de Marzo de 2017, de <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>

PROINPA. (1994). *CATALOGO BOLIVIANO DE CULTIVARES DE PAPA NATIVA* (Vol. 2). Cochabamba, Bolivia.

PROINPA. (2001). En *Una Herencia de Bolivia para el Mundo* (pág. 2). Cochabamba, Bolivia.

Reid, W., & Miller, K. (1989). *Keeping Options Alive, The Scientific Basis for Conserving Biodiversity*. World Resources Institute, Washington.

Rivas Cancino, G. (2016). Cultivo In Vitro de Células y Tejido Vegetal. *Intagri*, 1. Recuperado el 11 de Mayo de 2017.

<https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>

SEPA-PASA-MDRyT-CAN. (2010). *Análisis crítico de un programa de producción de papa nativa con pequeños agricultores*. Cochabamba. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/52123084/Analisis-critico-de-un-programa-de-produccion-de-papas>

nativas-en-Bolivia-con-pequenos-agricultores-
PowerPoint

Toledo , J., Espinoza, N., & Golmirzaie, A. (1998). *CULTIVO DE TEJIDO Manejo de Plántulas In Vitro en la Producción de Semillas de Papa*. CIP.

Ugarte, M. L., & Iriarte, V. (s.f.). *PAPAS BOLIVIANAS Catalogo de Cien Variedades Nativas*. Cochabamba. Recuperado el 20 de Mayo de 2017

Willian, R. (1991). Almacenamiento de semillas. En *Guía para la manipulación de semillas forestales* (Vol. 20). Roma: MONTES. Obtenido de <http://www.fao.org/3/AD232S/ad232s00.htm#TOC>

Zeballos H., H., Balderrama C., F., Condori A., B., & Blajos K., J. (2009). *Economía de la papa en Bolivia*. Cochabamba, Bolivia: Fundación PROINPA.

Zeballos H., H., Balderrama C., F., Condori A., B., & Blajos K., J. (2009). *Economía de la papa en Bolivia (1998-2007)*. Cochabamba, Bolivia: Fundación PROINPA.