

EFFECTO DE UN COMPLEJO VITAMÍNICO Y DE LA DENSIDAD DE PLÁNTULAS EN EL DESARROLLO *IN VITRO* Y EN INVERNADERO DE LA VARIEDAD DE PAPA ALPHA (*Solanum tuberosum*, *ssp. tuberosum*).

Gonzalo Durán Pacheco*, Neiza Sotomayor, Teresa Ávila Alba**, Carol Rocabado***



* Biólogo-Estadístico, Centro de Estadística Aplicada CESA, Universidad Mayor de San Simón, Calle Sucre y Parque la Torre Cochabamba, Bolivia: Telf: +591 4 4543193, e-mail: gonzalo_dp@hotmail.com.

**

Centro de Investigaciones Fito-Ecogenéticas de Pairumani, Cochabamba Bolivia.

Unidad de Producción de Semilla de Papa UPS-SEPA; Canton El Paso, Cochabamba Bolivia.

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo con el propósito de determinar el efecto de un complejo vitamínico (Murashige & Skoog, 1962) y de la densidad de yemas sobre el desarrollo *in vitro* y en invernadero de la variedad de papa Alpha, con fines de mejorar la producción de vitro-plantas en la producción de semilla prebásica de esta variedad. Tres concentraciones del stock de vitaminas de Murashige & Skoog se adicionaron a medios de cultivo (0, 10 y 20 ml/lit), así como tres densidades de siembra de plántulas al momento de la micropropagación (16, 20 y 25 yemas/magenta). Los tratamientos se evaluaron según un diseño factorial completamente aleatorio tanto en la fase de laboratorio como en invernadero. Se encontró el mayor porcentaje de brotación con 16 yemas/magenta en medios sin vitaminas, aunque se advirtió que la brotación aumenta con el incremento de la densidad cuando el medio tiene 10 ml de vitaminas. La disminución de la densidad incrementó el factor de multiplicación, así como el número de plantas adecuadas para el trasplante. A no ser la influencia del complejo vitamínico que contribuyó al vigor de las plántulas mejorando su adaptabilidad a invernadero, no se observaron efectos significativos de los factores aplicados *in vitro* sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de la variedad Alpha en invernadero.

INTRODUCCION.

Desde que se postuló la teoría de la totipotencialidad celular en el siglo pasado (Schwan, 1839: citado por Doods & Roberts, 1988), se realizaron investigaciones en busca de las condiciones ideales, los nutrientes que deben incorporarse, así como sus concentraciones en las mezclas nutritivas para que las células, tejidos u órganos puedan desarrollar fuera de su ambiente natural (Doods & Roberts, 1988). Entre los componentes descubiertos, considerados como indispensables en el cultivo de tejidos están: los reguladores de crecimiento, las sales minerales, fuentes de soporte y fuentes de carbono (Caplin & Withe, 1939; Merino, 1988; Torres, 1989). Sin embargo, existen otros, valuados como nutrientes orgánicos suplementarios no indispensables, pero con importancia en el desarrollo de tejidos *in vitro* de muchas especies. Entre estos se encuentran: los aminoácidos y amidas, las vitaminas, las bases nitrogenadas, etc, cuya importancia sobre la fisiología y metabolismo de las células vegetales es bien conocida (Salisbury, 1994; Huang & Murashige, 1977). De este grupo, las vitaminas han sido fuente de estudios en el cultivo de tejidos (Murashige & Skoog, 1962; Erikson, 1965; Digby & Skoog, 1966; Gambord *et al*, 1976; Huang & Murashige, 1977; Gambord & Shyluk, 1981), a pesar de conocerse

desde hace bastante tiempo que las plantas pueden producir sus propias vitaminas (Yakovlik, 1937; Hawk, 1949). Como resultado de todas aquellas investigaciones se pudo concluir que los requerimientos de vitaminas (entre otros nutrientes suplementarios) en condiciones *in vitro*, eran diferentes a los de una planta en su medio normal, puesto que el medio *in vitro* no proporciona a la planta las sustancias elementales y precursores a partir de los cuales la planta sintetiza las vitaminas (Biotol, 1994). Por esto, los medios nutritivos de muchas especies contienen vitaminas y otros nutrientes orgánicos.

Por otro lado, las condiciones físicas de crecimiento como la temperatura, pH, luz, densidad de explantes y otros, han sido también fuente de investigaciones. Entre estos, la cantidad de explantes o densidad de individuos capaces de desarrollarse con una cantidad determinada de nutrientes (George & Sherrington, 1984), responde al fenómeno de competencia biológica entre explantes; una interacción provocada por la necesidad común de un recurso limitado, y conducente a la reducción de la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción de los individuos competidores (Begon *et al*, 1987).

En el cultivo *in vitro*, la competencia biológica como densidad ha sido poco estudiada. Se tienen reportes de Toyo & Alvarez (1993), quienes estudiaron la optimización de la densidad de vitroplantas de papa

en condiciones de laboratorio, advirtiéndose que el factor de multiplicación es mayor, cuanto menor sea la densidad de individuos en el recipiente de cultivo. Sin embargo, otros indican que los criterios para establecer la densidad de explantes se toman de la experiencia práctica, teniendo en cuenta el comportamiento de especies afines o simplemente estableciendo una densidad sobre la base de que el explante disponga de una determinada cantidad de medio de cultivo (Pérez, 1998).

En la Unidad de producción de Semilla de Papa (UPS-SEPA), se realizaron ensayos para determinar la influencia de las vitaminas (Complejo vitamínico de Murashige & Skoog y complejo de Gambord) en el cultivo *in vitro* de variedades de papa *andígena* y *tuberosum*, destinadas a la producción de semilla prebásica (SEPA, 1997), llegando a observar una respuesta favorable de las variedades holandesas a las vitaminas y a la disminución de la densidad de plántulas, en cuanto al vigor, homogeneidad de alturas y tasas de multiplicación. En vista a estos resultados, a informes verbales y comunicación personal con otros centros de producción de papa, sobre el efecto de las vitaminas y la densidad de plántulas, es que se realizó el presente trabajo con el objeto de determinar los efectos de los factores mencionados en el desarrollo *in vitro* y su posterior influencia en invernadero en la variedad Alpha (subespecie *tuberosum*), la que se caracteriza por un crecimiento no uniforme, hojas muy grandes lo que evitan que todas las yemas se desarrollen a altas densidades, baja tasa de multiplicación *in vitro*, elevado número de raíces aéreas, aspectos que se traducen en baja productividad de vitro-plantas y mayor cantidad de material vegetal necesario para cubrir los requerimientos de invernadero, debido al alto descarte al momento del transplante.

MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo se lo llevó a cabo en los laboratorios e invernaderos de la Unidad de Producción de Semilla de Papa UPS-SEPA, (Cochabamba, Bolivia). Como material vegetal se utilizaron plántulas *in vitro* de *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* de la variedad Alpha, dichas plántulas provenían de un cultivo ya establecido *in vitro*, y con varias multiplicaciones. Todo el material multiplicado fue de la misma edad. Se consideraron dos fases de estudio, la primera de desarrollo *in vitro* y la segunda de desarrollo de vitro-plantas en invernadero.

Desarrollo *in vitro* : *Diseño experimental, micro propagación y desarrollo de plántulas en laboratorio.*

Los factores en estudio fueron: El complejo de vitaminas de Murashige & Skoog (MS) con tres niveles 0, 10 y 20 ml de la solución stock del mismo por litro de medio de cultivo; y la densidad de explantes con los niveles de 16, 20 y 25 yemas por magenta (envase de cultivo utilizado en UPS-SEPA para la micropropagación). Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de ambos factores dando un total de nueve tratamientos. Se utilizó el Diseño Factorial Completamente Aleatorio con 9

tratamientos y 35 repeticiones por tratamiento. La Unidad Experimental fue una magenta con 25 ml de medio.

Una vez hidratados los componentes del medio de cultivo (composición en Cuadro 1), se añadieron las tres concentraciones del stock de vitaminas de MS (composición en el cuadro 1): 0,10 y 20 ml de stock por litro de medio de cultivo (10 ml del complejo de MS en un litro de medio representan las concentraciones de cada vitamina aconsejadas por Murashige & Skoog (1962), 20 ml representan el doble de cada concentración). Se ajustó el pH a 5.7 con la ayuda de NaOH, para luego agregar y disolver el phytigel. Se dispensaron los 3 medios (con 0, 10 y 20 ml de vitaminas/litro) en los frascos de cultivo (magentas) a razón de 25 ml por frasco. Estos se esterilizaron en autoclave a 120 ° C. y a 15 lb de presión, durante 20 minutos. El material para la micro propagación, como pinzas, escalpelos y hojas de escalpelo, fueron también esterilizados en horno de aire caliente seco a 150 ° C, durante 2 horas.

La micropropagación se realizó en una cámara de flujo laminar de aire estéril y en condiciones asépticas. Con ayuda de pinzas y escalpelos se fueron cortando y transplantando las yemas de las plántulas madre a las magentas nuevas, variando el número de yemas en tres densidades: 16, 20 y 25 yemas/magenta; de manera que cada nivel vitamínico existan las tres densidades de siembra. La selección del medio vitamínico al momento de escoger una densidad fue aleatoria.

Una vez transplantadas, las magentas fueron dispuestas en la cámara de crecimiento con las siguientes condiciones: Temperatura, 18-22 °C; fotoperiodo de 16 horas luz; intensidad lumínica de 2500 lux. El tiempo de incubación bajo estas condiciones fue de 4 semanas. Durante ese periodo, se realizaron las siguientes evaluaciones:

Porcentaje de Brotación: Se contó el número de yemas brotadas a los 15 días del cultivo. Este se lo expresó en porcentaje, (número de yemas brotadas entre el número total de yemas sembradas por 100).

Altura de plántulas a la segunda semana (cm): Se midió la altura alcanzada a los 15 días, desde la superficie del medio de cultivo hasta la yema apical.

Altura de plántulas a la tercera semana (cm): Se evaluó a los 21 días de la misma forma que la variable anterior.

Factor de multiplicación: Esta variable está expresada en número de yemas producidas por magenta (a la cuarta semana), dividido entre el total de yemas sembradas.

Crecimiento en invernadero: *Diseño experimental, transplante y desarrollo de plantas en invernadero.*

Una vez que las plántulas *in vitro* cumplieron 4 semanas en laboratorio, se las transplantó a invernadero en bandejas de madera de 4 metros cuadrados divididas en dos, donde cada mitad fue asignada para un tratamiento. Los tratamientos fueron los mismos que en la primera fase, así como el diseño experimental. La unidad experimental consistió media bandeja con dos metros cuadrados de tierra en la que se transplantaron 100 plantas. Se usó como sustrato una mezcla estéril de dos partes de arena por una de materia orgánica.

Después del transplante se regó inmediatamente para evitar la deshidratación de las plántulas. Se cubrieron las bandejas con mallas semisombra (50% de transparencia). Durante la permanencia y desarrollo de las plantas en el invernadero, se realizaron una serie de actividades de rutina en la producción de semilla prebásica: Aplicación de fertilizantes, Aporque y riego, control fitosanitario, detección de virus, defoliación y otros descritos por Salaués, *et al.* (1999).

Cuadro 1. Componentes del medio de cultivo y del stock de vitaminas de Murashige & Skoog

Medio de cultivo		Stock de vitaminas de Murashige & Skoog	
Componente	Cantidad *	Componente	Cantidad
Sacarosa	30 gr/lit	Tiamina HCL	0.1 mg/lit
Pantotenato de Calcio	200 mgr/lit	Glicina	2.0 mg/lit
Sales Minerales de MS	1 sobre	Ácido Nicotínico	0.5 mg/lit
Ácido Naftalen Acético (ANA) (20ppm)	2 cc	Piridoxina HCL	0.5 mg/lit
Ácido Giberélico (GA3) (250ppm)	2 cc/lit		
Fitagel	1.75gr/lit		

* Composición para un litro de medio de cultivo

Una vez cumplido el ciclo de las plantas en invernadero, se procedió al arranque del follaje y a la cosecha a los 10 días de la defoliación. Se lavaron los tubérculos, se los clasificó por calibre en una mesa de clasificación, obteniendo el peso y número de tubérculos total así como por calibres (para cada unidad experimental). Las características de cada calibre son como sigue. Calibre I: Tubérculos con más de 30 mm de diámetro. Calibre II: 20 – 30 mm de diámetro. Calibre III: 12 – 20 mm de diámetro. Calibre IV: menos de 12 mm de diámetro.

Las variables evaluadas en esta fase fueron:

Número de Plántulas-Transplante: Número total de plántulas requeridas para satisfacer un transplante de 100 plántulas en 2 m² de invernadero (N° de plántulas transplante = N° de vitro-plántulas total – N° de plántulas descartadas). Las características de las plantas vigorosas adecuadas para el transplante fueron: Altura no menos de 2.5 cm, plántulas gruesas; con raíces fuertes, con buen área foliar.

Porcentaje de prendimiento: Se contó el número de plantas prendidas después del aporque, a los 30 días del transplante y se lo expresó en porcentaje.

Altura de plantas: A partir de los 30 días del transplante se midió la altura alcanzada por las plantas, desde la parte superficial del sustrato hasta el ápice. Esta evaluación se repitió cada 10 días (cuatro evaluaciones).

Rendimiento expresado en número de tubérculos y peso de tubérculos: Una vez realizada la cosecha, se pesó y contó el número de tubérculos total y por calibres, para cada unidad experimental.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Luego de la verificación de supuestos, los resultados se analizaron mediante análisis de varianza, contrastes a un grado de libertad y contrastes polinomiales, sobre modelos factoriales saturados fijos, según la teoría de los modelos lineales generales y generalizados (Steel, R.G.D., J. H. Torrie and D.A. Dickey, 1997; Dobson, 1998), en función al tipo de variable de respuesta. Por otro lado se realizó un análisis de superficie de respuesta con el fin de encontrar la combinación de niveles de los factores con la que se obtenga una respuesta óptima. Los análisis se realizaron usando el paquete estadístico SAS, v8.

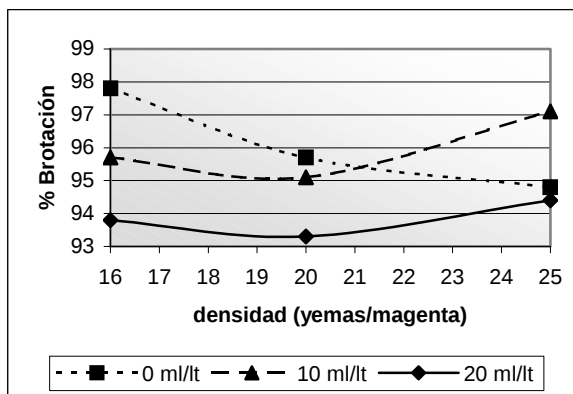
RESULTADOS

Fase *in vitro*.

Ambos factores (vitaminas y densidad) tuvieron efecto sobre el porcentaje de brotación ($Pr>Chi < 0.0001$). No obstante, el efecto de la densidad a la

brotación, dependió de la concentración de vitaminas de MS en el medio ($Pr>Chi < 0.0001$, para el efecto de interacción). Evidentemente, en un medio sin complejo vitamínico, el porcentaje de brotación disminuyó con el aumento de la densidad de individuos. No obstante, al añadir 10 ml de complejo vitamínico, la brotación tiende a aumentar respecto a la densidad, especialmente al ser incrementadas de 20 a 25 yemas/magenta (Figura 1). Finalmente, cuando el medio de cultivo cuenta con 20 ml de vitaminas, el porcentaje de brotación se mantiene constante en las tres densidades, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($Pr>Chi > 0.05$; Figura 1). En promedio se encontró los porcentajes de brotación más altos al usar 0 y 10 ml/lit de vitaminas, significativamente mayores que con 20 ml/lit ($Pr>Chi = 0.0001$).

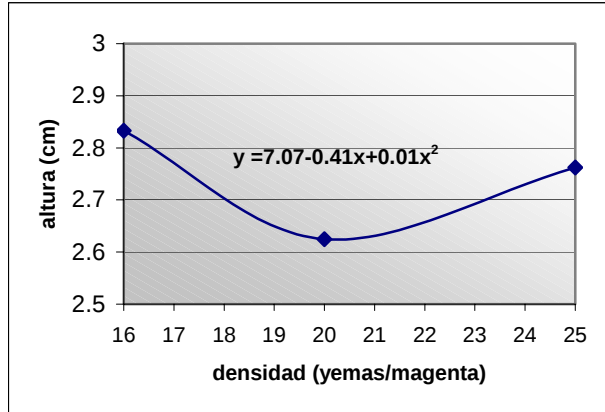
Figura 1. Efecto de la densidad de yemas sobre el porcentaje de brotación *in vitro* de plántulas de papa de la variedad Alpha, con tres cantidades del complejo vitamínico de MS en el medio de cultivo.



La altura de plántulas al momento de evaluar la brotación (15 días después de la siembra), fue influenciada por la densidad de siembra. Este efecto responde a un efecto lineal cuadrático ($Pr>F < 0.05$), disminuyendo la altura de las plántulas linealmente a razón de 0.41 cm/yema-magenta, e incrementando de manera cuadrática a razón de 0.01 cm/yema-magenta² (Figura 2). El efecto de la densidad sobre la altura no se detectó a los 21 días ($Pr>F > 0.05$). Si bien se observó un incremento de altura de 20 a 25 yemas/magenta a los 15 días (Figura 2), este fue en

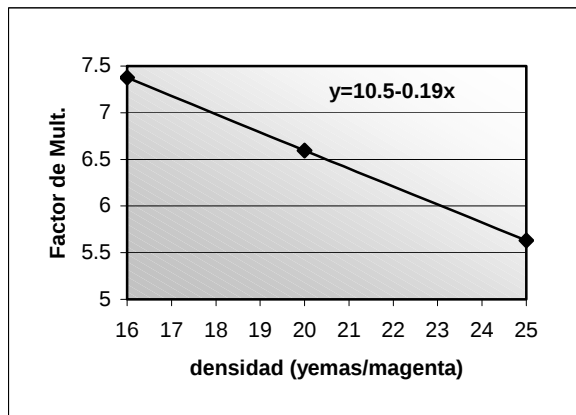
menor grado a los 21, lo que sugiere que la cantidad de explantes influye en la altura de estos solo en los primeros estadios de su crecimiento *in vitro*.

Figura. 2. Efecto de la densidad de siembra sobre la altura de vitro-plántulas de papa de la variedad Alpha de 15 días, de edad.



El factor de multiplicación (FM) fue también influenciado por la densidad de yemas, de forma altamente significativa ($Pr > F = 0.0001$). Se evidenció una disminución lineal del FM con el aumento de la densidad, a razón de 0.194 unidades por cada yema que se añada a la magenta (Figura 3). Lo que sugiere la obtención de FMs más altos a una densidad siembra de 16 yemas/magenta (significativamente mayor a las otras densidades, $Pr > F < 0.05$).

Figura 3. Comportamiento del factor de multiplicación de vitro-plántulas de papa de la variedad Alpha frente a la densidad de individuos en ambas variedades.



En la fase *in vitro* se encontró un efecto de las vitaminas y la densidad sobre el desarrollo de las plántulas *in vitro* de la variedad Alpha. Adicionalmente, se buscó una combinación de ambos factores de manera que se obtenga un desarrollo óptimo de las plántulas para cada una de las variables de respuesta (Cuadro 2), aunque en el caso de la altura de plántulas (15 y 21 días) y del FM solo

se ha observado influencia de la densidad de yemas. De manera general, los resultados sugieren, que se espera obtener un desarrollo óptimo en porcentaje de brotación, altura de plántulas y factor de multiplicación al sembrar 16 yemas/magenta y al utilizar entre 5 a 9 ml de vitaminas por litro de medio de cultivo (Cuadro 2).

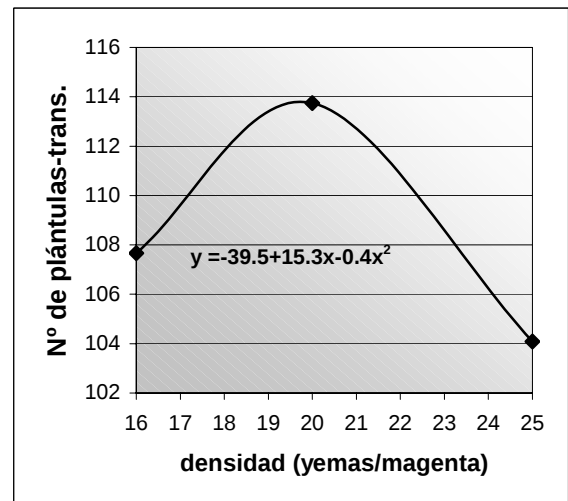
Cuadro 2. Determinación de la combinación de los niveles de densidad y vitaminas con la que se espera obtener una respuesta óptima de tres variables de respuesta evaluadas en la fase *in vitro* (según el análisis de Superficie de respuesta).

Variable	Valor Estimado	Error Estándar	MI/lt de vitaminas de MS	(yemas /mag)
% Brotación	97.9%	0.80742	5.56	16
Altura a los 15 días (cm.)	2.87	0.073587	8.11	16
FM	7.6	0.281997	9.03	16

Fase de invernadero.

El número de vitro-plantas necesarias para llenar una media cama de invernadero (Nº de plántulas transplante), fue diferente según la densidad de siembra *in vitro* ($Pr > F = 0.002$). En forma general este efecto se lo puede caracterizar mediante una relación lineal cuadrática (Figura 4), en la que existe un incremento lineal del número de plántulas transplante a razón de 15.3 plántulas por cada yema/magenta incrementada; y una disminución cuadrática posterior de 0.4 plántulas por (yema/magenta)² (Figura 4).

Figura 4. Efecto de la densidad de cultivo *in vitro*, sobre el número de plántulas asignadas para el transplante en invernadero.



Este resultado implica que el descarte de plántulas de densidades 16 y 25 yemas/magenta

(estadísticamente similares; $Pr > F > 0.05$), fue menor que con la densidad intermedia.

Por otro lado, se observó un efecto lineal inverso del complejo vitamínico, ya que el número de plántulas trasplante disminuye a razón de 0.3 plántulas por ml de complejo vitamínico (figura no mostrada). No se observaron efectos de interacción entre los factores.

La evaluación del prendimiento en invernadero mostró que las plántulas provenientes de medios con 10 y 20 ml de vitaminas/lt obtuvieron porcentajes de prendimiento estadísticamente mayores que las que no tenían vitaminas ($Pr > Chi < 0.05$). En general se punteó que el % de prendimiento en invernadero

aumenta con las vitaminas, aunque este no es significativo al pasar de 10 a 20 ml/lt.

En cuanto a la altura de las plantas en invernadero, se percató que éste fue homogéneo respecto a los tratamientos aplicados *in vitro*. No se encontraron efectos significativos de ninguno de los factores ni de su interacción en las cuatro evaluaciones realizadas durante la permanencia de las plantas en invernadero.

El rendimiento total en número de tubérculos y en peso/m², así como por calibre se reportan en el cuadro 3. Se evidenció que ninguno de estos rendimientos fue influenciado por los factores en estudio ($Pr > F > 0.05$ en todos los casos).

Cuadro 3. Rendimiento en peso y número de tubérculos/m² total y por calibres de plantas provenientes de 9 tratamientos *in vitro*.

Tratamiento	Total		Calibres							
			I		II		III		IV	
	Peso (kg)	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.
Vit 0 Dens16	10.06	535	2.89	45	5.30	195	1.41	132	0.46	162
Vit 0 Dens 20	9.57	520	2.91	48	4.62	155	1.54	147	0.52	170
Vit 0 Dens 25	10.32	514	3.77	58	4.50	172	1.41	124	0.63	161
Vit 10 Dens16	10.21	460	3.75	57	4.67	161	1.27	111	0.51	131
Vit10 Dens 20	9.70	513	2.94	48	5.00	180	1.32	133	0.44	151
Vit10 Dens 25	11.07	532	3.41	49	5.16	172	1.77	149	0.72	162
Vit20 Dens 16	10.70	553	3.77	56	5.02	187	1.37	139	0.52	170
Vit20 Dens 20	9.97	512	2.24	48	4.96	194	1.32	137	0.45	132
Vit20 Dens 25	9.51	515	3.09	48	4.76	183	1.25	125	0.41	159

DISCUSIÓN

Las vitaminas y la densidad influyeron en el desarrollo *in vitro* de las plántulas de la variedad Alpha en diferentes maneras. Esta influencia se manifestó como: un efecto interactivo de ambos sobre la brotación de explantes, un efecto solo de la densidad en la altura, el cual deja de ser importante con el tiempo, y una influencia trascendental de la densidad sobre el factor de multiplicación.

En el caso de la brotación, se pudo evidenciar la importancia de la densidad solo cuando el medio contiene un suplemento vitamínico intermedio (10 ml/lt), ya que cuando no se tiene, el nivel de brotación disminuye con el aumento de la densidad. Esto es atribuible a un efecto de competencia entre yemas, el cual se acentúa con el número de competidores, sobre todo cuando el medio en que se desarrollan no cuenta con nutrientes suplementarios (Begon *et al.*, 1987). Por el contrario, cuando el medio contaba con 10 ml/lt de vitaminas, el nivel de brotación aumentó con la densidad. Vale remarcar que esta concentración de vitaminas es la recomendada por Murashige & Skoog (1962). El efecto encontrado al adicionar 20 ml al medio fue similar en las tres densidades; no

obstante, significativamente menor que con las concentraciones anteriores. Se atribuye este resultado a una sobre dotación vitamínica. En realidad, las vitaminas al cumplir funciones catalíticas son requeridas en pequeñas cantidades. Al ser suministradas en cantidades elevadas pueden tener efectos negativos (Doods & Roberts, 1988).

En cuanto al efecto de la densidad de siembra sobre la altura, se evidenció que es de naturaleza lineal cuadrático, obteniendo las plantas más altas con 16 y 25 yemas/magenta. No se constató un efecto del complejo de vitaminas a diferencia de lo encontrado por Durán *et al.* (2004) en otra variedad de papa *tuberosum* (Romano), quienes apreciaron una influencia negativa del complejo de MS sobre la altura de plántulas de 15 días, explicada también por una función lineal cuadrática. No se encontró efectos interactivos; no obstante, Durán (2000) descompone el efecto de la densidad según las tres concentraciones de vitaminas en estudio, advirtiendo que mientras mayor sea la concentración de vitaminas, la respuesta de la altura a la densidad se asemeja más a la tendencia observada al analizar la densidad como efecto principal (independiente de las vitaminas).

Una de las variables más importantes desde el punto de vista de la producción masiva de plántulas *in vitro*, es el factor de multiplicación. El efecto inverso de la densidad sobre el FM concuerda con los resultados de Toyo y Álvarez (1993), quienes concluyeron que el FM en papa es mayor en tanto menor sea la densidad de explantes. Este resultado propone utilizar en nuestro caso, la densidad de 16 yemas/magenta para lograr un FM por encima de 7, respecto a 3 – 4 reportados para esta variedad por UPS-SEPA, sembrando 25 yemas/magenta (SEPA, 1997).

El análisis del número de plantas trasplante muestra que se puede lograr menor descarte de plantas tanto con la menor como la mayor densidad de explantes. La no adición de vitaminas fue también encontrada favorable para disminuir el número de descartes al trasplante. Durán, *et al.* (2004), encontraron un efecto de densidad diferente con la variedad Romano, para esta variable. Indican que el número de plántulas trasplante de esta variedad aumenta con la densidad, existiendo menor descarte solo con la menor densidad y no así con la mayor.

El prendimiento de plantas en invernadero fue mayor en plántulas provenientes de medios con vitaminas, no existiendo diferencias entre las que tuvieron una adición de 10 con las de 20 ml de vitaminas. Durán (2000), analiza el efecto de las vitaminas, según la densidad con que se inocularon. Encontró los mejores niveles de prendimiento de plantas de Alpha con 10 ml/lit de vitaminas, con densidades de 16 y 20 yemas magenta, y no así con 25 yemas magenta.

No se encontraron efectos de los tratamientos aplicados *in vitro* sobre la altura de plantas en invernadero, ni en el rendimiento en número y peso de tubérculos. Se piensa que las plantas de esta variedad, una vez que se estabilizan metabólicamente son independientes del medio de cultivo *in vitro* pasando a depender del ambiente. Sánchez (1996), verificó esta aseveración al probar el efecto de medios *in vitro* en el crecimiento en invernadero de variedades de la subespecie *tuberosum*, observando ninguna respuesta diferencial. Sin embargo, Trigo (1994), en variedades andígena, reportó efectos significativos del medio de cultivo *in vitro* hasta los 42-45 días. Del mismo modo Durán, *et al.* (2004) reportan efectos significativos de la densidad *in vitro* sobre la altura de plantas en invernadero y en el rendimiento en número de tubérculos, que fue atribuido a un efecto indirecto del porcentaje de prendimiento.

Finalmente, basándonos por un lado, en los resultados encontrados en cada una de las etapas del desarrollo de las plántulas *in vitro* y plantas en invernadero, y por otro, asumiendo el sistema de producción estacional rotativo que SEPA da a las diferentes variedades de papa, se recomienda sembrar 16 yemas/magenta durante las primeras semanas del ciclo de producción de vitro-plántulas

de esta variedad, fase de multiplicación masiva *in vitro* del material, aprovechando así el factor de multiplicación óptimo que puede obtenerse con esta densidad, en las primeras generaciones de plántulas. Antes del trasplante se recomienda sembrar el último stock de vitro-plantas a 25 yemas/magenta como fase preparatoria al trasplante a invernadero, de manera que se garantice un mínimo descarte. Se recomienda también la adición definitiva de 10 ml de stock de vitaminas de MS en esta variedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEGON, M.; L. J. HARPER & C. L. TOWNSEND 1987 Ecología: Individuos, Poblaciones y Comunidades. Ed. Omega S. A. Barcelona España. pp. 680-710.
- BIOTOL (Project Biotechnology by open learning) 1994 *In vitro* Cultivation of Plant cells. Open Universiteit. The Netherlands and University of Greenwich, Butterworth-Heinemann Martins. The printers. Gran Bretaña pp. 40-62. 199 p.
- CAPLIN, S. M. & F. C. STEWART 1948 Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.
- DIGBY, J. & F. SKOOG 1966 Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* 41: 647-652.
- DOBSON, A. J. 1997 An introduction to generalized linear models. Chapman & Hall, Great Britain.
- DOODS, J. H. & L. W. ROBERTS 1988 Experiments in *Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press Cambridge. 231 pag.
- DURAN, P. G. 2000 Efecto de un complejo vitamínico y de la densidad de plántulas en el desarrollo *in vitro* y en invernadero de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). Tesis de licenciatura en biología. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba Bolivia. 100 p.
- DURAN, P. G.; T. AVILA A; & C. ROCABADO, 2004 Las Vitaminas de Murashige & Skoog, y la densidad de inóculo *in vitro* sobre el crecimiento de la variedad de papa Romano (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*). En las memorias del XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Cochabamba Bolivia.
- ERIKSSON, T. 1965 Studies on the growth requirements and growth measurements of *Haplopappus gracilis*. *Plant Physiol.* 62: 885-888.
- GAMBORD, O. L. & P. J. SHYLUK 1981 Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue culture: In plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. Ed. T. A. Thorpe, pp. 21-44. New York Academics.
- GAMBORD, O. L.; T. MURASHIGE, T. A. THORPE; & I. K. VASIL 1976 Plant tissue culture media. *In vitro* 12: 473-478.

- GEORGE, F. E. & D. P. SHERRINGTON 1984 Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial labs. 690 p
- HAWK, P.B. 1949 Química Fisiológica. Ed. Interamericana México. pp. 958-1113
- HUANG, L. C. & T. MURASHIGE, 1977 Plant tissue culture media. Major constituents. Their preparations, some applications. *Tissue Culture Assoc. Manual*. 3: 539-548.
- MERINO, M. 1988 Medio de cultivo. Ed. Hurtado, D.V.; Merino, M.U. México D. F. Ed. Trillas. pp. 67-85.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG 1962 A Revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*. 15: 437-497.
- PEREZ, P. J. N. 1998 Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología vegetal. Instituto de Biotecnología de las plantas. Ed. GEO. Santa Clara Cuba. pp. s/p.
- SALAUÉS, R.; C. Rocabado & D. Blanc 1999 La Producción de Semilla Prebásica. Unidad de Producción de Semilla de Papa, SEPA. Cochabamba Bolivia. 57 p.
- SALISBURY, F. & C. ROSS 1994 Fisiología Vegetal. Ed. Iberoamericana Nebraska. México.
- SÁNCHEZ, P. G. 1996 Desarrollo de tres variedades de papa en tres medios de cultivo *in vitro*, y su comportamiento en invernadero. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias Forestales y Veterinaria, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba Bolivia. pp. 7-9, 43, 46-88.
- SEPA 1997 Informe de evaluación interna. Campaña agrícola 1996-1997. Cochabamba Bolivia. pp. 14-15.
- STEEL, R.G.D., J. H. TORRIE and D.A. DICKEY 1997 Principles and procedures of statistics a biometrical approach. Mc.Graw-Hill.
- TORRES, C. K. 1989 Tissue culture Techniques for Horticultural crops. Ed. Van Nostrand Reinhold New York – The United States. pp. 27-29.
- TOYO, H. & G. ALVAREZ 1993 Estudio óptimo de la densidad de vitroplantas de papa en condiciones de laboratorio. XVI Reunión Latinoamericana de la Papa. Santo Domingo, Rep. Dominicana. pp. 71.
- TRIGO, T. J. M. 1994 Evaluación en invernadero de plántulas de dos variedades de papa, provenientes de diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis de grado para obtener el título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba Bolivia. pp. 13-15, 23-29, 56-100.
- WITHE, P. R. 1934 Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol*, 9: 585-600.
- YAKOVLIK, G. 1937 Estudio sobre las vitaminas. Ministerio de Agricultura Colonización e Inmigración. La Paz Bolivia.