

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*).

Gonzalo Durán Pacheco*, 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

Se estudió el efecto del complejo vitamínico de MS (Murashige & Skoog) y la densidad de inóculo *in vitro*, sobre el desarrollo en laboratorio y su posterior crecimiento en invernadero de la variedad de papa Romano, con el fin de mejorar la calidad de plántulas *in vitro* destinadas a la producción de semilla prebásica, en vista a haberse reportado características de baja calidad de estas plántulas respecto a otras variedades. Se consideraron tres concentraciones del complejo de MS (0, 10 y 20 ml de stok/lt), y tres densidades de inóculo (16, 20 y 25 yemas/magenta), las que fueron evaluadas según un diseño factorial completamente aleatorio, tanto en laboratorio como en invernadero. Se encontró que con una densidad de 20 yemas/magenta tanto con 0 como con 20 ml/l de vitaminas se obtienen los menores porcentajes de brotación. Las vitaminas influyeron negativamente en la altura de las plántulas al suministrarse en grandes cantidades, aunque este efecto disminuye con el tiempo. El factor de multiplicación tiende a disminuir con el incremento de la densidad de inóculo. La densidad *in vitro* tuvo también efecto sobre del número de plantas trasplante, aumentando éste con el aumento de la densidad. No se encontraron efectos sobre el prendimiento en invernadero; no obstante, sí un efecto negativo de la densidad *in vitro* sobre la altura de plantas, así como un efecto positivo de esta sobre el rendimiento en número de tubérculos total y en número de tubérculos del calibre IV.

INTRODUCCION.

Las vitaminas en el cultivo de tejidos han sido consideradas como nutrientes orgánicos suplementarios no indispensables para el desarrollo de la planta; no obstante, su inclusión en el medio *in vitro* ha determinado mejoras importantes en la calidad de los tejidos en cultivo. Desde que se hicieran los primeros intentos de cultivo de tejidos por Sacks, Knops y Hamberlandt a fines del siglo XIX (Dodds & Roberts, 1988); han sido diversos los estudios referidos al empleo de vitaminas y otros micronutrientes orgánicos, en la búsqueda de las condiciones ideales del cultivo *in vitro*. Entre los primeros trabajos, se observó que los requerimientos de ciertas sustancias orgánicas en pequeñas cantidades, era satisfecha por suplementos 'no definidos' encontrados en jugos de frutas, extractos de levaduras, caseína hidrolizada, y leche (George & Sherrington, 1984). Por ejemplo, White (1934), al lograr un crecimiento activo en el cultivo de ápices de raíz de tomate con el uso exitoso de sales orgánicas, extracto de levadura y sacarosa en un medio líquido, demostró que el extracto de levadura podía ser sustituido por tres vitaminas del grupo B: Tiamina, Piridoxina y Niacina. Las ventajas de la adición de tiamina sobre el crecimiento, fueron también reportadas por

Bonner y por Robins & Bartley en la década de los treinta (citados por George & Sherrington, 1984, y Torrez, 1989). A esto siguió el descubrimiento de la importancia de la inclusión del ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, mio-inositol, ácido fólico, y otros en las diversas aplicaciones, como la proliferación de tejidos, producción de callos, retardamiento de la proliferación de tejidos en la oscuridad, etc (George & Sherrington, 1984). El estudio del complejo utilizado por White en 1934, y Bonner en 1937-38, fue retomado por varios investigadores, entre los que destacan Murashige y Skoog (MS) (1962), quienes emplearon una mezcla de tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y glicina, así como Gambord *et al.* (1976, 1981), quienes emplearon ácido nicotínico y piridoxina, logrando estimulación en el crecimiento, recomendando en ambos casos la adición de estas al medio nutritivo. Otras investigaciones indican también la importancia de las vitaminas de MS en el cultivo *in vitro* como las de Digby & Skoog (1966) quienes reportaron la importancia de la tiamina en el cultivo de callos, en ausencia de citoquininas. Se encuentra que el ácido nicotínico y la piridoxina son componentes importantes en el desarrollo *in vitro* de *Haplopappus gracilis* (Eriksson, 1965). Reinert (1956), indica que la vitamina B12 es benéfica para el establecimiento de los cultivos de tejidos y células (citado por Krikorian, 1991); (Huang &

Murashige, 1977; Gambord & Shyluk, 1981). Posteriormente, se descubre la utilidad del ácido ascórbico conjuntamente con otros ácidos orgánicos, como antioxidante para aliviar el oscurecimiento de tejidos (Reynolds & Murashige, 1979: citados por Dodds & Roberts, 1988; Pierik, 1990). Entre otras vitaminas estudiadas en el cultivo de tejidos, están el ácido amino-benzoico, la biotina, ácido fólico, pantotenato de calcio, riboflavina (Huang & Murashige, 1977; Gambord & Shyluk, 1981).

En la actualidad, son diversas las opiniones sobre el uso de vitaminas en el cultivo de tejidos, ya que las plantas sintetizan sus propias vitaminas. Algunos, piensan que se debería cuestionar, si la adición frecuente de vitaminas en el cultivo *in vitro* es necesaria (Pierik, 1990). Sin embargo, se conoce que la capacidad biosintética de vitaminas en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, puede ser bastante distinta a la capacidad biosintética en plantas *in vivo*. Por esta razón es que las vitaminas son incluidas en el medio de cultivo de tejidos vegetales (Biotol, 1994; George & Sherrington, 1994). Krikorian (1991), indica que la adición de vitaminas al medio de cultivo, puede ser necesaria hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes.

La densidad de explantes en el cultivo *in vitro* es otro factor que puede repercutir en la calidad del material a ser cultivado. Aunque este haya sido poco estudiado, los criterios para establecer el mismo se toman a veces de la experiencia práctica. Algunos de los factores a ser considerados en la proposición de una densidad de cultivo se pueden citar: el diámetro del recipiente, tiempo que media entre cada subcultivo, la habilidad de la especie para proliferar *in vitro*, volumen interno, transparencia, capacidad de intercambio y forma del recipiente de cultivo, composición y cantidad del medio de cultivo en el recipiente, dimensiones del explante inicial que se utiliza, desarrollo foliar, densidad de luz disponible en las áreas de crecimiento, principalmente (Pérez, 1998). Estos criterios empíricos, aunque a veces resultan, deben tomarse a partir de ensayos y experimentos debidamente evaluados (Pérez, 1998). La no valoración experimental de estos parámetros, puede acarrear múltiples problemas. Una baja densidad ocasiona pérdida de espacio y medio de cultivo, subutilización de recipientes, demanda mayor capacidad de mano de obra, entre otros, mientras que ocasiona un crecimiento limitado de propágulos e insuficiente proliferación, subcultivos más frecuentes, poco desarrollo de los brotes para ser transferidos a la fase de enraizamiento, etc (Pérez, 1998).

En ese sentido, se propuso estudiar el efecto del complejo vitamínico de Murashige & Skoog y la densidad de siembra *in vitro* con el propósito de mejorar la calidad de plántulas *in vitro* de esta

variedad, tanto en su desarrollo en laboratorio como en invernadero.

MATERIALES Y METODOLOGIA.

El presente trabajo se lo realizó en dos fases, una primera fase de micropropagación y desarrollo en laboratorio y una segunda de desarrollo de vitro-plántulas en invernadero, todo en la Unidad de Producción de Semilla de Papa UPSEPA, ubicada en el cantón El Paso de la provincia Quillacollo del departamento de Cochabamba, Bolivia. Se utilizaron plántulas *in vitro* de *Solanum tuberosum subsp. tuberosum* de la variedad Romano, provenientes de un cultivo ya establecido *in vitro*. Todo el material multiplicado fue de la misma edad.

Fase de Desarrollo en Laboratorio. Diseño experimental, micropropagación y evaluación en laboratorio.

Se consideraron como factores de estudio al complejo de vitaminas de Murashige & Skoog (MS: Tiamina HCL, 0.1 mg/lit; Glicina, 2.0 mg/lit; Ácido Nicotínico, 0.5 mg/lit & Piridoxina HCL, 0.5 mg/lit), 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/magenta. Los tratamientos resultaron de la combinación de los niveles de ambos factores dando un total de nueve tratamientos. Se utilizó un diseño factorial 3x3 Completamente Aleatorizado con 9 tratamientos y 35 repeticiones. La Unidad Experimental fue una magenta (envase utilizado en SEPA para la micropropagación).

Se utilizó un medio de cultivo de rutina para esta variedad (ver composición en Durán *et al.* 2004), al cual se adicionó 0, 10 y 20 ml del stock de vitaminas. La micropropagación se realizó en una cámara de flujo laminar de aire estéril, conservando normas estrictas de asepsia. Con ayuda de pinzas y escalpelos se fueron cortando y transplantando las yemas de las plántulas madre a las magentas con medio nuevo, variando el número de yemas en tres densidades (16, 20 y 25 yemas por magenta). La siembra de estas tres densidades fue realizada aleatoriamente en los medios de cultivo con diferentes cantidades de vitaminas. Una vez transplantadas las yemas, se las dispuso 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, Altura de plántulas a la segunda semana (cm), Altura de plántulas a la tercera semana (cm) y Factor de multiplicación, descritas en el artículo adjunto (Durán *et al.*, 2004).

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 vegetal en la que se transplantaron 100 plantas. Se usó como sustrato una mezcla estéril de dos partes de arena por una de materia orgánica.

Las actividades realizadas en el trasplante y durante la permanencia de las plántulas de esta variedad en invernadero, fueron las mismas descritas por Durán, *et al* (2004) en la variedad Alpha, así como las actividades de rutina descritas por Salgues, *et al.* (1999) para la producción de semilla prebásica de papa.

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, Porcentaje de prendimiento, Altura de plantas (tres evaluaciones), Rendimiento expresado en número de tubérculos y peso de tubérculos, todos detallados en Durán, *et al.* (2004).

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, 1997), 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*.

La respuesta del porcentaje de brotación a la densidad de individuos depende de la cantidad del complejo vitamínico en el medio de cultivo ($Pr > Chi < 0.01$). En medios sin vitaminas, el porcentaje de brotación disminuyó significativamente al aumentar la densidad de 16 a 20 yemas/magenta, para volver a subir al incrementar la densidad hasta 25 yemas/magenta (Figura 1). Con 10 ml de vitaminas el porcentaje se mantuvo constante en las tres densidades, mientras que con 20 ml de vitaminas, el comportamiento fue similar a un medio sin vitaminas, con la diferencia que el incremento observado al aumentar la densidad de 20 a 25 yemas/magenta, no es significativo (Figura 1; $Pr > Chi > 0.05$).

Los mejores porcentajes de brotación se obtuvieron en medios sin vitaminas y con densidades de 16 y 25 yemas/magenta. Sin embargo, según el análisis de superficie de respuesta, se espera que el porcentaje de brotación óptimo se encuentre con 10.80 ml de solución stock de vitaminas por litro de medio de cultivo y con una densidad de 16 yemas/magenta (Cuadro 1).

A diferencia de lo encontrado en la variedad Alpha (Durán *et al*, 2004), el complejo de vitaminas fue el único que tuvo efecto significativo en la altura de plántulas de 15 días de edad variedad Romano ($Pr > Chi < 0.05$). La altura tiende a aumentar a razón de 0.027 cm/ml-lt para luego disminuir de forma significativa a razón de 0.0013 cm²/ml-lt (Figura 2). El efecto de las vitaminas de MS desaparece a los 21 días, aunque se observó la misma tendencia (Figura no mostrada).

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

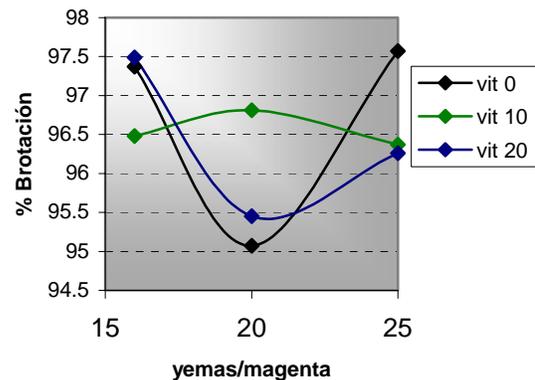
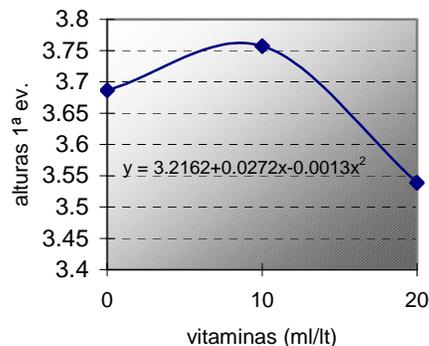


Figura 2. Efecto del complejo de vitaminas de MS sobre la altura de plántulas de la variedad Romano, a los 15 días del inóculo.



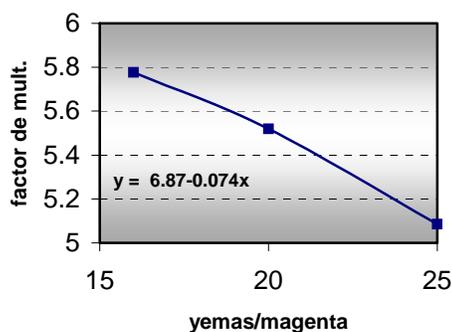
El factor de multiplicación (FM) fue influido significativamente por la densidad de explantes. El FM disminuyó linealmente con el aumento de la densidad a razón de 0.074 unidades por cada yema que se añada en la magenta ($Pr > F = 0.0015$). El mejor factor de multiplicación se lo obtuvo a una densidad de 16 yemas/magenta, que fue significativamente mayor al de las otras densidades (Figura 3).

Por otro lado, el análisis de superficie de respuesta sugiere que el factor de multiplicación óptimo se puede encontrar utilizando 9.2 ml de complejo/lt y con 16 yemas/magenta (Cuadro 1).

Cuadro 1. Determinación de la combinación de los niveles de densidad y vitaminas con la que se espera obtener una respuesta óptima de dos 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	98.1%	0.566065	10.8	16
FM	5.7	0.168624	9.2	16

Figura 3. Efecto del complejo de vitaminas de MS sobre la altura de plántulas de la variedad Romano, a los 15 días del inóculo.



Fase de invernadero.

La densidad de cultivo *in vitro* influyó significativamente en el número de plántulas-transplante (PT's) de esta variedad ($P > \text{Chi} < 0.05$).

Cuadro 2. Rendimiento en peso y número de tubérculos/m² total y por calibres de plantas provenientes de 9 tratamientos *in vitro*.

Tratamiento	Total		Tam. I		Tam. II		Tam. III		Tam. IV	
	Peso *	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.	Peso	Num.
V0 D16	10.36	449	2.19	35	5.17	159	2.27	176	0.30	79
V0 D20	10.32	459	2.31	35	5.46	160	2.40	183	0.29	81
V0 D25	10.00	474	2.10	31	5.20	155	2.53	201	0.30	86
V10 D16	10.50	452	2.41	34	5.62	166	2.46	177	0.35	75
V10 D20	10.14	481	1.54	24	5.92	179	2.42	186	0.31	92
V10 D25	9.90	473	2.04	35	5.44	166	2.32	181	0.31	90
V20 D16	10.33	427	2.61	37	5.77	168	2.14	155	0.4	67
V20 D20	10.35	505	1.72	25	5.50	169	2.86	218	0.35	93
V20 D25	10.20	490	1.55	24	5.59	174	2.55	200	0.32	91

* kg/m².

DISCUSIÓN

La respuesta de la variedad Romano tanto en el desarrollo *in vitro* como en invernadero difiere del reportado por otra variedad de papa también de la misma subespecie (*S. tuberosum*, *subsp.*

Con una densidad de 16 yemas/magenta, se obtuvo el menor número de plántulas-transplante (110 PT's) significativamente diferente a las densidades 20 y 25 (117 y 120 PT's respectivamente). En general, el número de plántulas transplante aumenta linealmente a razón de 1.009 plántulas por cada yema/magenta, al incrementar la densidad *in vitro* ($\text{Pr} > \text{Chi} = 0.0188$). En cambio, ninguno de los factores reportó tener efecto significativo sobre el porcentaje de prendimiento en invernadero ($\text{Pr} > F > 0.05$).

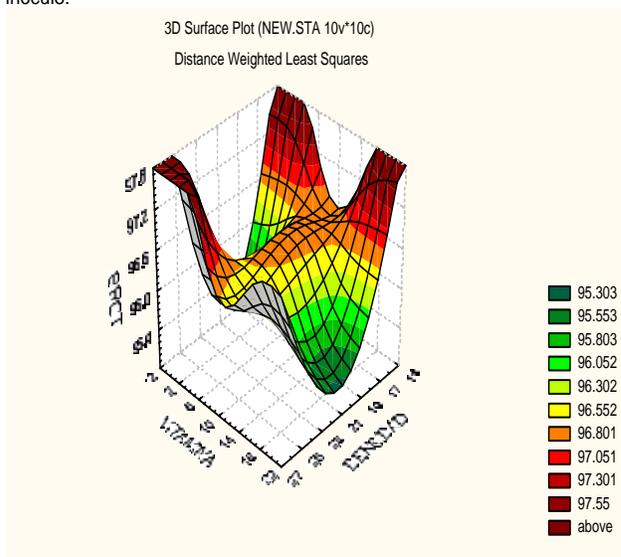
A diferencia de la variedad Alpha, se vio un efecto altamente significativo de la densidad *in vitro* sobre la altura de plantas en invernadero ($\text{Pr} > F < 0.01$). La altura alcanzada por plantas provenientes de la densidad 25 yemas/magenta fue estadísticamente inferior a la altura de las plantas provenientes de densidades de 16 y 20 yemas/magenta ($\text{Pr} > F < 0.01$). En general, se observó que las plantas provenientes de densidades altas *in vitro*, siguieron una tendencia a presentar menor altura en invernadero; no obstante, dicha tendencia no sigue un comportamiento lineal ni cuadrático significativo ($\text{Pr} > F_{\text{Lin}} = 0.642$; $\text{Pr} > F_{\text{Cuad}} = 0.895$).

Al analizar el rendimiento en peso y número de tubérculos, se observó un efecto significativo de la densidad *in vitro* sobre el número total de tubérculos y el número de tubérculos de calibre IV. Un resumen del rendimiento encontrado con los diferentes tratamientos *in vitro* se encuentra en el cuadro 2.

tuberosum) como lo es Alpha (Durán, 2000; Durán et al, 2004). Los resultados reportados en el presente estudio, que muestran un efecto interactivo del complejo de MS con la densidad de inóculo, sugieren la utilización de densidades de inóculo bajas con cantidades moderadas de vitaminas para

obtener una brotación de yemas óptima (Cuadro 1; Figuras 1 y 4), una mayor altura de plántulas, también con el uso de concentraciones moderadas de vitaminas y un factor de multiplicación óptimo con densidades bajas, midiendo una vez más el contenido vitamínico del medio de cultivo (Cuadro 1). En el caso del comportamiento de Romano en invernadero, a diferencia de lo encontrado por Durán, *et al.* (2004) en la variedad Alpha, el incremento de la densidad *in vitro* es quien determina el aumento del número de plántulas-transplante y por ende, del número de plántulas a descartar, en todo caso el efecto de las vitaminas observado en Alpha es completamente inverso al de Romano.

Figura 4. Superficie de respuesta del porcentaje de Brotación *in vitro* respecto a la concentración de vitaminas y a la densidad de inóculo.

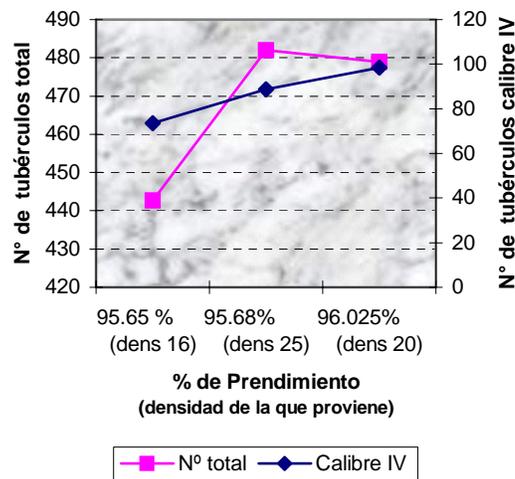


No se observan efectos de los factores *in vitro* sobre el prendimiento de las vitroplantas en invernadero, lo que sí se observa en plantas de la variedad Alpha nutridas *in vitro* con 10 ml del stock de vitaminas. Vale remarcar que no se esperaban efectos de los tratamientos aplicados *in vitro* en el desarrollo de invernadero, puesto que se supone que las características de las plantas no son más que el reflejo de su adaptación al nuevo ambiente, en este caso un invernadero; sin embargo, algunos autores encontraron efectos de diferentes tratamientos aplicados *in vitro* en plantas de papa de la subespecie *andigena* hasta 45 días después de realizado el transplante (Trigo, 1994). En nuestro caso se observó este fenómeno en la altura de plantas al ser afectadas de manera negativa por el incremento de la densidad *in vitro*. Se desconoce el mecanismo por el cual la densidad de explantes *in vitro* haya llegado a tener influencia sobre la altura de plantas en invernadero. Como ya se mencionó anteriormente, las plántulas *in vitro* por lo

general llegan a adaptarse a su nuevo ambiente dejando de depender del medio de cultivo y de las condiciones de laboratorio en las que fueron cultivadas inicialmente.

Otro ejemplo ha sido la influencia de la densidad de inóculo sobre el rendimiento en número de tubérculos total y de calibre IV. Esto significaría que la densidad de individuos *in vitro* influyó en la producción tanto en número de tubérculos total, como en número de tubérculos de calibre IV de esta variedad en invernadero. No obstante, en términos de densidad, se conoce que el rendimiento y el tamaño promedio de tubérculo semilla de papa, esta influido por la densidad de siembra en campo (Garay, 1976; Montaldo, 1984), y el número de tallos (Benítez, 1988; Wiersema, 1987), y no así por la densidad *in vitro*. En todo caso se puede explicar este fenómeno como un efecto indirecto del porcentaje de prendimiento, que vendría a representar la densidad en campo. Se observó que los mayores prendimientos se obtuvieron con plántulas provenientes de densidades altas (20-25 yemas/magenta) (Figura 5). Los mayores rendimientos tanto en número de tubérculos total como en número de tubérculos de calibre IV, correspondieron a plantas provenientes de densidades altas *in vitro* (20-25 yemas/magenta) (Figura 5). Esto concuerda con Garay (1976), Montaldo (1984) Wiersema (1987) y Benitez (1988), pues ellos encontraron que a densidades de siembra altos, la producción de número de tubérculos fue mayor, especialmente en tubérculos pequeños.

Figura 5. Relación de la densidad *in vitro* con el porcentaje de prendimiento y el número de tubérculos total y de calibre IV.



Concluyendo, para aprovechar el efecto de ambos factores en los diferentes periodos de la producción de semilla prebásica de la variedad Romano, se propone aplicar de forma constante una concentración de 10 ml de stock de vitaminas de

MS por litro de medio de cultivo y sembrar a densidades de 16 yemas/magenta al inicio del periodo de micropropagación y multiplicación de plántulas *in vitro* (las primeras semanas) para obtener altos porcentajes de brotación, altura de plántulas deseables y sobre todo garantizar un factor de multiplicación elevado (superior a 3-4 que se reporta para esta variedad; SEPA, 1997). A medida que el stock de vitro-plantas es suficiente para el trasplante (las últimas semanas de la micropropagación), se recomienda cambiar la densidad a 25 yemas/magenta y seguir con 10 ml de vitaminas de MS, garantizando en este caso el menor descarte al trasplante, y buenos porcentajes de prendimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- BENITEZ, B. P. 1988 Siembra en tres densidades, de plantas *in vitro*, esquejes y tubérculos, en dos variedades mejoradas de papa. Tesis de grado. Universidad Central de Ecuador. Quito.
- 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.
- DOBSON, A. J. 1997 An introduction to generalized linear models. Chapman & Hall, Great Britain.
- DIGBY, J. & F. SKOOG 1966 Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* 41: 647-652.
- 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 Efecto 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*). 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 Academic.
- GAMBORD, O. L.; T. MURASHIGE, T. A. THORPE; & I. K. VASIL 1976 *Plant tissue culture media. In vitro* 12: 473-478.
- GARAY, A. 1976 Producción y manejo de semilla de papa. CIP. Lima Perú. 55 p.
- GEORGE, F. E. & D. P. SHERRINGTON 1984 *Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and directory of commercial labs.* 690 p
- HUANG, L. C. & T. MURASHIGE, 1977 *Plant tissue culture media. Major constituents. Their preparations, some applications. Tissue Culture Assoc. Manual.* 3: 539-548.
- KRIKORIAN, A. 1991 Medios de cultivo: Generalidades, Composición y preparación. Ed. Por W. Roca, L. Mroginski. Centro Internacional de Agricultura tropical. Cali –Colombia. pp. 42-70
- MONTALDO, A. 1984 Cultivo y mejoramiento de la papa. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José de Costa Rica. 676 p.
- 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.
- PIERIK, R. L. M. 1990 Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensa. Madridi España. pp. 49-84, 127-133.
- SALAUDES, R.; C. Rocabado & D. Blanc 1999 La Producción de Semilla Prebásica. Unidad de Producción de Semilla de Papa, SEPA. Cochabamba Bolivia. 57 p.
- 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.
- 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.
- WIERSEMA, S. G. 1987 Efecto de la densidad de tallos en la producción de papa. Boletín de información técnica1. CIP. Lima Perú. 16 p.