

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

**“ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE CUATRO MORFOTIPOS DE  
OCA (*Oxalis tuberosa* Mol.) EN CONDICIONES *IN VITRO*”**

**POR  
BETTY MOLLISACA APAZA**

**EL ALTO – BOLIVIA  
Junio, 2013**

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE CUATRO MORFOTIPOS DE  
OCA (*Oxalis tuberosa* Mol.) EN CONDICIONES *IN VITRO*”

*Tesis de Grado presentado como requisito  
para optar el Título de Ingeniero  
en Ingeniería Agronómica*

**BETTY MOLLISACA APAZA**

**Tutor:**

Ing.Ph.D., Félix Marza Mamani .....

**Tribunal Revisor:**

Ing. M.Sc., Celia M. Fernández Chávez .....

Ing. Ph.D., Víctor Hugo Mendoza Condori .....

Ing. Agr. M. Sc., Rubén J. Trigo Riveros .....

.....

**Aprobada**

**Director de Carrera:**

Ing. Ph.D., Humberto Nelson Sainz Mendoza .....

## DEDICATORIA

**A: Dios;** Por ser quien me ha fortalecido y brindado la sabiduría necesaria para alcanzar ésta meta.

**A: MIS PADRES;** Eusebio Mollisaca Gutiérrez y Rosa Apaza de Mollisaca. Por haberme brindado su apoyo incondicional durante mis estudios y el hecho de no dejarme desfallecer en los momentos más difíciles, sus sabios consejos, su paciencia y duro trabajo para alcanzar juntos ésta meta que hoy se hace realidad.

**A: MIS HERMANOS;** Mena, Juan Mario, Daniel Santiago.  
Por su apoyo incondicional, con quienes comparto mis éxitos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Ante todo más sincero reconocimiento y agradecimiento:

A mi asesor Ph. D. Félix Marza, quien con su experiencia de trabajo y dedicación supo encaminar las acciones del presente trabajo.

Al tribunal revisor conformado por el Dr. Víctor Hugo Mendoza, Ing. M.Sc. Celia Fernández y el Ing. Rubén trigo, por sus correcciones oportunas y revisión del presente Trabajo.

A todos los docentes de la Carrera de Ingeniería agronómica de la Universidad Publica El Alto, por haberme colaborado en mi formación profesional.

A mis amigos (as), Hersit, Natividad, Roxana, Bertha, Paola, Félix, Soledad, Roberto, Adelio, Sergio y Marco Martin, Alcides, Luis Fernando y Johnny pocas veces se tiene la suerte de llegar a conocer a personas tan extraordinarias.

A todos mis amigos (as), compañeros de la Universidad, que me brindaron su colaboración con su compañía, amistad y comprensión en el transcurso de mi formación universitaria. En la distancia un saludo cálido a todos ellos sin excepción. Muchas gracias.

Un agradecimiento especial también a la Universidad Pública El Alto.

## CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos Específicos .....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 Recursos Fitogenéticos .....	4
3.1.1 Potencialidades de los Cultivos Andinos .....	5
3.1.2 Erosión Genética .....	5
3.2 Generalidades sobre el Cultivo de Oca .....	5
3.2.1 Origen.....	5
3.2.2 Distribución del Cultivo de la Oca .....	6
3.2.3 Clasificación Taxonómica .....	6
3.2.4 Variabilidad Genética en Oca .....	6
3.2.5 Ploidía .....	7
3.2.6 Descripción Botánica.....	8
3.3 Morfología Vegetativa.....	8
3.3.1 Morfología Floral.....	9
3.3.2 Morfología de Fruto.....	9
3.3.3 Características Agronómicas.....	10
3.4 Superficie Cultivada en Bolivia .....	10
3.5 Valor Nutricional .....	10
3.6 Usos Tradicionales.....	10
3.7 La Biotecnología .....	11
3.8 Cultivo de Tejidos .....	12
3.8.1 Cultivo de Tejidos en Agricultura .....	12
3.9 Cultivo de Tejidos en la Oca.....	13
3.10 Establecimiento <i>In Vitro</i> .....	13
3.11 Micropropagación .....	14
3.12 Etapas de Micropropagación.....	15
3.13 Medios de Cultivo .....	15
3.14 Análisis de Componentes Principales .....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Localización .....	17
4.2 Material de Laboratorio y Equipos.....	17

4.2.1	Material Vegetal.....	17
4.2.2	Material de Vidrio.....	17
4.2.3	Material de Desinfección y Reactivos.....	18
4.3	Sala de Preparación de Medios de Cultivo y Lavado.....	18
4.4	Sala de Trasferencia.....	18
4.5	Sala de Crecimiento.....	18
4.6	Método.....	18
4.6.1	Selección del Material Vegetal.....	18
4.6.2	Preparación de la Solución Madre.....	19
4.6.3	Preparación del Medio de Cultivo.....	19
4.6.4	Fase I: Establecimiento del Material Vegetal.....	21
4.6.5	Fase II: Multiplicación.....	21
4.7	Variables Evaluadas en la Fase de Establecimiento.....	22
4.8	Variables Evaluadas en la Fase de Multiplicación.....	23
4.9	Diseño Experimental.....	24
4.10	Fase de Establecimiento <i>in vitro</i> .....	24
4.11	Fase II Multiplicación <i>in vitro</i> .....	26
4.11.1	Modelo Lineal Aditivo.....	27
4.11.2	Análisis Estadístico.....	27
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	28
5.1	Análisis de Varianza para la Fase de Establecimiento.....	28
5.1.1	Número de Hojas.....	29
5.1.2	Número de Nudos.....	30
5.1.3	Altura de Vitroplanta.....	30
5.2	Análisis Descriptivo para la Fase de Establecimiento.....	31
5.2.1	Porcentaje de Supervivencia.....	31
5.2.2	Porcentaje de Contaminación.....	33
5.2.3	Porcentaje de Oxidación y Fenolización.....	34
5.2.4	Porcentaje de Necrosis.....	35
5.3	Estadística Descriptiva en la fase de Multiplicación.....	36
5.4	Análisis de Varianza.....	37
5.4.1	Número de Hojas.....	38
5.4.2	Número de Nudos.....	39
5.4.3	Altura de Vitroplanta.....	41
5.4.4	Número de Raíz.....	43
5.5	Análisis de Componentes Principales.....	45
5.6	Análisis de Costos.....	47
6.	CONCLUSIONES.....	49
7.	RECOMENDACIONES.....	51
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
	ANEXOS.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Factores en estudio de morfotipos de oca entre posición de meristemos.	24
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos y combinaciones de los factores A y B en la fase I.	25
<b>Tabla 3.</b> Factor de estudio Morfotipos de oca y concentraciones de sales MS (1962).	26
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos y combinaciones de los factores A y B en la fase II.	26
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza para cuatro accesiones de oca y la posición de meristemos (apical, medio y basal), evaluados en laboratorio de biotecnología vegetal.	28
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Duncan para la variable número de hojas en función a factor (A) cuatro accesiones de oca.	29
<b>Tabla 7.</b> Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro accesiones de oca y posición de meristemos (apical, medio y basal).	30
<b>Tabla 8.</b> Estadística descriptiva para variables cuantitativas en el estudio evaluado de multiplicación <i>in vitro</i> de cuatro accesiones de oca en cuatro concentraciones de sales MS (1962).	36
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para variables cuantitativas, número de hoja NH, número de nudos NN, altura de vitroplanta AVP y número de raíz NR, de cuatro accesiones de oca en cuatro concentraciones de MS (1962), evaluado en el laboratorio de biotecnología vegetal UPEA.	37
<b>Tabla 10.</b> Costos parciales para concentraciones sales Murashige Skoog 1962 de cuatro morfotipos de oca en condiciones <i>in vitro</i> .	48
<b>Tabla 11.</b> Medio de cultivo de formulado por Murashige y Skoog (1962).	59
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Duncan para la variable número de Hoja en función a cuatro accesiones de oca.	61
<b>Tabla 13.</b> Prueba de Duncan para la variable número de Hoja en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).	61
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Duncan para la variable número de nudos en función a cuatro accesiones de oca.	61
<b>Tabla 15.</b> Prueba de Duncan para la variable número de nudos en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).	61
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro accesiones de oca.	62
<b>Tabla 17.</b> Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).	62
<b>Tabla 18.</b> Prueba de Duncan para la variable número de raíz en función a cuatro accesiones de oca.	62
<b>Tabla 19.</b> Prueba de Duncan para la variable número de raíz en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).	62
<b>Tabla 20.</b> Costos parciales para concentraciones sales Murashige Skoog 1962 de cuatro morfotipos de oca en condiciones <i>in vitro</i> .	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Resumen de la relación cromosómica de <i>Oxalis tuberosa</i> , que el género <i>Oxalis</i> presenta números básicos de $x= 5, 6, 7, 9$ y $11,12$ lo que indicaría que la oca, sería un <i>hexaploide</i> de $6x = 66$ . Una característica muy importante en el cariotipo de la oca es que presenta cromosomas muy pequeños. La oca es la especie de mayor nivel cromosómico ( $2n= 66$ ), (Emshwille, 2002).	8
<b>Figura 2.</b> Selección del material vegetal para el establecimiento <i>in vitro</i> de cuatro accesiones de Oca; a) cámara de brotación de los tubérculos b) brotes del tubérculo: c) selección del material genético para la investigación.	19
<b>Figura 3.</b> Procedimiento de la preparación del medio de cultivo, en la fase del establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i> de cuatro morfotipos de oca; a) soluciones stock: b) control de pH del medio de cultivo: c) disolución del agar en agitador magnético: d) esterilización del medio de cultivo en autoclave.	20
<b>Figura 4.</b> a) Desinfección de los brotes de oca en Alcohol al 70% y en hipoclorito de sodio al 1% v/v; b) Esterilización bajo luz ultra violeta de los materiales e instrumentos.	20
<b>Figura 5.</b> Establecimiento <i>in vitro</i> del explantes de oca en laboratorio de biotecnología vegetal. a) Escisión del meristemo apical, medio y basal en cama de flujo laminar: b) incubación cámara de crecimiento de los tratamientos en estudio: c) vitroplantas que se desarrollaron después de 7 días del establecimiento.	21
<b>Figura 6.</b> Multiplicación <i>in vitro</i> del explante de oca. a) Incubación de los tratamientos en estudio: b) a los 21 días de la multiplicación: c) número de nudos por vitroplantas	22
<b>Figura 7.</b> Supervivencia de explantes en función a las accesiones y posición de meristemo apical (A) medio (M) y basal (B) durante el establecimiento <i>in vitro</i> de accesiones de oca a los 15 días de evaluación.	32
<b>Figura 8.</b> Contaminación de explantes de las accesiones y posición de meristemas apical (A), medio (M) y basal (B) durante el establecimiento <i>in vitro</i> de accesiones de oca a los 15 días de evaluación.	34
<b>Figura 9.</b> Necrosis de explantes en función a las accesiones y posición de meristemo apical (A), medio (M) y basal (B) durante el establecimiento <i>in vitro</i> en oca a los 15 días de evaluación.	35
<b>Figura 10.</b> Comparación de medias para la variable número de Hojas en función a las accesiones de oca, en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	38
<b>Figura 11.</b> Comparación de medias para la variable número de hojas en función a concentraciones de sales MS, en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> .	38
<b>Figura 12.</b> Comparación de medias para la variable número de nudos en función a las accesiones de oca.	40
<b>Figura 13.</b> Comparación de medias para la variable número de nudos en función a concentraciones de sales MS.	40
<b>Figura 14.</b> Comparación de medias para la variable altura de vitroplanta en función a las accesiones de oca.	42

<b>Figura 15.</b> Comparación de medias para la variable altura de vitroplanta en función a concentraciones de sales MS.	42
<b>Figura 16.</b> Altura de vitroplanta en función a las accesiones de <i>Oxalis tuberosa</i> Mol., durante la multiplicación <i>in vitro</i> de morfotipos de oca a los 40 días de evaluación.	42
<b>Figura 17.</b> Comparación de medias para la variable número de raíz en función a accesiones de oca.	44
<b>Figura 18.</b> Comparación de medias para la variable número de raíz en función a concentraciones de sales MS.	44
<b>Figura 19.</b> Representación de sedimentación de los componentes principales de acuerdo a varianza evaluada de cuatro morfotipos de oca en concentraciones sales MS en la multiplicación <i>in vitro</i> en el laboratorio de biotecnología vegetal carrera ingeniería agronómica UPEA.	45
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Biplot, agrupación de variables de respuesta y componentes principales de cuatro morfotipos de oca en cuatro concentraciones de sales MS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en el laboratorio de biotecnología vegetal. Carrera ingeniería agronómica	46
<b>Figura 21.</b> Diagrama de procedimiento de la investigación.	60

## RESUMEN

La zona andina de Bolivia alberga una diversidad de tubérculos, como la oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), es considerando el segundo cultivo importante después de la papa por su valor nutricional en la alimentación de los pueblos, su producción se ve afectada por la baja calidad de semillas causada por un mal manejo del cultivo, ataque de plagas y enfermedades, también los frecuentes cambios climáticos han ocasionado la erosión genética. La Biotecnología vegetal es una alternativa para las demandas de los productores. La presente investigación tiene como objetivo determinar el comportamiento morfológico de vitroplantas de oca en la fase de establecimiento y la fase de multiplicación se evaluó diferentes concentraciones de sales de MS Murashige y Skoog (1962), evaluados con un diseño completamente al azar con dos factores. Fueron cultivados en medio de cultivo los meristemas (apical, medio y basal). Bajo un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad y una temperatura 10 a 18 °C. Las variables registradas fueron número de hojas, número de nudos, altura de vitroplanta, número de raíz, porcentaje de supervivencia, contaminación, oxidación, fenolización y necrosis. En la fase de establecimiento la Acc-20 tiene un comportamiento sobresaliente. Con respecto a la posición de brotes el meristemo medio y basal desarrolló buenas características morfológicas. En la fase de multiplicación se sembró cuatro accesiones de oca en diferentes concentraciones de sales de MS (40, 60, 80 y 100%), la Acc-14 presento mejor desarrollo de vitroplantas con un promedio de 7,6 hojas, 18,54 nudos, altura de vitroplanta 41,5 mm y 10 raíces. El tratamiento a 40% de concentración favoreció a un mejor desarrollo de las vitroplantas donde formaron 7,14 hojas, 16,54 nudos, 45 mm altura de vitroplanta y 11,43 raíces. Para el análisis de costo el valor más alto de rentabilidad se presentó en la concentración al 40%, por cada 100 bs invertidos se recupera la inversión más un plus de 7,28 bs, para las concentraciones a 80% y 100% se reportó los valores negativos siendo no rentable la producción de vitroplantas, al disminuir las sales MS el costo del medio baja sin afectar la calidad de vitroplantas.

## ABSTRACT

The Andean region of Bolivia is home to a variety of tubers such as oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) is considered the second important crop after potatoes for their nutritional value in the diet of the people, production is affected by the poor quality of seeds caused by poor crop management, pests and diseases, too frequent climate changes have caused genetic erosion. Plant biotechnology is an alternative to the demands of producers. This research aims to determine the morphological behavior of potato plantlets in the establishment phase and the multiplication phase was evaluated different concentrations of MS Murashige and Skoog (1962), analyzed with a completely randomized design with two factors. were grown on MS salts different meristems (apical, middle and basal). Under a photoperiod of 16 hours light, 8 hours dark and temperature 10-18 °C. The variables recorded were number of leaves, number of nodes, vitroplant height, root number, survival rate, contamination, oxidation, phenolization and necrosis. In the establishment phase of the Acc-20 has an outstanding performance. with respect to the position of the meristem medium and low developed good morphological characteristics. In the multiplication seeded accessions of oca four different concentrations of MS salts (40, 60, 80 and 100%), the Acc-14 present further development of plantlets with an average of 7.6 leaves 18 , 54 knots, 41.5 mm height and 10 vitroplant roots. crop with 40% concentration favored better development of the plantlets which formed 7.14 leaves, 16.54 knots, 45 mm height and 11.43 vitroplant roots. For analysis of the highest cost-performance is presented in the concentration to 40% per 100 bs invested investment recovers more 7.28 bs plus. for the concentrations to 80% and 100% was reported negative values being not profitable to produce plantlets, by reducing MS salts medium cost low without affecting the quality of plantlets.

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura constituye un importante pilar en el desarrollo de la humanidad, Bolivia es uno de los países centro de origen y diversidad con mayor cantidad de riqueza genética, la seguridad alimentaria y los recursos fitogenéticos son fundamentales para sostener la vida de un país. El cultivo de oca representa un alto potencial económico para el desarrollo del país, es una planta originaria de los Andes, se cultiva entre los 2,300 y 4,000 msnm., es resistente a bajas temperaturas, crece mejor en suelos sueltos y profundos; se obtienen rendimientos de  $7 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$  y  $52,5 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ , con un manejo adecuado (Fernández, 2008).

En Bolivia la producción de oca ocupa el segundo lugar después de la papa, por su sabor agradable y perspectiva que ofrece para la medicina, la industrialización y su contenido de proteína que es muy variable, está por encima del 9% en la materia seca, del que se obtiene diferentes sabores, aromas, colorantes vegetales, sustancias y elementos activos con cualidades únicas, con una superficie cultivada en el país de 13,000 ha y un rendimiento de  $15 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$  PROINPA (2003). También PROINPA (2001), indica que la colección de oca cuenta con más de 500 accesiones provenientes de la zona andina de los departamentos de La Paz, Cochabamba, Potosí, Oruro, Chuquisaca y Tarija.

El problema que más afecta a la producción y conservación de los tubérculos andinos, es la mala calidad de la semilla (semilla degenerada o cansada), que ocurre debido al uso permanente de semilla infectada con hongos, virus, cuando estos tubérculos infectados se utilizan como semilla en campañas sucesivas, los rendimientos se reducen considerablemente. En algunos casos los agricultores descartan la semilla degenerada y la renuevan por otra, mientras que la mayoría reemplaza las variedades nativas por variedades comerciales ocasionando una pérdida de diversidad.

La biotecnología es una alternativa que coadyuva a satisfacer las demandas de los productores, las técnicas de cultivo de tejidos permiten mantener las vitroplantas en espacios reducidos, en corto tiempo para la producción de semilla pre-básica, conservación de recursos fitogenéticos a largo y corto plazo, Mediante la micropropagación ofrece alternativas para obtener a gran escala plantas elites ya sea a partir de callos, suspensión celular y tejidos. El uso de cultivo de tejidos para desarrollar innovadoras prácticas y protocolos para la recolección *in vitro* de germoplasma vegetal es una alternativa atractiva (IPGRI, 2002).

El presente trabajo está enfocado en la micropropagación de explantes de oca, para establecer un protocolo adecuado para esta especie que contribuirá significativamente al manejo eficiente de los recursos genéticos, estableciendo así una base sólida para el inicio de programas de mejoramiento que permitan alcanzar niveles de productividad acordes a la demanda existente al rubro identificado, además permite obtener material genético de alta calidad libre de enfermedades. En la primera fase (Establecimiento *in vitro*) se evaluó posición de meristemas para determinar el comportamiento de las características morfológicas, en la segunda fase (Multiplicación *in vitro*) se determinó diferentes concentraciones de sales MS para reducir costos de producción e incrementar vitroplantas de calidad. Se utilizó accesiones procedentes de la colección de germoplasma Kallutaca de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública El Alto.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar la fase de establecimiento a partir de tres fuentes de meristemas y la multiplicación *in vitro* de cuatro morfotipos de oca, en cuatro concentraciones de sales MS de Murashige y Skoog (1962).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar el comportamiento morfológico de tres fuentes de meristemas en el establecimiento *in vitro* de cuatro morfotipos de oca.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sales MS (1962) en la fase de multiplicación *in vitro* en oca.
- Determinar el costo beneficio entre niveles de concentración de sales MS, en la fase de multiplicación.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Recursos Fitogenéticos

Los recursos fitogenéticos son fundamentales para una producción agrícola sostenible. En los últimos años los tubérculos alto andinos: Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), papalisa (*Ullucus tuberosus* Caldas) y isaño (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón), han cobrado importancia en los países de Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia, porque constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria del pueblo andino de estos países, por su gran variabilidad genética, potencial de cultivo y como alternativas de producción. Sin embargo, en las últimas décadas estos cultivos corren el riesgo de sufrir erosión genética, por muchos factores como: los cambios en los hábitos de consumo de la población rural y urbana, sustitución de variedades nativas tradicionales por variedades nativas comerciales debido a la influencia del mercado, falta de promoción para su utilización en otros rubros como la industria, entre otros. Para contrarrestar estos riesgos, la Fundación PROINPA realizó actividades concretas dirigidas hacia el manejo y conservación de los recursos genéticos de tubérculos y raíces andinas aplicando una estrategia integrada, basada en la complementariedad de los sistemas *in situ-ex situ* (Cadima, 2003).

Los “recursos fitogenéticos” comprenden la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor para el presente y el futuro. Bajo esta definición se incluyen normalmente las siguientes categorías: variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales; especies silvestre. Constituyen un patrimonio de la humanidad de valor in calculable y su pérdida es un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la estabilidad de los ecosistemas, el desarrollo agrícola y la seguridad alimentaria del mundo (FAO, 2009).

### **3.1.1 Potencialidades de los Cultivos Andinos**

Entre los beneficios potenciales de la aplicación de la biotecnología a los cultivos Andinos, tenemos: aumentar la productividad y reducir los costos de producción con el beneficio respectivo para los consumidores en forma de alimentos de mejor calidad y menor costo, con sabores y aromas naturales potenciados, con almidones de mejor calidad, mayor contenido de aminoácidos esenciales, de aceites de mejor calidad, mayor contenido de sustancias activas curativas; mayor capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, reduciendo la dependencia de fertilizantes químicos; plantas resistentes al ataque de plagas, enfermedades y herbicidas (Mujica y Jacobsen, 2000).

### **3.1.2 Erosión Genética**

La erosión genética ha sido intensa desde el descubrimiento de América, debido principalmente a la sustitución de cultivos locales tradicionales por otros traídos de Europa, esta erosión también se incrementa por efecto de los cambios sociales y la actitud de la gente respecto a los cultivos foráneos, que generaba un prestigio social que conduce a menospreciar los cultivos nativos (Lescano, 1994).

## **3.2 Generalidades sobre el Cultivo de Oca**

### **3.2.1 Origen**

La oca es una especie nativa de al menos 8000 años de antigüedad en la región andina, entre los 2800 – 4000 msnm. Se han encontrado restos en tumbas muy antiguas de la costa, lejos de sus lugares de cultivo. Hoy en día se cultiva en otros países como Nueva Zelanda (Giannoni, 2007).

El padre Jesuita Giovanni Ignacio Molina fue quien hizo la primera descripción taxonómica de la "oca" en 1810. La "oca" es originaria del altiplano peruano-boliviano, su distribución va desde Venezuela, Chile y Argentina. Crece en ambientes templado-fríos, entre los 3000 y 4000 msnm (Giannoni, 2007). Es una planta adaptada al clima de los Andes, produce tubérculos de agradable sabor y alto contenido calórico, siendo así uno de los

alimentos preferidos del poblador andino, por todas estas razones es el tubérculo que más se cultiva después de la papa (Pomar, 2002).

### **3.2.2 Distribución del Cultivo de la Oca**

Lescano (1994), indica que la oca, es uno de los tubérculos más difundidos, se encuentra desde Táchira (Venezuela) hasta las zonas altas del altiplano Chileno y la Provincia de Jujuy (Argentina). La mayor variabilidad de ecotipos se encuentra en los valles interandinos de Cuzco y Ayacucho (Perú) y el altiplano boliviano, considerando estos dos sub-centros de origen. Un tercer Sub centro puede estar centralizado en el Departamento de Cajamarca y el sur Ecuador, por las características particulares de las ocas de esa zona. Es el segundo tubérculo en área de cultivo e importancia en los Andes, después de la papa. Se la puede encontrar en los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, entre los 2500 y 4100 msnm. El límite de altitud con mayor concentración de parcelas y mayor producción está entre los 3000 y 3800 msnm, donde el clima es frío, pero con suficiente precipitación (mayor que 600 mm) y sin la incidencia de heladas extremas

### **3.2.3 Clasificación Taxonómica**

La Clasificación Taxonómica del cultivo de oca según Quispe (1997) y Cárdenas (1989) pertenece al reino vegetal, clase *dicotyledoneae*, orden *Geraniales* a la familia *Oxalidaceae* que incluye ocho géneros. El género *Oxalis* tiene más de 800 especies. La mayor parte se encuentra en Sud América con una gran diversidad de formas y *Oxalis tuberosa* es la única cultivada como especie alimenticia. Los tubérculos son conocidos con los nombres comunes de oca en Bolivia, Perú, Ecuador y Chile; también se conoce como cuiba o quiba en Venezuela, macachin o miquichi en Argentina, huasisaioibi en Colombia, papa extranjera en México y en Nueva Zelanda.

### **3.2.4 Variabilidad Genética en Oca**

Algunas ocas de mayor consumo tanto en Bolivia como en el Perú son: “Kheni”, “Amajaya” y “Allka Rugu” para la elaboración de “Kaya” una deshidratación similar al Chuño, la “Amarilla”, “Alpaca-senka”, señala también algunos otros de gran consumo por

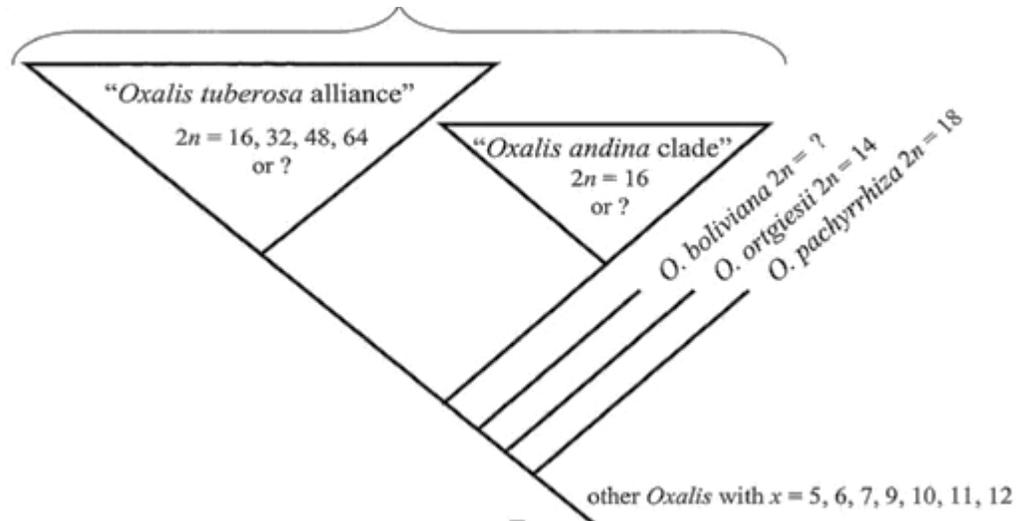
regiones alrededor del lago Titicaca los cuales son: “Paukar-oca” y “Lluccho-oca” de tubérculos rojos, algunos amarillos como “Sapallu. oca” y blancos como “Kaya-oca” (Carpio, 2001).

En La Paz en el altiplano Norte alrededor del lago Titicaca se cultiva variedad de oca las de mayor consumo son la kheni, la amarillas con ojos rojos, wila chismy. Los pobladores lo calcifican de acuerdo al sabor de esta especie, las dulces son para el consumo y secado, en cambio las amargas son para la elaboración de “Kaya” donde sufre un proceso de deshidratación, por el agua seguidamente por la helada.

### **3.2.5 Ploidía**

Es una especie cuyo grado de poliploidismo es muy alto (68 a 70 cromosomas somáticos) por tal motivo, la obtención de clones por vía vegetativa no está tan expuesta a mezclas varietales siendo más fácil su mejoramiento por métodos usuales.

El número básico de cromosomas fue establecido en  $x = 11$ . Existe información sobre ocas próximas a pentaploides ( $2n = 2x = 58$ ) y hexaploides ( $2n = 2x = 66$ ) y también sobre la naturaleza hexaploide de las ocas cultivadas. Nos tiene bien definida la frecuencia de diploides, triploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides, así como de aquellas que no son exactamente euploides. Necesitaría estudiarse el papel de los gametos  $2n$  en la formación del complejo poliploide, así como la naturaleza del material F1 y F2. (Arbizu y Tapia, 1995).



**Figura 1.** Resumen de la relación cromosómica de *Oxalis tuberosa*, que el género *Oxalis* presenta números básicos de  $x = 5, 6, 7, 9$  y  $11, 12$  lo que indicaría que la oca, sería un *hexaploide* de  $6x = 66$ . Una característica muy importante en el cariotipo de la oca es que presenta cromosomas muy pequeños. La oca es la especie de mayor nivel cromosómico ( $2n = 66$ ), (Emshwille, 2002).

### 3.2.6 Descripción Botánica

Es una especie anual, erecta, de 20 a 70 cm, de tallos cilíndricos y succulentos, con ligera pubescencia (presencia de pelos) en el tallo. Las hojas son alternas y trifoliadas como las del trébol; la inflorescencia es muy variable, en todos los casos se produce una sola flor. La oca rara vez produce frutos, pues por lo común las flores se desprenden poco después de abrirse. Su tiempo de crecimiento es de 220 días para las más precoces y de 269 para las más tardías. La tuberización comienza más o menos a los 110 días después de la germinación y el máximo crecimiento de tubérculos ocurre entre los 170 y 230 (Tapia y Fries, 2007).

### 3.3 Morfología Vegetativa

La “oca” es una planta herbácea anual, de crecimiento erecto en las primeras etapas de su desarrollo, decumbente o postrada hacia la madurez. Tubérculos claviformes elipsoidales, cilíndricos, con yemas en toda su superficie y de colores variados: blanco,

amarillo, rojo, morado. Hojas trifoliadas, con pecíolos de longitud variable (2-9 cm). Inflorescencias de 4 ó 5 flores. Cáliz formado por 5 sépalos agudos y verdes; corola con 5 pétalos amarillos, con rayas moradas, estambres 10, en 2 grupos de 5, y pistilo más corto o largo que los estambres. Se propaga casi exclusivamente por tubérculos. La estructura floral presenta un eficiente mecanismo que facilita la polinización cruzada (Arbizu y Tapia, 1995).

La oca es una hierba tuberosa firme, con una altura de 20 a 30 cm, con ramas cilíndricas y suculentas, de color amarillo verde hasta un rojo purpúreo. La planta presenta una eficiente estructura para la fotosíntesis, debido al ángulo de inserción y el espesor de las hojas. Los tubérculos pueden ser ovoides, claviformes o cilíndricos, con yemas pronunciadas y diversidad de colores desde blanco y amarillo pálido pasando por anaranjado rosado hasta violeta (Quispe, 1997).

### **3.3.1 Morfología Floral**

El pedúnculo mide de 5-10 cm ó más y los pedicelos de 1-3 cm. El cáliz tiene 1 cm de longitud con cinco sépalos unidos en su base. La corola está formada de cinco pétalos flabeliformes 10 x 16 mm de color amarillo o naranja amarillento con nervios principales rojos. Los estambres se hallan dispuestos en dos verticilos pentámeros de diferente longitud cada uno. El estilo es pentáfido y de longitud variable. El ovario es súpero con cinco carpelos, sincárpico. Los estigmas son bífidos, laminares o penicilados de color amarillo algo verdoso (Cadima, 1996).

### **3.3.2 Morfología de Fruto**

Se clasificó la forma de los tubérculos de la oca en categorías ovoides, claviformes y cilíndricas. De acuerdo a los descriptores morfológicos estándar de la oca del IPGRI/CIP (2001). Las brácteas que cubren a los ojos pueden ser amplias y cortas o casi inexistentes o también amplias y estrechas, pero largas, las flores se disponen en dos cimas de 4 - 5 flores hermafroditas y aparecen en las axilas de las hojas superiores (Cadima, 2006).

### **3.3.3 Características Agronómicas**

Se mencionan a la oca, es como una especie variable en Sudamérica, muy susceptible a las deformaciones tuberosas en suelos pesados, lo que a su vez ocasiona una disminución en el tamaño y rendimiento del mismo. Su multiplicación se realiza mediante la siembra de los mismos tubérculos. La temperatura y el fotoperiodo influyen en la relación crecimiento de la planta - formación del tubérculo. La maduración de la oca, se da en por lo menos 8 meses (Patiño, 1998).

### **3.4 Superficie Cultivada en Bolivia**

Se estima que 13000 ha de la superficie cultivada en Bolivia la mayor concentración está en el departamento de La Paz con 5000 ha, seguido de Cochabamba con 3800 ha. Las pocas investigaciones realizadas sobre los tubérculos andinos muestran que se trata de cultivos que tienen altos niveles de producción. Por ejemplo, los rendimientos en parcelas de agricultores en las principales zonas productoras de tubérculos andinos del Departamento de Cochabamba, Bolivia, alcanzan en promedio de 25 a 28 ton·ha<sup>-1</sup> para la oca y de 30 a 48 ton·ha<sup>-1</sup> en el isaño según el Centro de Información para el Desarrollo (Valdivia *et al.*, 1999).

### **3.5 Valor Nutricional**

Los tubérculos de oca tienen una alta variación en sus niveles nutritivos. Como promedio tiene un 84,1% de agua, 1,1% de proteína, 13,2% de carbohidratos, 0,6% grasa y 1,0% de fibra. El contenido vitamínico varía, pero puede tener cantidades significativas de retinol (vitamina A) y los tubérculos amargos contienen hasta 500 ppm de ácido oxálico (Cadima, 2006).

### **3.6 Usos Tradicionales**

La oca antes de consumir se la debe exponer al sol por varios días para que obtenga el dulzor agradable, luego se cocina de diferentes formas al horno, "huatia", en piedras, en terrones de tierra caliente y en agua. También en forma de caya, es un proceso donde se

expone el tubérculo al agua durante tres meses seguidamente se debe hacer congelar y secado, se la usa como harina (Valdivia, 1998).

### 3.7 La Biotecnología

Mediante técnicas biotecnológicas es posible lograr un desarrollo más eficiente en la producción de tubérculos semilla y la conservación de germoplasma, proporcionando así nuevas alternativas para utilizar los recursos genéticos. La biotecnología, por medio de la genética molecular y el cultivo de tejidos o células *in vitro* ofrece nuevas herramientas para alcanzar esas metas y racionalizar los usos de los recursos fitogenéticos. En particular, el cultivo *in vitro* constituye de diferentes maneras al uso sostenible de los recursos genéticos. (Aguirre, 2010).

La biotecnología dará mayores oportunidades a la población que vive de agricultura y que produce para el mercado interno y externo, mejorando su capacidad competitiva y generando mayores ingresos. Puede contribuir a realizar transformaciones biológicas en los cultivos Andinos con el propósito de mejorar la producción y la calidad de estos alimentos, agregar utilidad y conservar germoplasma de genotipos en peligro de extinción. Se puede preservar y usar adecuadamente la biodiversidad existente y simultáneamente conservar y mejorar el medio ambiente (Mujica y Jacobsen, 2000).

Entre las aplicaciones actuales de la biotecnología a los cultivos Andinos destacan el uso del cultivo *in vitro* de yemas y meristemos caulinares para la micropropagación, conservación y distribución de recursos genéticos de raíces y tubérculos. La aplicación de estas tecnologías en el Centro Internacional de la papa (CIP) ha permitido la organización de un banco de germoplasma clonal *in vitro* de 1600 accesiones de olluco, oca, mashua, arracacha, yacón, maca, mauka y yambean. Así mismo, el CIP ha iniciado un programa de erradicación de virus de toda la colección de raíces y tubérculos Andinos con miras a facilitar su distribución a los países de la región, como para la recuperación del rendimiento y calidad de estos cultivos en el campo del agricultor.

### 3.8 Cultivo de Tejidos

Desde hace 120 años aproximadamente en la investigación de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de tejidos, órganos y células vegetales. Estas técnicas consistieron en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Hurtado y Merino, 1997).

Los orígenes del cultivo de tejidos se remonta al siglo pasado con los intentos realizados por Haberlandt, (1898) de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo de tejidos o propagación "*in vitro*"(Hurtado y Merino, 1997). Hoy en la actualidad se define que el cultivo de tejidos o propagación "*in vitro*", es un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Pérez, 1998).

El cultivo *in vitro* es un método considerado rutinario en la propagación vegetativa, el cual permite la disponibilidad de un gran número de plantas en tiempos relativamente reducidos (Aguirre, 2010).

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en un medio que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo. Además, parte de la premisa "Toda célula de un organismo multicelular es capaz de desarrollarse si se le dan las condiciones externas apropiadas. La célula tiene la habilidad de desarrollarse, regenerando un organismo entero". Y la nueva planta será genéticamente idéntica a la planta madre y el desarrollo de esta será en un periodo corto (Aspuaca, 2004).

#### 3.8.1 Cultivo de Tejidos en Agricultura

El cultivo de tejidos en la agricultura, es el principal aporte de la Biotecnología en la producción, representa un verdadero potencial para el desarrollo, con un aporte bastante significativo en el crecimiento de la agricultura y la agroindustria (Aguirre y Villarroel, 1998). En la actualidad, las técnicas de cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos

biotecnológicos que han aportado al desarrollo de una agricultura, basándose en la totipotencialidad celular, sean tejidos, ápices meristematicos e incluso células aisladas, generando la producción de vitroplantas genéticamente idénticas a la planta madre en un periodo corto con el objetivo de multiplicar, mejorar y conservar a mediano y largo plazo diferentes especies como hortalizas, frutales, ornamentales y forestales de interés alimenticio, medicinal y/o económico para el ser humano (Aguirre, 2010).

### **3.9 Cultivo de Tejidos en la Oca**

Carpio (2001), indica que obtuvo buenos resultados en el establecimiento *in vitro* de las 41 accesiones de oca, presentaron a los 60 días de evaluación una sobrevivencia del 73,6% y una contaminación del 9,26%. En altura del explante están en un rango de 13 cm en las mejores accesiones como: Wila Phuti, Chismi rojo, Luki amarillo de ojos rosados Chismi amarillo, Oca naranja de ápices rosado amarillento, Chismi rosado casi morado y Huaricayo y un promedio de altura 3,05 cm y las demás accesiones alcanzaron alturas comprendidas entre los 6,64 cm y los 12,86 cm.

En el laboratorio e invernadero de IBTEN se obtuvo semilla prebásica de oca de los ecotipos Wila Chismi y Keni bajo sustratos Hidropónicos como el aserrín, paja, cascarilla de arroz que son materiales en desuso o de bajo costo, para lo cual se utilizaron plántulas *in vitro*, las cuales pasaron por un proceso de aclimatación para luego obtener tubérculos de alta calidad genética (Yampara, *et al.*, 2006).

### **3.10 Establecimiento *In Vitro***

FAO (1990), menciona que para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro* se siguen una serie de principios básicos, primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar, el siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal.

Por último se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se llevan a cabo en un ambiente estéril (Aspuaca, 2004).

### 3.11 Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de tejidos o células cultivadas en forma aséptica, en un recipiente en el que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Aspuaca, 2004).

La propagación vegetativa *in vitro*, también denominada micropropagación, es indiscutiblemente la aplicación más concreta del cultivo de tejidos y la de mayor impacto. Consiste en reproducir plantas conformes a la planta madre por la estimulación de capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie o por la inducción de una nueva organogénesis de nudos y raíces (Aguirre, 2010).

La utilización de la micropropagación a nivel comercial se hizo realidad en diversos países del mundo, destacándose los de Europa occidental y EEUU. Los laboratorios comerciales surgirían en su gran mayoría, asociados a viveros como iniciativa de las propias compañías tradicionalmente productoras de plantas. Ellas trabajan con el objetivo de satisfacer las necesidades internas de material de propagación libre de enfermedades, o para acelerar los métodos convencionales de propagación vegetativa. Un menor número de compañías trabajan con la producción de plantas *in vitro* para el abastecimiento de viveros de terceros (Aguirre, 2010).

En Bolivia, la aplicación comercial de la micropropagación es relativamente reciente, con algunos grupos trabajando en universidades e instituciones de investigaciones. En la actualidad, la actividad comercial de la micropropagación se concentra principalmente en la limpieza viral y la consecuente multiplicación de especies ornamentales herbáceas y arbustivas. En segundos plano se encuentran las leñosas, destacándose los portainjertos de frutales de clima templado y árboles élitos de rápido crecimiento (Aguirre, 2010).

### 3.12 Etapas de Micropropagación

Según Darías (1993), la micropropagación consta de cinco fases fundamentales:

- **La fase 0.** Selección de las plantas donadoras del explante para la propagación.
- **La fase I.** Establecimiento, se realiza la desinfección de los explantes y la inoculación de los mismos en el medio de cultivo en condiciones *in vitro*.
- **La fase II.** De multiplicación que se realiza la propagación masiva de nudos a partir de los explantes establecidos.
- **La fase III.** Enraizamiento y crecimiento de los nudos hasta obtener plantas completas
- **La fase IV.** Trasplante a un sustrato, para su aclimatación *ex vitro*.

### 3.13 Medios de Cultivo

El medio M y S (Murashige y Skoog, 1962) es considerado como el medio basal más utilizado en la regeneración de plantas puesto que es apto para el desarrollo de varias especies, sin embargo, existen numerosas variaciones comerciales de este medio que son utilizados de acuerdo al requerimiento del cultivo (Aguirre, 2010).

El éxito del cultivo de tejidos de plantas está influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las secuencias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se obtienen cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales (Calderón, 2000).

### **3.14 Análisis de Componentes Principales**

El análisis de componentes principales es una herramienta útil para analizar los datos que permite conocer la relación existente entre las variables cuantitativas y la semejanza entre accesiones. Los mismos autores señalan que también permite seleccionar las variables cuantitativas más discriminatorias para limitar el número de mediciones en estudios sobre caracterizaciones posteriores, siendo entonces una metodología alternativa que ayuda en la toma de decisiones relacionadas con los componente realmente importantes y que consiste en construir una gráfica de barras utilizando los valores de la varianza absoluta para cada componente en el eje Y, y los componentes principales en el eje X (Franco e Hidalgo,2003).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Localización**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto, situado en la ciudad de El Alto, provincia Murillo, departamento de La Paz. Geográficamente ubicado a 16° 29' 32" latitud Sur y 68° 11' 38" longitud Oeste y una altitud de 4067 m.s.n.m., (Google Earth, 2012).

### **4.2 Material de Laboratorio y Equipos**

#### **4.2.1 Material Vegetal**

Para la presente investigación se utilizaron cuatro morfotipos de oca correspondientes a las accesiones 14, 18, 19 y 20, procedentes del banco de germoplasma de la carrera de ingeniería agronómica UPEA. Su selección fue debido a las características sobresalientes y buen rendimiento.

#### **4.2.2 Material de Vidrio**

En este estudio se utilizó: cinco vasos de precipitación de 100 mL y 1000 mL, 10 vasos de vidrio de 250 mL, 240 tubos de ensayo, seis probetas graduadas de 100, 500 y 1000 mL, una bureta, seis pipetas graduadas de 5 mL y 10mL, matraz erlenmeyer de 100 mL, 20 cajas petri, y 10 frascos ámbar.

### **4.2.3 Material de Desinfección y Reactivos**

Los reactivos químicos utilizados en este estudio fueron: alcohol al 96 y 70% (v/v) de su concentración, hipoclorito de sodio 1%(v/v), detergente líquido, Jabón desinfectante, agua destilada estéril y sustancias que componen el medio de cultivo de MS Murashige y Skoog (1962) descritas en la Tabla 17 del Anexo.

### **4.3 Sala de Preparación de Medios de Cultivo y Lavado**

La sala tiene dos mesones, un lavadero, un refrigerador, un autoclave (equipo de esterilización en base a agua sometido a presión atmosférica), una hornilla eléctrica, un agitador con pastilla magnética, un horno eléctrico, un pH-metro, reguladores de pH (ácido clorhídrico y carbonato de calcio), una balanza analítica (0,001 g), micropipetas.

### **4.4 Sala de Trasferencia**

Tiene una cámara de flujo laminar. (Equipo para purificar el aire en base a filtros de aire de partícula de alta eficiencia HEPA High Efficiency Particulate Air), mechero, implementos; (papel aluminio, magentas, parafilm, pisetas, algodón, atomizador), material metálico (dos pinzas, dos bisturís, 10 hojas de bisturís N° 10, 11, estilete y tijeras).

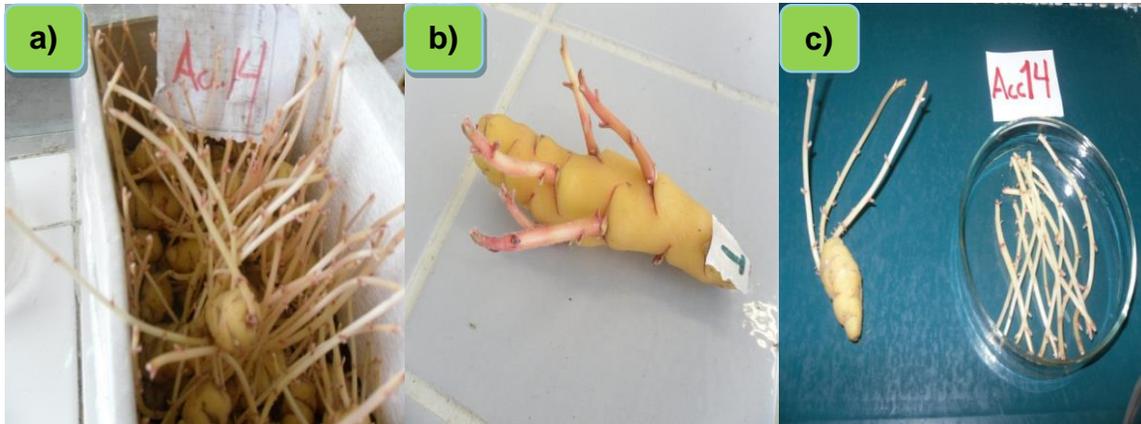
### **4.5 Sala de Crecimiento**

La cámara de crecimiento (Es un ambiente con las condiciones apropiadas de luz, temperatura y asepsia), tiene un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura de 10 a 18°C.

## **4.6 Método**

### **4.6.1 Selección del Material Vegetal**

Se tomó tubérculos con buenas características fenotípicas libre de enfermedades, los tubérculos seleccionados, desinfectados, fueron almacenados, en una caja de cartón cubierta totalmente (cámara oscura), lo que facilitó su brotación con lo cual se garantizó la procedencia del material utilizado en la investigación, como se observa en la Figura 2.



**Figura 2.** Selección del material vegetal para el establecimiento *in vitro* de cuatro accesiones de Oca; a) cámara de brotación de los tubérculos b) brotes del tubérculo: c) selección del material genético para la investigación.

#### 4.6.2 Preparación de la Solución Madre

Se procedió a preparar la solución madre de (Murashige y Skoog, 1962) detallada en la Tabla 11 del Anexo. Se pesaron cada uno de las sales en una balanza de precisión comenzando con los macronutrientes (A), micronutrientes (B), cloruro de calcio (C), quelato de hierro (D), vitaminas y finalmente los aditivos (E), las mismas se disolvieron por separado en agua destilada estéril. Una vez obtenida la solución Stock, se etiquetó los recipientes indicando el tipo de solución, su concentración y fecha de preparación.

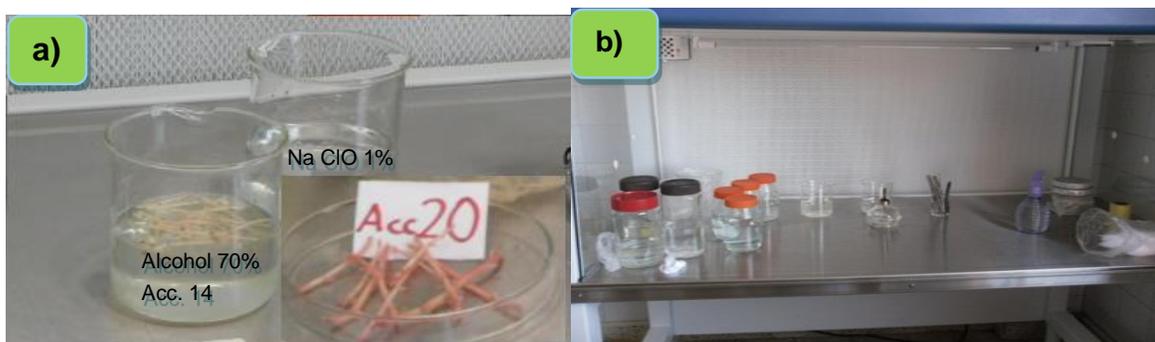
#### 4.6.3 Preparación del Medio de Cultivo

A partir de las soluciones Stock se preparó 1000 mL del medio de cultivo para la fase de establecimiento. En la fase de Multiplicación, se modificaron las concentraciones de sales de Murashige y Skoog (1962), a 40, 60, 80 y 100% (Figura 3), para ambos casos se tomó alícuotas de sales MS en las concentraciones mencionadas, agregando la sacarosa al 3% (p/v) y luego se midió el pH para ajustar dentro de un rango de 5,6 a 5,8. Una vez ajustado el pH se agregó el agar al 0,6% (p/v) ya disuelto, posteriormente el medio de cultivo fue dispensado a cada tubo de ensayo a 2,5 mL, luego se cubrió con papel aluminio, posteriormente se realizó la esterilización en autoclave a 121 °C por 15 minutos a una presión de una atmósfera.



**Figura 3.** Procedimiento de la preparación del medio de cultivo, en la fase del establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro morfotipos de oca; a) soluciones stock: b) control de pH del medio de cultivo: c) disolución del agar en agitador magnético: d) esterilización del medio de cultivo en autoclave.

Para que el material vegetal se encuentre libre de contaminantes se procedió al proceso de desinfección en el cual consistió en lavar el explante dentro de la cámara de flujo laminar con agua y detergente líquido, seguidamente se sumergió en una solución de alcohol al 70% (v/v) por un tiempo de 15 segundos y posteriormente fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% v/v durante 15 minutos para eliminar algún agente fungoso del brote y finalmente se realizó tres enjuagues con agua estéril durante 3 minutos se percibe en la Figura 4. Se observó que los explantes son susceptibles a prolongado tiempo de inmersión, causándoles blanqueamiento.

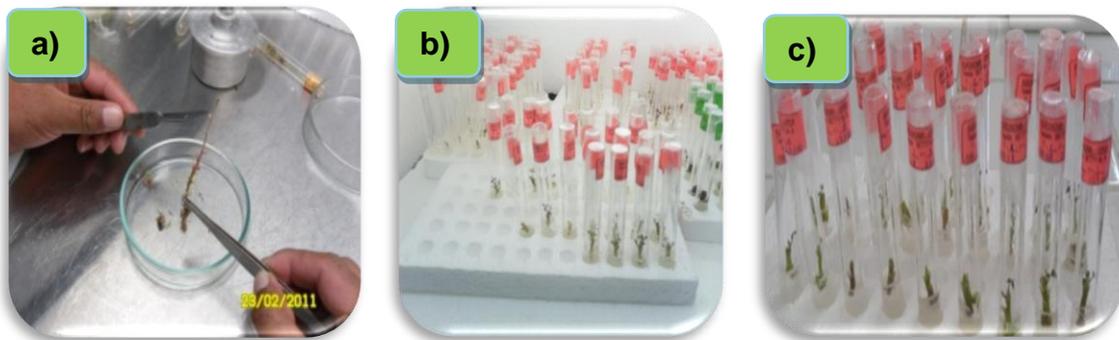


**Figura 4.** a) Desinfección de los brotes de oca en Alcohol al 70% y en hipoclorito de sodio al 1% v/v; b) Esterilización bajo luz ultra violeta de los materiales e instrumentos.

Se realizó la esterilización de guantes, barbijo, gorro, guardapolvo, pinzas, frascos, cajas petri, tijeras, parafilm, mechero y atomizador de alcohol al 70% v/v con luz ultravioleta de la cámara de flujo laminar, para eliminación de contaminantes microbianos, como se muestra en la Figura 4.

#### 4.6.4 Fase I: Establecimiento del Material Vegetal

En la cámara de flujo laminar se realizó la escisión del meristemo apical, medio y basal, posteriormente se sembraron en tubos de ensayo de vidrio con medios de cultivo teniendo en cuenta la rotulación (fecha y nombre de Accesoión). Luego fueron trasladados a la sala de incubación acondicionado a una temperatura de 10 a 18 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad y controlados con un tymer automático. En esta área se realizó la evaluación de variables a 7 y 15 días del establecimiento, Figura 5.

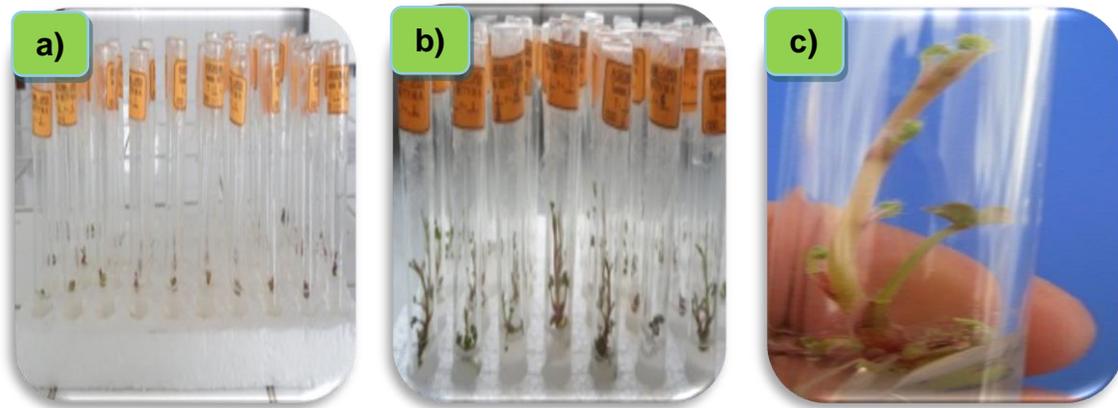


**Figura 5.** Establecimiento *in vitro* del explantes de oca en laboratorio de biotecnología vegetal. a) Escisión del meristemo apical, medio y basal en cama de flujo laminar: b) incubación cámara de crecimiento de los tratamientos en estudio: c) vitroplantas que se desarrollaron después de 7 días del establecimiento.

#### 4.6.5 Fase II: Multiplicación

La fase de multiplicación se desarrolló con la proliferación de meristemos, parte media de la vitroplanta de la fase de establecimiento, se realizó un corte del explante en los entrenudos dejando una hoja o dos en cada meristemo axilar, estos fueron sembrados en medio de cultivo MS (1962) preparadas a diferentes concentraciones: 40, 60, 80 y 100%, se propagaron un explante por tubo de ensayo, luego se sellaron con parafilm cinta

plástica y de inmediato se rotularon con los datos correspondientes de cada unidad experimental, seguidamente fue llevado a la sala de crecimiento para su evaluación Figura 6.



**Figura 6.** Multiplicación *in vitro* del explante de oca. a) Incubación de los tratamientos en estudio: b) a los 21 días de la multiplicación: c) número de nudos por vitroplantas

#### 4.7 Variables Evaluadas en la Fase de Establecimiento

##### a) Número de Hojas

Para la evaluación de esta variable se observó en forma directa a cada una de las vitroplantas una vez por semana y con el registro de la última semana se sacó un promedio en base al número de hojas que presenta.

##### b) Número de Nudos

Esta variable se contabilizó al final de la fase en cada una de las vitroplantas luego se sacó un promedio de acuerdo al número de nudos formados.

##### c) Altura de Vitroplanta

Se registraron datos semanales con la ayuda de una regla milimétrica para evaluar su crecimiento, se sacó un promedio en base a registro de longitud de cada vitroplanta.

#### **d) Porcentaje Supervivencia de Vitroplantas**

Se determinó mediante observación directa después de la siembra *in vitro*, comparando con el número inicial de explantes sembradas tomando resultados promedio en porcentaje. Se evaluó aplicando la siguiente escala de valores: 1 = muertos, 2 = vivos.

#### **e) Porcentaje Contaminación Microbiana de Hongos y Bacterias**

Fue evaluada a través de la observación directa, se registró explantes contaminados de la población de tratamientos se aplicó el método de regla de tres simple. También se evaluó aplicando la siguiente escala de valores: 1 = no contaminado, 2 = contaminado.

#### **f) Porcentaje Necrosis de Vitroplantas**

Se contabilizó los explantes muertos, del total de la población a través de la observación directa. Se evaluó aplicando la siguiente escala de valores: 1 = explante muerto, 2 = explante vivo.

### **4.8 Variables Evaluadas en la Fase de Multiplicación**

#### **a) Altura de Vitroplanta**

La evaluación de esta variable se determinó mediante la medición directa en milímetros desde la superficie del cuello del vitroplanta hasta el ápice del explante, con la ayuda de una regla milimétrica.

#### **b) Número de Hojas**

Para la evaluación de esta variable se observó en forma directa a cada uno de los vitroplantas una vez por semana y con el registro de la última evaluación se sacó un promedio en base al número de hojas que presentaron.

### c) Número de los Nudos

En esta variable se contabilizó el número de nudos formados en cada vitroplanta para luego sacar un promedio para su evaluación.

### d) Número de Raíces

El número de raíces se evaluó por simple observación y conteo en cada vitroplanta, contando uno por uno se obtuvo el promedio por tratamiento.

## 4.9 Diseño Experimental

Los datos fueron evaluados bajo a un diseño Completamente al Azar DCA con dos factores (Ochoa, 2009). La fase de establecimiento está formada por 12 tratamientos con 20 repeticiones haciendo un total de 240 unidades experimentales (Tabla 1 y 2). También para la fase de multiplicación se evaluó 16 tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento, alcanzando un total de 160 unidades experimentales, (Tabla 3 y 4). Cada unidad experimental corresponde a un tubo de ensayo.

### 4.10 Fase de Establecimiento *in vitro*

**Factores de estudio:**

**Tabla 1.** Factores en estudio de morfotipos de oca entre posición de meristemas.

Factor A	Morfotipos de Oca	Factor B	Posición de Meristemas
a1	Acc-14	b1	apical
a2	Acc-18	b2	medio
a3	Acc-19	b3	basal
a4	Acc-20		

**Tratamientos:****Tabla 2.** Tratamientos y combinaciones de los factores A y B en la fase I.

Tratamientos	combinaciones
T1	a1 b1
T2	a1 b2
T3	a1 b3
T4	a2 b1
T5	a2 b2
T6	a2 b3
T7	a3 b1
T8	a3 b2
T9	a3 b3
T10	a4 b1
T11	a4 b2
T12	a4 b3

**Modelo Lineal Aditivo:**

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Dónde:**

$X_{ijk}$  = Una observación cualquiera.

$\mu$  = Media general.

$\alpha_i$  = Efecto del i-ésimo factor A genotipos de oca.

$\beta_j$  = Efecto del i-ésimo factor B posición de meristemos.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la Interacción del i-ésimo factor A con el efecto del j-ésimo factor B.

$\varepsilon_{ijk}$  = Efecto aleatorio del error experimento.

#### 4.11 Fase II Multiplicación *in vitro*

**Factor de estudio:**

**Tabla 3.** Factor de estudio Morfotipos de oca y concentraciones de sales MS (1962).

Factor A Morfotipos de Oca		Factor B Concentraciones de M.S. %	
a1	Acc-14	b1	40
a2	Acc-18	b2	60
a3	Acc-19	b3	80
a4	Acc-20	b4	100

**Tratamientos**

**Tabla 4.** Tratamientos y combinaciones de los factores A y B en la fase II.

Tratamientos	Combinaciones	Tratamientos	Combinaciones
T1	a1 b1	T9	a3 b1
T2	a1 b2	T10	a3 b2
T3	a1 b3	T11	a3 b3
T4	a1 b4	T12	a3 b4
T5	a2 b1	T13	a4 b1
T6	a2 b2	T14	a4 b2
T7	a2 b3	T15	a4 b3
T8	a2 b4	T16	a4 b4

#### 4.11.1 Modelo Lineal Aditivo

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

##### Dónde:

$X_{ijk}$  = Una observación cualquiera.

$\mu$  = Media general.

$\alpha_i$  = Efecto del i-ésimo factor A genotipos de oca.

$\beta_j$  = Efecto del i-ésimo factor B concentraciones de sales M.S.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la Interacción del i-ésimo factor A con el efecto del j-ésimo factor B

$\varepsilon_{ijk}$  = Efecto aleatorio del error experimento.

#### 4.11.2 Análisis Estadístico

En base a la información registrada para la evaluación de cuatro accesiones de oca, en la fase de establecimiento y multiplicación fueron procesados en Microsoft office Excel 2007, programa de SAS 9,1 y SPSS 20 para las descripciones de los valores en promedio para variables cuantitativas se realizó estadística descriptiva, análisis de varianza, comparación de medias y componentes principales.

La estadística descriptiva trata dos aspectos: obtener información de los datos y presentación de resultados referidos al promedio de los caracteres de interés. Para la descripción y visualización de las variables evaluadas se empleó promedios.

Análisis de varianza (ANVA) esta técnica tiene como objetivo identificar la importancia de diferencia estadística entre e intra factores en estudio. Los análisis empleados fueron, estadística descriptiva: media, mediana, modo, desviación estándar, asimetría, curtosis, rango, mínimo y máximo, análisis de varianza (ANVA), prueba de Duncan con una significancia de 5% en la comparación de promedios expresadas en tablas para variables cuantitativas, para el caso de las variables cualitativas se aplicó el análisis expresadas en barras.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con los datos obtenidos en la investigación a continuación se presentan los resultados para cada variable en estudio.

### 5.1 Análisis de Varianza para la Fase de Establecimiento

Los resultados presentados en la Tabla 5, muestra el análisis de varianza (ANVA) para las variables: número de hoja NH y altura de vitroplanta AVP, presentan diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en la fase de establecimiento *in vitro* de cuatro morfotipos de oca factor (A), entre posición de meristemas del factor (B) y la interacción de los factores (A:B). En cuanto la variable número de nudos, no muestran diferencias significativas para los factores (A), (B) y la interacción (A:B), lo cual indica que cada tratamiento empleado en las unidades experimentales no tiene efecto alguno y para la interacción tiene un efecto independiente en los resultados obtenidos.

**Tabla 5.** Análisis de varianza para cuatro accesiones de oca y la posición de meristemas (apical, medio y basal), evaluados en laboratorio de biotecnología vegetal.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios					
		NH	P	NN	P	AVP	P
Factor A	3	17,372	0,000 **	1,248	0,394 ns	55,442	0,000 **
Factor B	2	0,529	0,780 ns	0,507	0,663 ns	17,553	0,006 **
FA*FB	6	2,039	0,463 ns	2,791	0,057 ns	8,015	0,027 *
Error	35	2,113		1,220		2,906	
C.V.		23,0%		30%		11%	
R <sup>2</sup>		0,499		0,37		0,74	

CV= coeficiente de variación, R<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, \*\* = altamente significativo, \* = significativo, ns = no significativo; p = nivel de probabilidad.

### 5.1.1 Número de Hojas

En la Tabla 5, muestra el análisis de varianza para la variable número de hojas, donde se observa diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre accesiones (A), en cambio entre posiciones de meristemas (apical, medio y basal) (B) e interacción de ambos factores (A:B) no existen diferencias significativas, lo cual indica que cada factor tuvo un efecto independiente en los resultados obtenidos.

**Tabla 6.** Prueba de Duncan para la variable número de hojas en función a factor (A) cuatro accesiones de oca.

Accesión	Número de Hojas (promedio)	Significancia
Acc. 14	6,09	A
Acc. 20	5,25	Ab
Acc. 19	4,18	Bc
Acc. 18	3,35	C

Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

Se realizó la prueba de Duncan en la Tabla 6 del factor accesiones de oca para la variable número de hojas, se observa cuatro grupos estadísticamente diferentes donde la Acc-14 presento mejores respuestas con 6 hojas en comparación de la Acc-18 que solo alcanzo 3 hojas.

No obstante el desarrollo de las hojas se debe a varios factores según Amador (1999) y Euita (2003), manifiestan que entre las accesiones las citocininas producen la eliminación de la dormancia que presentan las yemas de algunas especies, además, estimulan la división celular y morfogénesis provocando el crecimiento de callos y estimulación de la formación de yemas laterales contrarrestando la dominancia apical, así mismo estimulan la expansión foliar debido al alargamiento celular, participan en la proliferación de brotes axilares, formación de yemas adventicias de nudos y la inhibición de formación de raíz.

### 5.1.2 Número de Nudos

Según la Tabla 5, se observa el análisis de varianza para las variable número de nudos entre las accesiones (A), posiciones de meristemas (apical, medio y basal) (B) y la interacción de los factores (A·B), no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto no hay efecto entre los tratamientos.

### 5.1.3 Altura de Vitroplanta

De acuerdo al análisis de varianza de la Tabla 5, para la variable altura de vitroplanta, las accesiones de oca (A) y la posición de meristemas (B) expresan un comportamiento altamente significativo ( $P < 0,01$ ), también para la interacción (A·B) muestra diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), por lo que se realizó una comparación de medias para denotar la significancia entre las variables.

**Tabla 7.** Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro accesiones de oca y posición de meristemas (apical, medio y basal).

Accesión	Altura de Vitroplantas mm (promedio)	Significancia
Acc. 20	16,88	A
Acc. 19	16,55	B
Acc. 14	16,27	B
Acc. 18	12,76	B
posición de meristemo		
Apical	16	A
Medio	15	B
Basal	13,8	B

Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

Realizada la comparación de medias con la prueba de Duncan al 5%, Tabla 7, se muestra la variable altura de vitroplanta en función a cuatro accesiones de oca, permiten apreciar dos grupos estadísticamente diferentes, donde la Acc-20 presento 16,88 mm en comparación a la Acc-18 con un promedio de 12,76 mm. También son estadísticamente diferentes en la posición de meristemas (apical, medio y basal) donde la parte apical tiene un promedio de 16 mm en comparación con el meristemo basal que solo mide 13,8 mm de longitud.

Al respecto Hurtado y Merino (1997), señala que las citocininas promueven la división celular para que ocurra dicho proceso donde una cadena de hechos (síntesis de ADN, mitosis y citocinesis), en los cuales la presencia de las citocininas es necesaria para la mitosis. Al mismo tiempo, afirma que si la citocinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división celular.

## **5.2 Análisis Descriptivo para la Fase de Establecimiento**

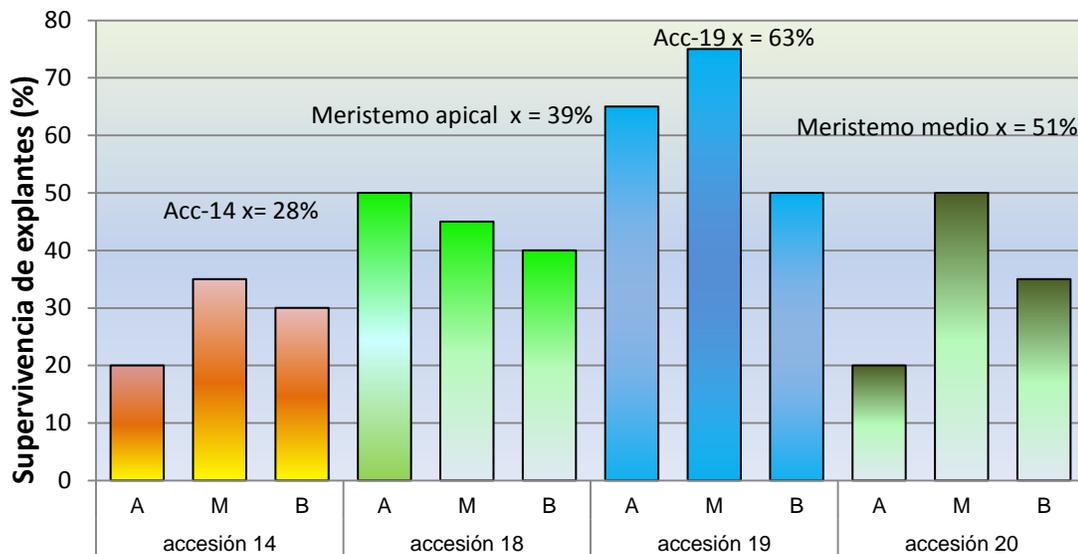
### **5.2.1 Porcentaje de Supervivencia**

Se tomó el número de vitroplantas vivas Figura 7, muestra la variable supervivencia en función a las accesiones de oca, se observa que la Acc-19 presenta mayor porcentaje de supervivencia 63,33% en comparación con la Acc- 14 con 28,33% respectivamente. Pierik (1990), indica que la capacidad de regeneración está determinada por el genotipo y el estado de desarrollo de cada planta, variedad y accesión de una misma especie. También afirma Tapia (1991) que la oca, responde en forma satisfactoria en la fase de introducción a condiciones *in vitro*.

Durante la fase de establecimiento *in vitro*, las accesiones de oca registraron buen desarrollo en porcentaje de supervivencia, lo que puede estar relacionado a factores como la adecuada incubación de los tubérculos en la cámara de germinación, que repercutió en una adecuada producción de vitroplantas. Así también puede ser al buen vigor del explante introducido, a la efectividad del agente desinfectante y al manejo técnico.

También en la Figura 7 se muestra el porcentaje de supervivencia en función a la posición de meristemo (apical, medio y basal). Donde se evidencia que el meristemo de la parte media obtiene el 51,25% de vitroplantas vivas con respecto al meristemo apical y basal solo presentaron 38,75% de supervivencia, donde la muerte del explante se debe a la desinfección.

Aspuaca (2004), manifiesta que la elección, aislamiento y desinfección del explante es el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal, el éxito de esta fase depende en gran medida de toda una serie de parámetros relacionados con el explante y con el sistema seguido para su manipulación y esterilización, incluso trabajando en condiciones óptimas y muy poco agresivas los tejidos que forman el explante sufren siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés y desecación, daños mecánicos, daños en la desinfección, cambios de pH, cambios en el potencial hídrico, salino y osmótica al ser incubado en el medio de cultivo, todo esto provoca la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos.



**Figura 7.** Supervivencia de explantes en función a las accesiones y posición de meristemo apical (A) medio (M) y basal (B) durante el establecimiento *in vitro* de accesiones de oca a los 15 días de evaluación.

Sin embargo la mayor parte de las veces un factor determinante en la sobrevivencia de explantes a condiciones *in vitro* está relacionado con la efectividad del agente desinfectante, en este caso la utilización del hipoclorito de sodio a una concentración de 1% y con una inmersión del explante por 15 minutos dio buenos resultados en pruebas preliminares en el laboratorio de la Universidad Pública el Alto, aunque el CIP (1995), citado por el PBRTAs (1995) y Cadima (1996), recomienda utilizar concentraciones del

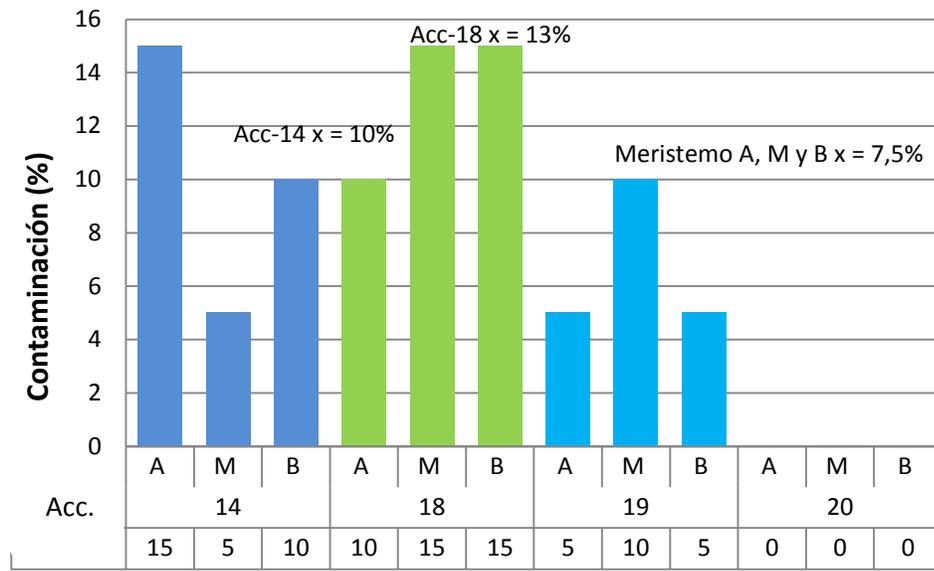
0,8% por 1 minuto. Ayerbe (1990) y Merino (1997), recomiendan probar la concentración, el tiempo y los agentes desinfectantes para una adecuada introducción del material vegetal.

Por otra parte López (2001) indica, que la elección del aislamiento y desinfección del explante es el primer paso para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal y el éxito de esta tarea depende en gran medida de toda una serie de parámetros relacionados, con el propágulo y con el sistema elegido para su manipulación y esterilización.

### **5.2.2 Porcentaje de Contaminación**

Mediante la Figura 8, se observa, la contaminación fúngica, ocasionada por agentes fungosos conocido como hongos, el mayor porcentaje de contaminación se presentó en la Acc-18 con el 13,33% seguido por la Acc-14 y Acc-19 con 6,66 y 10%. En cambio en la Acc-20 no presento contaminación. El bajo porcentaje de contaminación del medio de cultivo, se debe fundamentalmente a la efectividad del agente desinfectante y también al manejo que se les dio a los explantes, es así que se puede alegar que el hipoclorito de sodio puede ser utilizado con éxito en la introducción de ecotipos de oca, equilibrando su concentración, lo cual es confirmado por Cadima (1996), que reporta la efectividad del hipoclorito de calcio en la introducción *in vitro*.

En la misma Figura 8, se muestra el grado de contaminación de posición de meristemas en la fase de establecimiento fue aceptable del 100% de explantes introducidos, solo se contaminaron el 7,5% para cada uno de las tratamientos. Aun cuando se trabajen en la condiciones más óptimas, los tejidos que forman el explante sufren siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés que estimula el metabolismo de los compuestos fenólicos mencionado (López, 2001).



**Figura 8.** Contaminación de explantes de las accesiones y posición de meristemos apical (A), medio (M) y basal (B) durante el establecimiento *in vitro* de accesiones de oca a los 15 días de evaluación.

Los resultados obtenidos puede deberse porque en la sala de establecimiento no tiene una asepsia total, también la desinfección superficial no alcanzó a los microorganismos intercelulares. Según Hurtado y Merino, (1997), si bien la mayoría de los microorganismos se encuentran en la superficie de los órganos vegetales, debemos tomar en cuenta que existen evidencias de la presencia de algunos de ellos en la parte interna de la planta que se manifestaron durante el crecimiento del explante. Arias (2000), indica que el tamaño del explante es un factor que influye en la regeneración y la supervivencia, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración.

### 5.2.3 Porcentaje de Oxidación y Fenolización

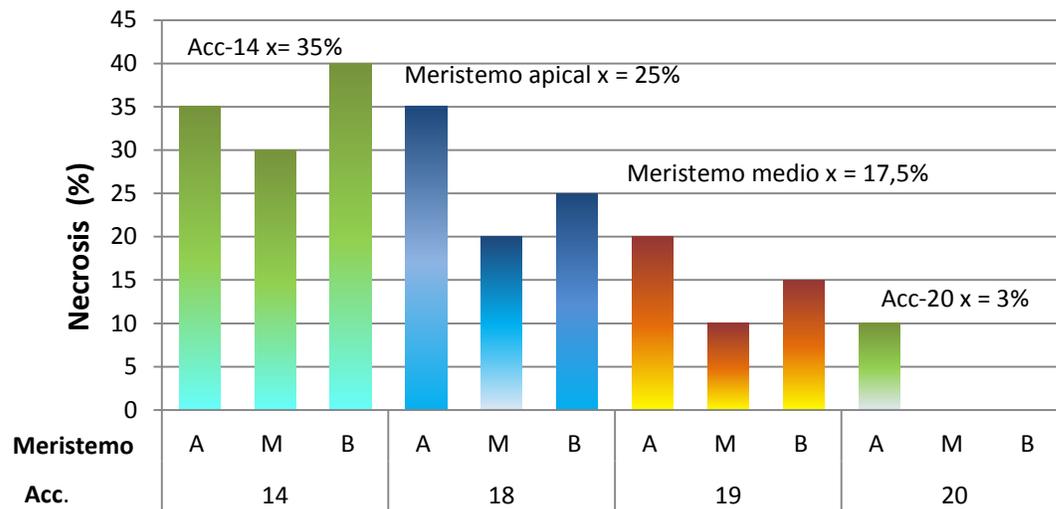
En los tratamientos, se evidencio que no presentaron oxidación y fenolización en los propágulos en estudio. Contrariamente a los efectos obtenidos se reportan resultados que señalan (Quezada, 2005; citado por Mamani, 2005), que durante la escisión de los explantes ocurren daños celulares, en respuesta a ello se activan el metabolismo de fenoles, la cual se manifiesta con el empardecimiento del medio de cultivo, también

Hurtado y Merino (1991), mencionan utilizar explantes como los meristemas, disminuye las reacciones de oxidación de fenoles y por ende la muerte de los explantes.

#### 5.2.4 Porcentaje de Necrosis

En la Figura 9, se muestra la desintegración del explante en función a las accesiones, donde se observa que la Acc-14 presentó mayor porcentaje de necrosis 35%, seguido por las Acc-18 con 26,66% y la Acc-19 con 15%, en comparación con la Acc-20 que solo mostró 3,33%.

En la misma Figura, muestra los resultados del porcentaje de necrosamiento en función a posición de meristemas, donde se evidencio, que la parte apical presento mayor porcentaje de necrosamiento de 25%, en comparación a la parte media con 17,5% de explantes muertos. Aspuaca (2004), menciona que las sustancias van a provocar o conducir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio el contenido de las células deterioradas, reacciones de estrés en las células vecinas de las dañadas, incluso aunque esas células no parezcan estar dañadas, y/o una muerte prematura de células específicas de esa zona o del lugar de la infección.



**Figura 9.** Necrosis de explantes en función a las accesiones y posición de meristemo apical (A), medio (M) y basal (B) durante el establecimiento *in vitro* en oca a los 15 días de evaluación.

### 5.3 Estadística Descriptiva en la fase de Multiplicación

Se describió el comportamiento de las diferentes variables para número de hoja NH, número de nudos NN, altura de vitroplanta AVP y número de raíz NR con relación a parámetros cuantitativo considerando el análisis de tendencia central y dispersión, cuyos valores representativos se detalla en Tabla 8.

**Tabla 8.** Estadística descriptiva para variables cuantitativas en el estudio evaluado de multiplicación *in vitro* de cuatro accesiones de oca en cuatro concentraciones de sales MS (1962).

Estadísticos	NH	NN	AVP(mm)	NR
Media	7,38	15,91	41,94	8,98
Mediana	7,00	16,00	40	5
Moda	7	15	38	4
Desviación estándar	1,116	2,591	6,226	3,881
Asimetría	0,162	0,730	1,238	0,195
Curtosis	- 0,445	0,253	2,180	- 1,201
Rango	5	11	35	14
Mínimo	5	12	30	2
Máximo	10	23	65	16

NH = número de hojas; NN = número de nudos AVP = altura de vitroplanta; NR = número de raíz.

Para las variables cuantitativas se muestra un comportamiento promedio para el número de hojas se obtiene una media de 7,38 y una dispersión de  $\pm 1,116$  con coeficiente de asimetría y curtosis de - 0,445 y 0,162 respectivamente, implicando una distribución normal.

El comportamiento promedio de respuesta para la variable número de nudos la media fue de 15,91 con una dispersión de  $\pm 2,591$ , con coeficiente de asimetría y curtosis de 0,730 y 0,0253, respectivamente.

El promedio de respuesta muestra en la Tabla 8, para la variable altura de vitroplanta tiene una media de 41,94 mm con una desviación estándar de  $\pm 6,226$  mm el comportamiento de las variables puede ser calificada como normal en función a la

interpretación de las estadísticas de distribución, donde coeficiente de asimetría 1,238 y curtosis 2,180.

El comportamiento promedio de respuesta para la variable número de raíces por vitroplanta, la media fue 8,98 con una dispersión de  $\pm 3,881$  con coeficiente de asimetría y curtosis de 0,195 y -1,201 respectivamente, implicando una distribución normal.

#### 5.4 Análisis de Varianza

Los resultados presentados en Tabla 9 mediante el análisis de varianza (ANVA), en los tratamientos asignados, para las variables de número de hoja NH, número de nudos NN, altura de vitroplanta AVP y número de raíz NR, presentaron diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en la fase de multiplicación *in vitro* de oca entre las accesiones correspondientes al factor (A), concentraciones de sales MS (1962) del factor (B) y la interacción de los factores (A·B). En cuanto a la interacción (A·B), para el variable número de hojas, no muestran diferencias significativas, lo cual indica que cada factor tuvo un efecto independiente en los resultados obtenidos.

**Tabla 9.** Análisis de varianza para variables cuantitativas, número de hoja NH, número de nudos NN, altura de vitroplanta AVP y número de raíz NR, de cuatro accesiones de oca en cuatro concentraciones de MS (1962), evaluado en el laboratorio de biotecnología vegetal UPEA.

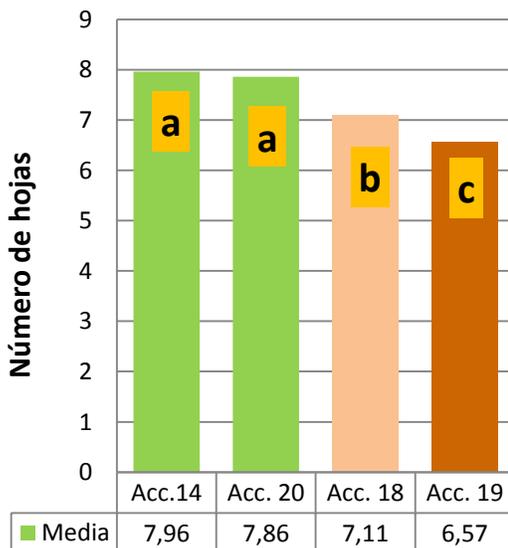
Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios							
		NH	P	NN	P	AVP	P	NR	P
Factor A	3	12,107	0,000**	95,274	0,002**	599,866	0,001**	109,631	0,003**
Factor B	3	3,845	0,006**	0,7821	0,013**	124,104	0,000**	134,393	0,001**
FA*FB	9	0,774	0,537ns	26,298	0,002**	127,438	0,002**	86,972	0,001**
Error	96	0,869		2,074		10,247		1,637	
C.V.		12,64%		9,05%		7,63%		14%	
R <sup>2</sup>		0,406		0,691		0,736		0,891	

CV= coeficiente de variación, R<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, \*\* = altamente significativo; ns = no significativo; p = nivel de probabilidad,

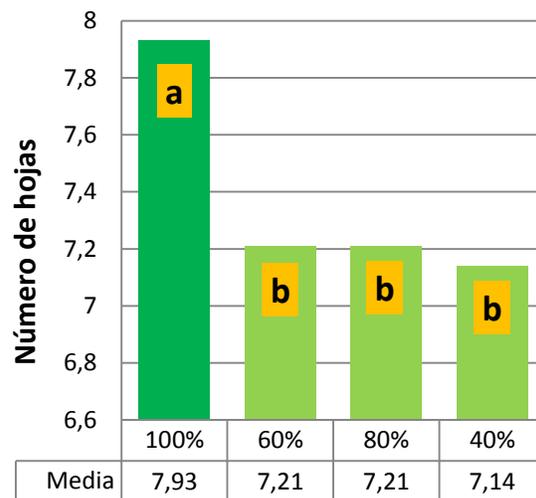
### 5.4.1 Número de Hojas

En la Tabla 9, muestra el análisis de varianza para la variable número de hojas, donde revelan diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre las accesiones (A), y entre las concentraciones de sales MS (B). Pero no se evidencian diferencias estadísticas en la interacción de ambos factores (A·B), lo cual indica que cada factor tuvo un efecto independiente en los resultados obtenidos.

Realizada la comparación de medias con la prueba de Duncan al 5%, Figura 10 y Tabla 12 del Anexo, se muestra la variable número de hoja en función a cuatro accesiones de oca, permiten apreciar tres grupos estadísticamente diferentes, donde la Acc-14 y 20 presento mayor número de hojas de 7,96 -7,86 seguido por la Acc-18 con un promedio de 7,1, en comparación a la Acc-19 que solo llego a formar 6,57 hojas. Estas diferencias de genotipos de cada accesión. Afirma Ayerbe (1990), indica que existen grandes diferencias genotípicas entre plantas de la misma especie.



**Figura 10.** Comparación de medias para la variable número de Hojas en función a las accesiones de oca, en la fase de multiplicación *in vitro*.



**Figura 11.** Comparación de medias para la variable número de hojas en función a concentraciones de sales MS, en la fase de multiplicación *in vitro*.

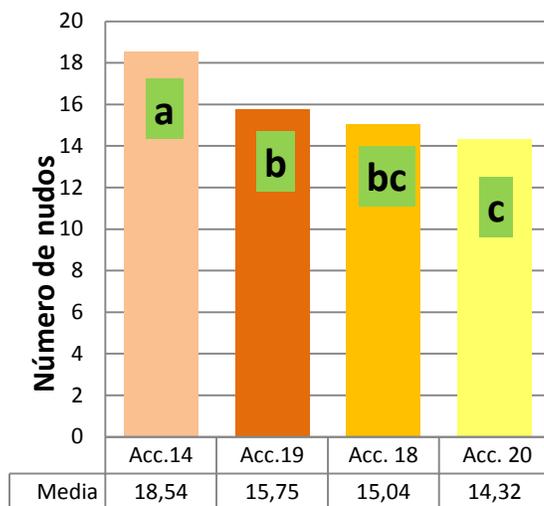
En la Figura 11 y Tabla 13 del Anexo, se observa la comparación de media la variable número de hojas en función a diferentes concentraciones de sales MS, se evidencia que son estadísticamente diferentes según la prueba Duncan al 5%, donde muestra que las vitroplantas se desarrollaron mejor a una concentración de 100% de sales MS, con 7,9 hojas en comparación con las concentraciones de 80, 60 y 40% de medio de cultivo no son significativos.

Las concentraciones de sales MS en el medio de cultivo, tuvo una relación positiva en la formación de hojas, de la misma manera que Enríquez, (2005) en enraizamiento *in vitro* de brotes (*Agave angustifolia*) a una concentración 50% de sales inorgánicas MS formaron 6.1 hojas en promedio respectivamente.

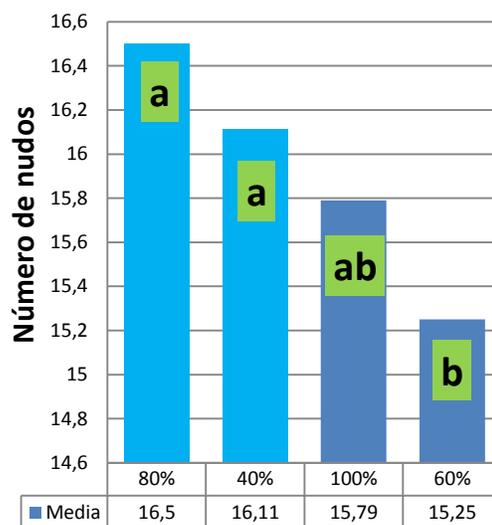
#### **5.4.2 Número de Nudos**

La Tabla 9, presenta el análisis de varianza para las variable número de nudos muestra resultados altamente significativo ( $p < 0,01$ ) entre las accesiones (A), entre las concentraciones de sales inorgánicas (B) y para interacción (A·B). Lo cual indica que cada factor tuvo un efecto dependiente en los resultados obtenido. El coeficiente de variación de 9,05% nos indica que los valores son confiables y están dentro del margen de aceptación.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Duncan al 5%, para la variable número de nudos por vitroplanta, en función de las accesiones de oca, se observa en la Figura 12 y Tabla 14 del Anexo, donde muestra 3 grupos estadísticamente diferentes. Así el primer grupo está conformado por la Acc-14 con 18,54 nudos el segundo grupo está constituido por la Acc-19 y 18 con 15,75-15,04 comparando con el tercer grupo está compuesto por la Acc-20 tan solo presento 14,32 nudos. Se evidenció que la accesión 14 presentó mayor cantidad de nudos con relación a la accesión 20. La diferencia de relaciones entre las dos accesiones está relacionado con la capacidad de regeneración de nudos, que viene determinando por el genotipo y el estado de desarrollo de la planta tal como afirma (Pierik, 1990).



**Figura 12.** Comparación de medias para la variable número de nudos en función a las accesiones de oca.



**Figura 13.** Comparación de medias para la variable número de nudos en función a concentraciones de sales MS.

En la prueba de Duncan al 5%, de la Figura 13 y Tabla 15 del Anexo, muestra 2 grupos estadísticamente diferentes, se observa la comparación de media para la variable número de nudos en función a diferentes concentraciones de sales MS, se evidencia que no existen diferencia significativas para las concentraciones 80, 40 y 100%, asimismo, se obtuvieron un promedio de 16,5 y 15,79 nudos, en comparación a la concentración de sales MS a 60% también alcanzó a formar 15,25 de nudos, no se utilizaron reguladores de crecimiento. Por lo general los niveles de medio de cultivo no disminuyen esta frecuencia de nudos. (Moreina,1999; citado por Mejía 2006), determinaron en diferentes especies que la presencia de altas concentraciones de ANA inhibe la brotación de yemas, respuesta que es afectada, además por las condiciones de incubación, de ahí que se produjo mayor número de nudos.

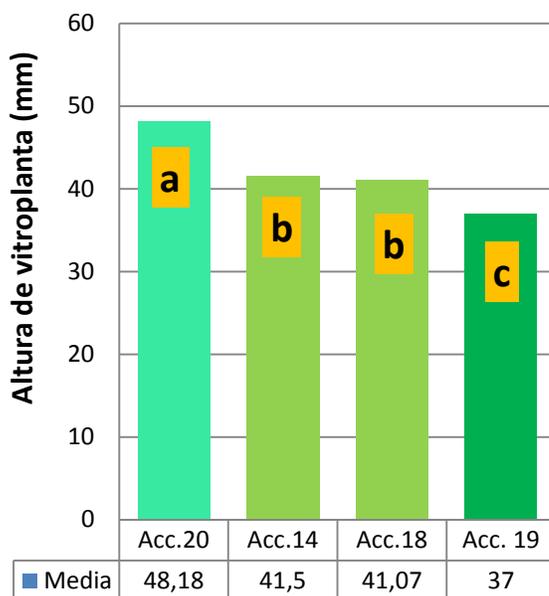
En cambio para Estrada (1997), las vitroplantas de papa en tres o cuatro semanas generan 5 a 7 nudos para ser trasferidos, con concentraciones de carragenina en ambas multiplicaciones llegaron a cantidad similar. Según Mejía (2006), la tasa de multiplicación que obtuvo, fue de 12 nudos por explante, con producción de callos compactos, lo cual ocurrió en el medio MS adicionado solamente con  $1,0 \text{ mg/litro}^{-1}$  de BA, a los 31 días después de la siembra.

### 5.4.3 Altura de Vitroplanta

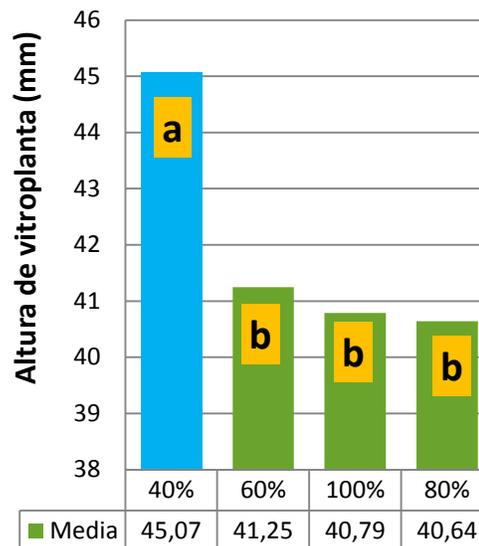
El análisis de varianza mostró en la Tabla 9 y Figura 16, para la variable altura de vitroplanta señala que las accesiones (A), entre las concentraciones de sales MS (B), y para la interacción (A·B), muestran un comportamiento altamente significativo ( $P < 0,01$ ), esto indica que los factores son dependientes en la fase de multiplicación *in vitro*, por lo que realizó una comparación de medias para denotar la significancia entre las variables. Detallando también un coeficiente de variación de 7,63% que es inferior al 15% rango que no debe exceder en trabajos de laboratorio pues perdería su confiabilidad según (Castañeda, 1995).

Los promedios de altura de vitroplanta, para las accesiones, muestran diferencias significativas bajo una comparación de medias en base a pruebas de Duncan 5%, Figura 14 y Tabla 16 del Anexo, es decir Accesoión 20 obtiene mayor crecimiento de altura del explante con promedio de 48,18 mm en comparación a la Accesoión 19 que presentó menor crecimiento con 37 mm (Roca, 1991). Considerando también que la reducción de nutrientes posiblemente ocasiona estrés en las plántulas como producto de ello se modifica su metabolismo bajando el crecimiento.

La longitud de vitroplanta tiene significancia entre accesiones puede deberse a las diferentes concentraciones de sales MS, el coeficiente de variación es de 10,16% nos indica que los valores son confiables y están dentro del margen de aceptación. Ayeber (1990), indica que existen diferencias muy evidentes en la división celular y capacidad de regeneración entre genotipos de una misma especie. También otros autores afirman que las condiciones necesarias para una regeneración eficiente varían entre células de planta, del tejido así como entre especies y cultivares de una misma especie (Hoekena, 1989; citado por Carpio, 2001).



**Figura 14.** Comparación de medias para la variable altura de vitroplanta en función a las accesiones de oca.



**Figura 15.** Comparación de medias para la variable altura de vitroplanta en función a concentraciones de sales MS.



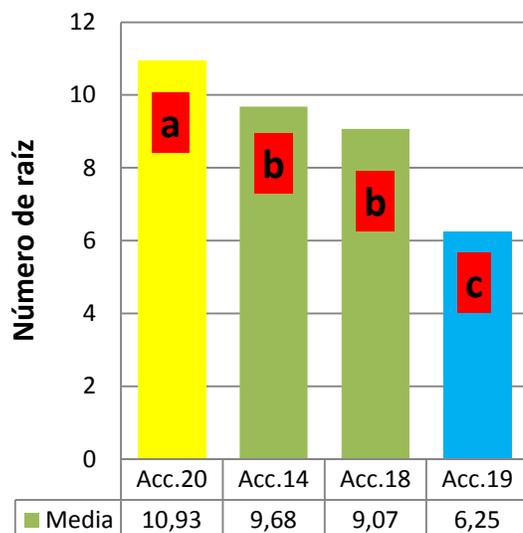
**Figura 16.** Altura de vitroplanta en función a las accesiones de *Oxalis tuberosa* Mol., durante la multiplicación *in vitro* de morfotipos de oca a los 40 días de evaluación.

De acuerdo a la prueba de Duncan al 5%, en la Figura 15 y Tabla 17 del Anexo, se observa dos grupos estadísticamente diferentes, para la variable altura de vitroplanta en función a concentraciones de sales MS, donde al 40% desarrollo mayor longitud de explantes 45,07 mm en comparación a los de 60, 100 y 80% que solo obtuvo una longitud de 41,25, 40,79 y 40,64 mm. Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones fueron satisfactorios ya que los tratamientos tuvieron un comportamiento bueno. Al respecto Arias (2000), menciona que el tamaño del explante, tiene influencia en el éxito del cultivo *in vitro*, es un factor influyente en la desinfección y regeneración de plantas. Por otra parte Carpio (2001), afirma que durante la conservación *in vitro*, no tienen un comportamiento similar en los medios de cultivo incluso perteneciendo a la misma especie.

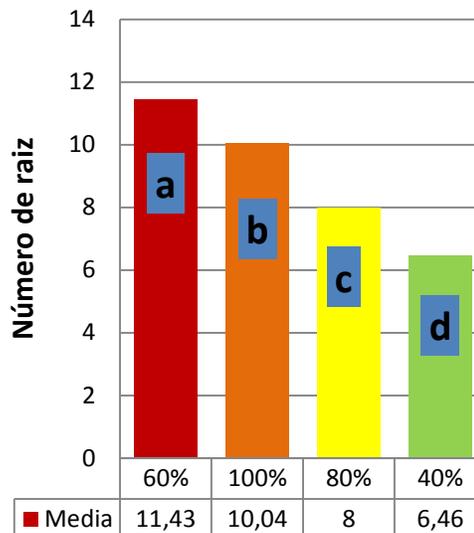
#### **5.4.4 Número de Raíz**

En el análisis estadístico en la Tabla 9, el análisis de variancia a un nivel de significancia de ( $p < 0,01$ ) para la variable número de raíz muestran altamente significativo entre las accesiones (A), diferentes concentraciones de sales MS (B) y para la interacción (A·B), son altamente significativos ( $p < 0,01$ ) Por lo que se realizó una comparación de medias.

En la Figura 17 y Tabla 18 del Anexo, se observa el comportamiento promedio de la variable número de raíces en función a las accesiones, donde los resultados estadísticos mediante la prueba de Duncan al 5%, presentan diferencias altamente significativas, la Acc-20 tiene 10,93 raíces, seguidos por las Acc-14 y 18 con 9,68 y 9,07 raíces en comparación a la Acc-19 con 6,25 raíces, en el que están agrupados los resultados por tres grupos. Las diferencias encontradas podrían ser por los diferentes genotipos que representan el germoplasma. Gómez (2003), quien menciona que los diferentes comportamientos de las vitroplantas se deben a la diferencia de genotipos entre plantas de la misma especie.



**Figura 17.** Comparación de medias para la variable número de raíz en función a accesiones de oca.



**Figura 18.** Comparación de medias para la variable número de raíz en función a concentraciones de sales MS.

En la Figura 18 y Tabla 19 del Anexo, se observa que existen diferencias significativas mediante la prueba de Duncan 5%, en la variable número de raíz de accesiones de oca en función a las concentraciones de sales MS, donde la concentración al 40% fue el que obtuvo mayor número de raíces con 11,43 seguido por la concentración del 80% con 10,04 raíces, donde la concentración del 100% tuvo 8 raíces, en comparación al 60% en la cual alcanzó menor cantidad de raíces. Roca (1991), demuestra también que la reducción de nutrientes posiblemente ocasiona estrés en las plantas y como producto de ello se modifica su metabolismo bajando el crecimiento. Mejía (2006), mencionan que la etapa de multiplicación y enraizamiento mostro en un periodo de 155 días.

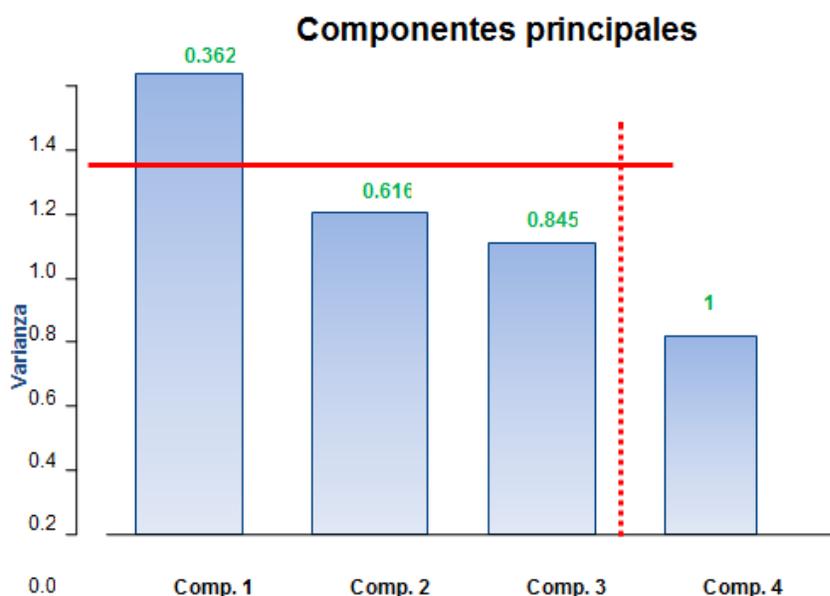
De la misma manera que Enríquez, del Valle *et al.*, (2005), indica al realizar estudios similares con cúrcuma (*Agave angustifolia*), al reducir las concentraciones de sales MS al 75%, en la fase de enraizamiento, adquirió buenos resultados. También Saucedo (1998), manifiesta que en la etapa de enraizamiento, es importante obtener un mayor número de raíces, aún de poca longitud, ya que las plantas obtenidas de cultivo *in vitro* requieren de un buen sistema radicular (mayor número de raíces) para tener éxito en trasplante y adaptación a condiciones de invernadero.

El valor de coeficiente de terminación ( $R^2$ ) para la variable número de hojas es baja y para las variables número de nudos, altura de vitroplanta y número de raíces tiene una determinación alta está por encima de 50%, es decir que las accesiones tiene una influencia o afecta a las concentraciones de sales MS en un 50%, el restante se debe a otros factores.

### 5.5 Análisis de Componentes Principales

Las variables dependientes fueron transformadas a componentes principales, esta fue interpretada tomando en cuenta sus valores, sus vectores propios y la varianza explicada por cada uno de los componentes, así como la proporción de la varianza.

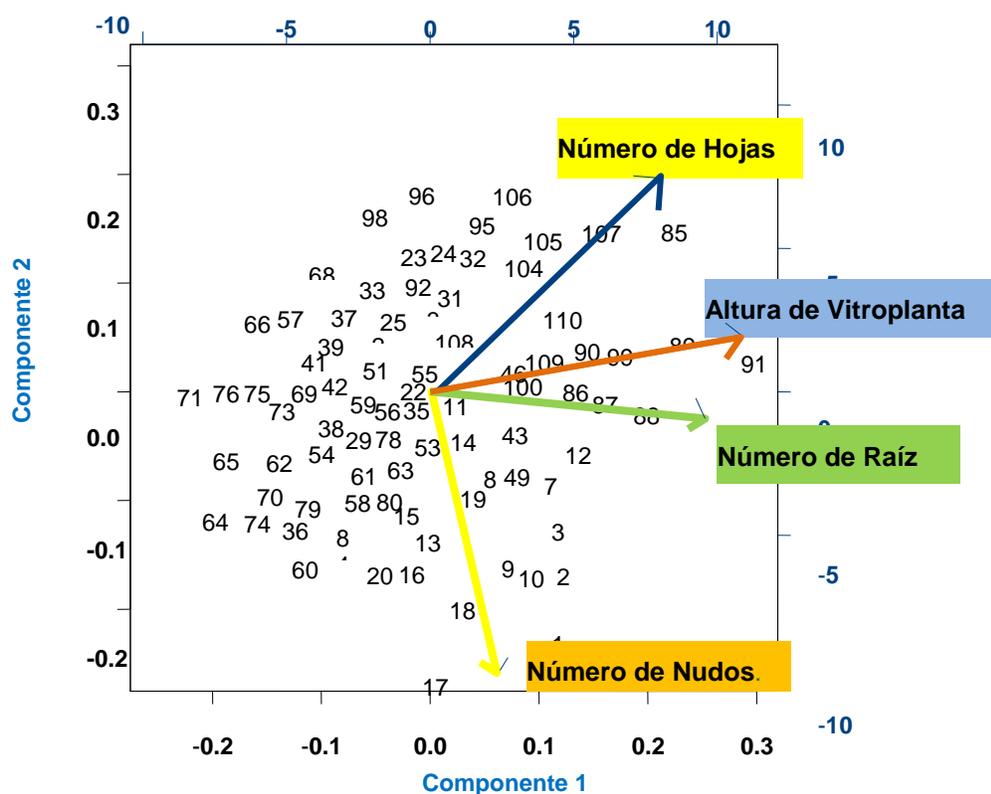
Los resultados obtenidos en este estudio, se interpretaron en función al valor propio (varianza de cada eje) de cuatro componentes principales. Este método permite generar un nuevo conjunto de variables dependientes, llamados componentes principales donde los valores miden la importancia y la contribución de cada componente a la varianza total.



**Figura 19.** Representación de sedimentación de los componentes principales de acuerdo a varianza evaluada de cuatro morfotipos de oca en concentraciones sales MS en la multiplicación *in vitro* en el laboratorio de biotecnología vegetal carrera ingeniería agronómica UPEA.

El gráfico de sedimentación de componentes principales de la Figura 19, muestran los valores frecuentes, confirmando que más allá de cuatro componentes, la tasa de ganancia de información asociada a la inclusión de un componente adicional se reduce significativamente, donde cada variable ha contribuido diferencialmente a la formación de características morfológicas del vitroplanta.

Se observa que los cuatro componentes principales, en el presente estudio esta explicado por grado de asociación mediante las variables sobresalientes fueron: altura de vitroplanta, número de hojas, número de nudos. De manera definida, tercer componente refleja una integración de factores, donde los valores propios miden la importancia y contribución de cada componente de la varianza total 85% acumulado.



**Figura 20.** Diagrama de Biplot, agrupación de variables de respuesta y componentes principales de cuatro morfotipos de oca en cuatro concentraciones de sales MS en la fase de multiplicación *in* en el laboratorio de biotecnología vegetal. Carrera ingeniería agronómica

Con la finalidad de mostrar en forma unida la distribución espacial de las cuatro variables cuantitativas, recurrimos a la construcción y representación gráfica de los mismos en un plano bidimensional para los tres primeros componentes principales, de manera que se puedan observar las proyecciones de las variables. En la Figura 20, se aprecia de forma transparente los resultados del análisis de componentes principales de un primer grupo donde las variables: altura de vitroplanta, número de raíces y número hojas, las cuales están altamente correlacionado entre ellas, es decir que a mayor altura de vitroplanta, mayor número de hojas y mayor cantidad de raíces en el explante, son las que están relacionadas. Asimismo, refleja una asociación positiva (ángulos agudos menores a  $90^\circ$ ) de dos grupos se encuentran alejadas del origen formando ángulos menores a  $90^\circ$ .

Esto significa que cuando una de las variables aumenta la otra variable también aumenta por la correlación existente entre las mismas, sin embargo la variable número de nudos es ambivalente con los componentes principales.

## 5.6 Análisis de Costos

Se realizaron un análisis de costo parcial se observa en la Tabla 20 de Anexo, para las concentraciones de sales MS (1962) en la fase de multiplicación *in vitro*, Para determinar costo total se utilizó la cantidad de producción en función al promedio número de nudos, para cada concentración de MS, se calculó costo total, ingreso total, ingreso neto, beneficio costo y rentabilidad a la inversión Los materiales, reactivos y gastos en laboratorio en todos los casos se mantiene constante los costos.

400 ml de medio de cultivo con sales MS a 100% de concentración tiene un costo de 462,2 bs. Al disminuir a 60% y 40% la concentración de sales minerales, el costo del medio bajaría en 402,26 bs y 370,9 bs respectivamente, sin afectar negativamente la calidad de las plantas y su capacidad de adaptarse al transferir a sustratos.

**Tabla 10.** Costos parciales para concentraciones sales Murashige Skoog 1962 de cuatro morfotipos de oca en condiciones *in vitro*.

<b>Costo de Producción</b>				
Concentraciones de sales MS	40%	60%	80%	100%
Costo Total	2,32	2,50	2,70	2,89
Ingreso Total	40,275	38,125	41,25	39,475
Ingreso Total x Vitroplanta	2,50	2,50	2,50	2,50
Ingreso Neto	0,18	0,00	-0,20	-0,39
Beneficio Costo	1,078	0,999	0,925	0,865
Rentabilidad a la Inversión	7,28%	0%	-8%	-12,44%

Según la Tabla 10, el valor más alto de rentabilidad se presentó en la concentración al 40%, 7,28%; esto es por cada 100 bs invertidos en costo, se recupera la inversión y rentabilidad a la inversión y se obtiene un plus de 7,28 bs. En la concentración de 60% no existe adición ni pérdida, en cambio para las concentraciones a 80% y 100% se reportó los valores negativos siendo no rentable la producción de vitroplantas, y se comprobó con el indicador Beneficio/costo, 0,925 en la concentración a 80% y 0,889 en concentración a 100%, menor al valor.

## 6. CONCLUSIONES

Para la fase de establecimiento:

1. El análisis de varianza y prueba de Duncan, muestra que existen diferencias estadísticas en las variables evaluadas. La accesión 20 presentó mejor respuesta en cuanto al comportamiento morfológico respecto a las variables altura de vitroplantas, número de hojas, número de nudos, porcentaje de supervivencia, contaminación, necrosis y fenolización, en comparación a la accesión 18 siendo el más susceptible.
2. En cuanto a posición de brotes del tubérculo, los meristemas medio y basal resultaron ser mejor en el desarrollo morfológico de vitroplantas, con respecto al meristemo apical, si bien presenta diferencias estadísticamente significativas, no llegan a ser de gran magnitud, las accesiones respondieron de diferentes formas a los métodos artificiales de propagación vegetativa.

Para la fase de multiplicación

3. En la fase de multiplicación *in vitro* la Acc-14 seguido por la Acc-20 tienen buen desarrollo en las variables número de hojas, altura de vitroplanta, número de nudos y número de raíz, en comparación a las accesiones 18 y 19, donde podemos resaltar que esta especie tiene una respuesta positiva en condiciones *in vitro*. También se observó que a menor longitud de vitroplanta tiene mayor número de nudos.

4. Para las concentraciones de sales MS se observó en las variables cuantitativas un mejor comportamiento a una concentración de 40%. En el cual a concentraciones bajas no afecta significativamente el desarrollo de las vitroplantas.
  
5. En los costos se mostró el valor más alto de rentabilidad en la concentración a 40% donde a 100 bs invertido se recuperó 7,28 bs. En cambio para las concentraciones de 80 y 100% los valores son negativos, siendo no rentable la producción de vitroplantas.
  
6. Se identificó agrupaciones de variables cuantitativas alineados en respectivos componentes principales, como en la variable número de hojas, altura de vitroplanta y número de raíz tienen correlación positiva.

## 7. RECOMENDACIONES

Para la etapa del establecimiento, se debe tener en cuenta que proceso de desinfección de los explantes, el meristemo apical es muy susceptible ya que el 40% murieron por la inmersión a la solución desinfectante de hipoclorito de sodio, se debe buscar el equilibrio para esta especie.

Se recomienda utilizar brotes del material vegetal de la parte medio y basal del tubérculo, debido a que estos explantes tuvieron buenos resultados con diferencias mínimas entre las variables evaluadas.

Continuar la investigación con brotes de tubérculo, en toda la fase de micropropagación y conservación *in vitro*, así para obtener material genético con las mejores características agronómicas.

Para la fase de multiplicación se recomienda utilizar el medio de cultivo de MS, a una concentración de sales a 40% a 60% para esta especie, ya que se comportan mejor, tuvo mayor representatividad y así evitar costo económico.

Establecer y multiplicar otras especies para observar el comportamiento morfológico *in vitro* a una concentración bajo de sales MS (1962) de lo establecido.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G. y Villarroel, C. 1998. Cultivo de tejidos aplicados en papa y en otros tubérculos andinos. En avances de la investigación agrícola en Bolivia. La Paz, Bolivia. 50 p.
- Arbizu, C. y Tapia, M. 1995. Avances de las investigaciones sobre tubérculos alimenticios de los Andes. Proyecto INIAA-CIID-ACDI (PISA). (Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú). Lima, Perú. 113 p.
- Aguirre, Gino; Baudoin, Jean Pierre; Leigue, Lelibeth (editores). 2010. Aplicación de Cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los Recursos Fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia. 200 p.
- Aspuaca, J. R. 2004. Respuesta del persimom *diospyros kaki* l. var. hachiya al cultivo de tejidos *in vitro* tesis presentada a la honorable junta directiva de la facultad de agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. 72 p.
- Arias, A. 2000. Micropropagación *Pelecypora Strobiñiformis*. [En línea]. Disponible en <http://mx.geocities.com/januarias/resumendelaconferencia.htm>.
- Ayerbe, L. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. PRACIPA – ediciones. Versión española. Mandí Prensa. Madrid-España.
- Amador, D. 1999. Manual de laboratorio: curso de cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 33 p.

- Cadima, X. García, W. y Ramos, J. 2003. Conservación y producción del cultivo de la papalisa (*Ullucus tuberosus*) Área Temática de Recursos Genéticos (RRGG)-Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 84 p.
- Cadima, F. X. 1996. Conservación *in vitro* a mediano plazo de papa y otros tubérculos andinos. Tesis Ing. Agronómica. UMSS, Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuaria. Cochabamba, Bolivia.
- Cárdenas, H. M., 1989. Manual de plantas económicas de Bolivia, 2 edición., Cochabamba (Bolivia), Ed. Los Amigos del Libro, 18-51 p.
- Carpio, S. J. 2001. Recuperación y conservación *in vitro* de ecotipos de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) de la provincia Camacho. Tesis de grado. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia. 21 – 22 p.
- Calderón, E. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate *Persea americana* Mill. Var. Guatemalensis. Hass y var. América. Booth al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 69 p.
- Castañeda, P. 1995. Bioestadística Aplicada Agronomía-Biología-Química. Edición. Trillas Mexica, DF. 214 p.
- Darías, R. 1993. Recopilación de Temas Sobre Técnicas de Cultivo *in-vitro*. Oruro, Bolivia. U.T.O. Universidad Camilo Cienfuegos de Matanzas Cuba. 168 p.
- Emshwiller, E. y Doyle J. J. 2002. Origen de domesticación y poliploidia en oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae) 2 Chloroplast- Expressed glutamine synthetase data. Department of Botany, New York. 15 p.
- Enríquez de Valle, J. R., Carrillo G. C. y Rodríguez, J. L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el Enraizado *in vitro* de nudos de *agave angustifolia*. Revista mexicana fitotecnia. Chapingo, México 175-178 p.

- Euita, E. 2003. Fitoreguladores parte III tema 14. [En línea]. España, Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema14.htm>
- Estrada, N. 1997. Conservación *in vitro* de tubérculos Andinos. En: Cultivos Andinos Sub explotados y su Aporte a la Alimentación. 2da Edición. FAO. Santiago, Chile. 28 p.
- Franco, T. e Hidalgo, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto internacional de recursos filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 8-31 p.
- Fernández, A. 2008. Cultivos Andinos INTA EEA Argentina Salta 5 p.
- FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009. Informe Nacional sobre el estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y Alimentación (RFAA) en Bolivia. Proyecto, fortalecimiento de los bancos de germoplasma vegetal 9-31 p.
- FAO IT. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Rosell, CV. y Villalobos, V. M. 113 p.
- Quispe, C., 1997. Parámetros agrofisiológicos del desarrollo y crecimiento de los cultivos papa (*Solanum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) e isaño (*Tropaeolum Tuberosum* R.) en Toralapa, Cochabamba, Tesis Lic. Agr., La Paz (Bol.), Facultad de Agronomía - UMSA, 4-15, 36 p.
- Giannoni, D., 2007. Cultivo de los incas, tubérculos oca (*Oxalis tuberosa*) PERUECOLOGICO. Lima, Perú. [En línea]. Disponible en [http://www.peruecologico.com.pe/tuberculos\\_gal.htm](http://www.peruecologico.com.pe/tuberculos_gal.htm)
- Gómez, E. 2003. Adaptabilidad de 5 variedades de papa amarga (*Solanum juzepczukii*) en diferentes medios de introducción y conservación *in vitro*. Tesis Ing. Agronómica. UMSA, Facultad de agronomía. La Paz, Bolivia. 84 p.

- Googleearth, 2007. [En línea]. Disponible en [www.googleearth.com](http://www.googleearth.com)
- Hurtado, D. y Merino, M. 1997. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, México. 233 p.
- IPGRI/CIP. 2002. Descriptores de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.). Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Centro Internacional de la Papa, Lima. 52 p.
- López, C. 2001. Reacciones de hipersensibilidad en plantas conservadas *in vitro* [En línea]. Disponible en: <http://www.ciencias.uma.es./publicaciones/encuentros/encuentro20/reacciones.html>.
- Lescano, R. 1994. Genética y Mejoramiento de Cultivos Alto andinos INADE/PELT - COTESU. Lima-Perú.
- Mamani, S. B. 2005. Comportamiento *in vitro* de dos variedades de Frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) para su micropropagación en diferentes medios de cultivo La Paz Bolivia 102 p.
- Mujica, A. y Jacobsen, S. E. 2000. Potencialidades de los Cultivos andinos menos estudiados para su adecuado aprovechamiento mediante la biotecnología en la región centro oeste de Sud América. Un desafío regional En: V seminario integración subregional. 27 – 29 de septiembre. CRISCOS. Universidad Arturo Prat. Iquique-Chile.
- Merino, M. 1997. Técnicas de Esterilización y Manipulación aséptica. In. Cultivo de Tejidos vegetales (Ed. D. Hurtado, M. Merino). Edt. TRILLAS. Mexico. 44 – 47 p.
- Mejía, J. M., Gonzales, S., Mora, R., R, J.E. 2006. Propagación *in vitro* de papa ratona (*Oxalis tuberosa* Mol.) México Chapingo, Revista Chapingo. Serie horticultura, julio – diciembre, 231 – 237 p.

- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *PhysiolPlantpp* 473 – 497 p.
- Pomar, G. M. V., 2002. Tuberización *in vitro* de *Oxalis tuberosa* Mol. “Oca” como una alternativa para la producción de tubérculos semillas, Universidad Nacional Mayor de Sana Marcos universidad del Perú, DECANA DE AMERICANA Facultad de ciencias Biológicas Tesis Lima Perú 117 p.
- PROINPA, (2001). Catálogo de ocas Bolivianas. Maca .Cochabamba, Bolivia.101 p.
- PROINPA, (2003). Producción de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), papalisa (*Ullucus tuberosus*) e isaño (*Tropaeolum tuberosum*). Desarrollo de estrategias de manejo de plagas y enfermedades. Fundación PROINPA, PBRTA, proyecto PAPA ANDINA. Cochabamba, Bolivia. 55 p.
- Pérez, J.1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. dis. Rojas Martínez Editorial Santa Clara. Villa Clara, Cuba.12 – 40 p.
- Patiño, F. 1998. Estudio del rendimiento potencial de la papa, papalisa, oca e isaño, empleando el modelo lintul, en Candelaria, prov. Chapare del departamento. De Cochabamba. Tesis Lic. Ing. Agr. Cochabamba – Bolivia UMSS, 4-7 p.
- Pierik, R. M. 1990. Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Ochoa, T. R. R. 2009. Diseños experimentales. El modelo lineal del diseño bloques al azar. ed. La Paz, Bolivia. 61 p.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y accesiones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali Colombia 970 p.

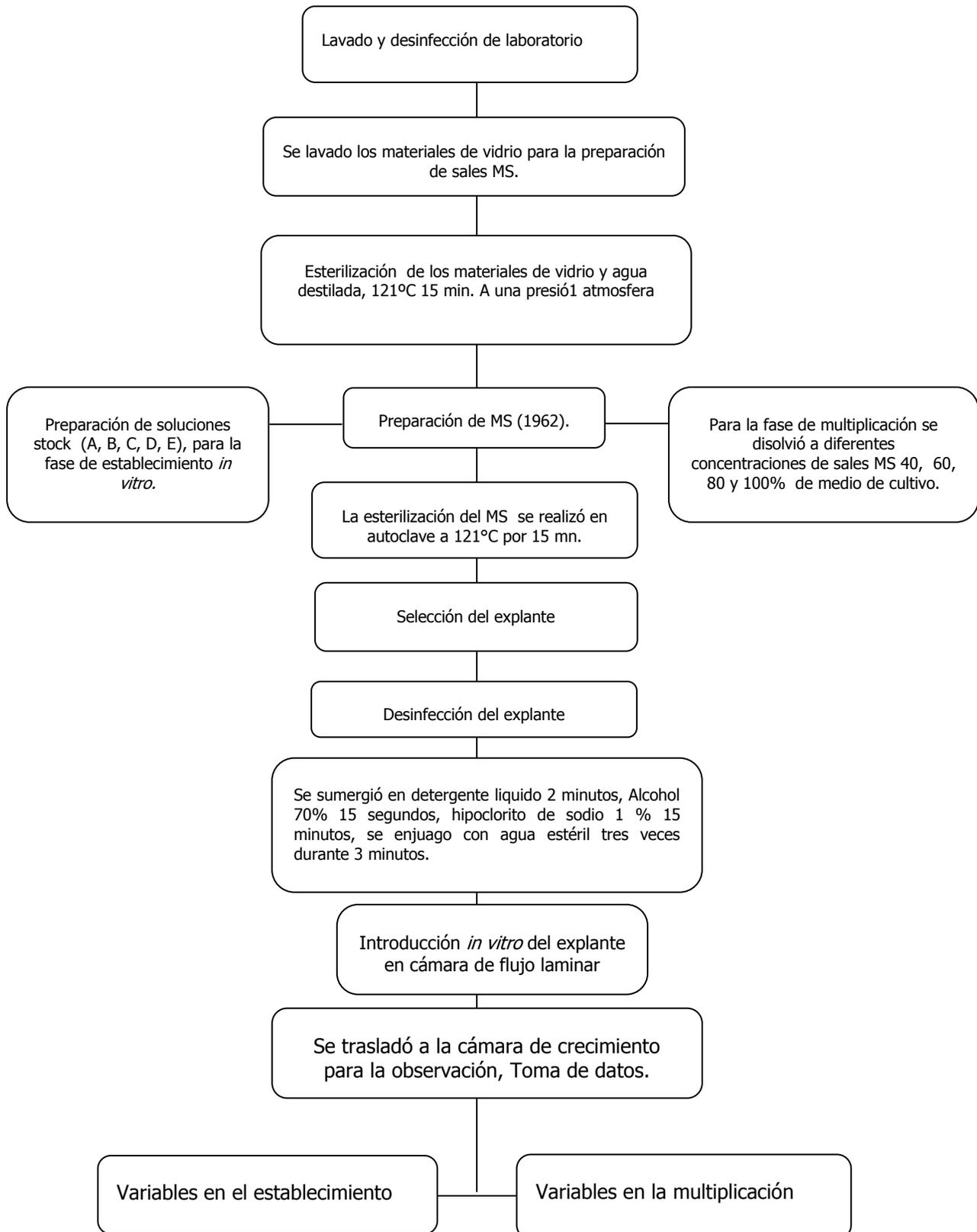
- Tapia, M. E. y Fries, A.M. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima.
- Tapia, C. G. B., Laura, M. E., y Raúl, C. T. 1991. Conservación *in vitro* de tubérculos Andinos técnicos del departamento de recursos fitogenéticos, INIAP. Casilla 340. Quito, Ecuador.
- Yampar, B. W.; Gómez, V. E.; Mendoza, C. V.H. 2006. Producción de semilla pre-básica de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) en sustratos hidropónicos. Centro de investigación Nucleares (CIN-Viacha), IBTEN La Paz, Bolivia.
- Valdivia, G.; Devaux, A.; Gonzáles, S.; Herbas, J.; Hijmans, R. 1999. Desarrollo y Producción de Oca e isaño Bajo Dos Niveles de Fertilización en Cochabamba, Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa (PROINPA). 121- 135 p.

**ANEXO**

**Tabla 11.** Medio de cultivo de formulado por Murashige y Skoog (1962).

Nº	COD	REACTIVO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN (mg)
<b>SOLUCIÓN A – MACRONUTRIENTES 100X (100 mL--- 10L)</b>				
1	A1	Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16500
2	A2	Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	19000
3	A3	Fosfato monobásico de potasio	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1700
4	A4	Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3700
<b>SOLUCIÓN B - MICRONUTRIENTES 100X (100 mL --- 10L)</b>				
5	B1	Ioduro de potasio	KI	8,3
6	B2	Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62
7	B3	Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	223
8	B4	Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	86
9	B5	Molibdato de Sodio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,5
10	B6	Sulfato de Cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,25
11	B7	Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25
<b>SOLUCIÓN C – CLORURO DE CALCIO 100X (100 mL --- 10L)</b>				
12	C1	Cloruro de calcio di hidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4400
<b>SOLUCIÓN D – QUELATOS DE HIERRO 100X (100 mL --- 10L)</b>				
13	D1	Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	278
14	D2	Etilendiamintetraacetato	Na <sub>2</sub> EDTA	373
<b>SOLUCIÓN E – VITAMINAS 100X (100 mL --- 10 L)</b>				
15	E1	Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> .HCl	1
16	E2	Piridoxina-HCl	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	5
17	E3	Ácido Nicotínico o niacina	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> .HCl	5
18	E4	Mioinositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1000
19	E5	Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	20
<b>ADITIVOS</b>				
20		Sacarosa	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	30.00 g*L <sup>-1</sup>
21		Agar		6.50 g*L <sup>-1</sup>
		Ph		5,8

**Figura 21.** Diagrama de procedimiento de la investigación.



**Tabla 12.** Prueba de Duncan para la variable número de Hoja en función a cuatro accesiones de oca.

Accesión	Número de Hoja (promedio)	Significancia
14	7,96	a
20	7,86	a
18	7,11	b
19	6,57	c

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 13.** Prueba de Duncan para la variable número de Hoja en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).

Nº	Concentraciones de M.S.	Número de Hoja (promedio)	Significancia
1	100%	7,93	a
2	80%	7,21	b
3	60%	7,21	b
4	40%	7,14	b

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 14.** Prueba de Duncan para la variable número de nudos en función a cuatro accesiones de oca.

Accesión	Número de nudos (promedio)	Significancia
14	18,54	a
19	15,75	b
18	15,04	bc
20	14,32	c

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 15.** Prueba de Duncan para la variable número de nudos en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).

Nº	Concentraciones de M.S.	Número de nudos (promedio)	Significancia
1	80%	16,5	A
2	40%	16,11	A
3	100%	15,79	ab
4	60%	15,25	B

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 16.** Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro accesiones de oca.

Accesión	Altura de Vitroplanta (promedio)	Significancia
20	48,18	A
14	41,5	B
18	41,07	B
19	37	C

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 17.** Prueba de Duncan para la variable altura de vitroplanta en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).

Nº	Concentraciones de M.S.	Altura de Vitroplantas (promedio)	Significancia
1	40%	45,07	a
2	60%	41,25	b
3	100%	40,79	b
4	80%	40,64	b

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 18.** Prueba de Duncan para la variable número de raíz en función a cuatro accesiones de oca.

Accesión	Número de Raíz (promedio)	Significancia
20	10,93	a
14	9,68	b
18	9,07	b
19	6,25	c

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 19.** Prueba de Duncan para la variable número de raíz en función a cuatro concentraciones de sales (Murashige y Skoog, 1962).

Nº	Concentraciones de M.S.	Número de Raíz (promedio)	Significancia
1	40%	11,43	a
2	80%	10,04	b
3	100%	8,00	c
4	60%	6,46	d

\*Los promedios unidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 20.** Costos parciales para concentraciones sales Murashige Skoog 1962 de cuatro morfotipos de oca en condiciones *in vitro*.

ITEM	CANT	UNIDAD	COST/U	[ ]40%	[ ]60%	[ ]80%	[ ]100%	CST/TL
<b>material</b>								
tubos de ensayo	160	tubo	2	80	80	80	80	320
cajas petri	8	pieza	10	20	20	20	20	80
frasco ámbar	10	pieza	1	2,5	2,5	2,5	2,5	10
frascos de vidrio	20	pieza	2,5	12,5	12,5	12,5	12,5	50
pipetas	5	pieza	30	37,5	37,5	37,5	37,5	150
probetas	1	pieza	74	18,5	18,5	18,5	18,5	74
Matraz	1	pieza	57	14,3	14,25	14,25	14,25	57
pinzas	4	pieza	10	10	10	10	10	40
mangos bisturí	1	pieza	30	7,5	7,5	7,5	7,5	30
algodón	1	rollo	18	4,5	4,5	4,5	4,5	18
hojas bisturí	2	hoja	2	1	1	1	1	4
papel madera	1	hoja	1	0,3	0,25	0,25	0,25	1
papel filtro	1	hoja	5	1,3	1,25	1,25	1,25	5
estilete	1	unidad	2	0,5	0,5	0,5	0,5	2
parafilm	1	rollo	25	6,3	6,25	6,25	6,25	25
atomizador	1	unidad	5	1,3	1,25	1,25	1,25	5
papel aluminio	1	rollo	25	6,3	6,25	6,25	6,25	25
mecheros	1	unidad	5	1,3	1,25	1,25	1,25	5
<b>Reactivos</b>								
sales MS	400	ml	1	57,1	85,71	114,28	142,85	400
sacarosa	1	1libra	4	1	1	1	1	4
agua destilada	10	litros	5	12,5	12,5	12,5	12,5	50
lavandina	1	sachet	3	0,8	0,75	0,75	0,75	3
detergente omo	1	bolza	3	0,8	0,75	0,75	0,75	3
alcohol	5	litros	10	12,5	12,5	12,5	12,5	50
Otros imprevis. (10%)				61	63,8	65,2	66,6	
<b>TOTAL (Bs.)</b>				<b>370,9</b>	<b>402,26</b>	<b>432,23</b>	<b>462,2</b>	<b>1411</b>
<b>calculo económico para una vitroplanta</b>								
Costo Total				2,32	2,5	2,7	2,8	
Ingreso Total				2,5	2,5	2,5	2,49	
Ingreso Neto				40,27	38,12	41,25	39,47	
Beneficio Costo				1,078	1	0,925	0,889	
Rentabilidad a la								
Inversión				7,28%	0%	8%	-12,44%	