



Efecto de tres concentraciones de carbón activo y diferentes fuentes de carbono, en multiplicación de vitroplantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L. Ssp. *Andigena*)

Effect of three concentrations of active carbon and different sources of carbon, in multiplication of vitroplantas of Imilla Negra Potato (*Solanum tuberosum* L. Ssp. *Andigena*)

Jeannet Quisbert Cuchut y Rafael Adolfo Murillo

RESUMEN:

Con el propósito de analizar el germoplasma de papa el presente trabajo tubo la finalidad de estudiar el efecto de tres concentraciones de carbón activo y diferentes fuentes de carbono, en multiplicación de vitroplantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L. ssp. *Andigena*). Para el desarrollo del trabajo se utilizó muestras de papa ya recolectadas de la comunidad Yanarico del municipio de Tiahuanaco que se encontraban en laboratorio de biotecnología vegetal de nuestra facultad, por lo que se realizaron diferentes tratamientos para lograr el establecimiento in vitro y optimizar el medio de cultivo, una vez logrado esto se procedió con el desarrollo del tema en estudio. El análisis estadístico nos demuestra que el mayor crecimiento de *vitro plantasse* obtiene en T1 con el uso de azúcar comercial 30 gr/lit y C.A. 1 gr/lit y con un segundo lugar en obtener el mayor rendimiento se tiene T3 con el uso de azúcar comercial 30 gr/lit y C.A. 4 gr/lit, la glucosa obtuvo un tercer lugar en el crecimiento con el T11, de esta forma se pueden descartar los demás tratamientos si se quiere obtener un crecimiento rápido de *vitro plantas*. También se pudo tomar en cuenta la obtención de pigmentación de la especie y se llegó a la conclusión de que las fuentes de carbono tienen gran influencia en este desarrollándose un 75 % con pigmentación optima y un 25% no logro obtener la pigmentación correspondiente a la especie esta fue cuando se utilizó melaza 10 gr/lit de medio de cultivo.

PALABRAS CLAVE:

Fuentes de carbón, Cultivo in vitro, carbón activo, papa imilla negra.

ABSTRACT:

With the purpose of analyzing the potato germplasm, the present work aimed at studying the effect of three concentrations of active carbon and different carbon sources, in multiplication of Black Imilla Potato plants (*Solanum tuberosum* L. ssp. *Andigena*). For the development of the work, potato samples already collected from the Yanarico community of the municipality of Tiahuanaco that were in the plant biotechnology laboratory of our faculty were used, so different treatments were carried out to achieve in vitro establishment and optimize the environment of Cultivation, once this was achieved, the topic under study was developed. Statistical analysis shows that the highest growth of vitro plants is obtained in T1 with the use of commercial sugar 30 gr/l and C.A. 1 gr/lit and with a second place in obtaining the highest yield, T3 is obtained with the use of commercial sugar 30 gr/lit and C.A. 4gr/lit, glucose obtained a third place in growth with T11, in this way you can rule out the other treatments if you want to obtain a rapid growth of vitro plants. It was also possible to take pigmentation of the species into account and it was concluded that carbon sources have a great influence on this, developing 75% with optimal pigmentation and 25% failed to obtain the pigmentation corresponding to the species This was when molasses 10 gr/l of culture medium was used.

KEYWORDS:

Coal sources, in vitro culture, active carbon, black Imilla potato.

AUTORES:

Jeannet Quisbert Cuchut: Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. jeannet-31@hotmail.com.

Rafael Adolfo Murillo: Docente. Carrera Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. rafomurillo@gmail.com.

Presentado: 15/04/19. Aprobado: 25/06/19.



INTRODUCCIÓN

La Papa es un cultivo de gran importancia para el mundo y en especial para Bolivia ya que es un alimento de consumo diario y difícil de remplazar. Bolivia constituye parte de su centro de origen y por lo tanto un área con alta variabilidad genética, de esta diversidad, existen cultivares que pueden tener enorme aceptación por parte de los productores para el mercado nacional e internacional, pero por falta de un manejo adecuado, esta diversidad se va perdiendo con el transcurrir de los años.

Diferentes organizaciones e instituciones están trabajando en la conservación de germoplasma y buscando algunas posibilidades para sacarle un beneficio a las características que tiene el material genético, tal es el caso del CEPA, IBTEN, la consultora “Marketing SRL.” y otros que trabajan para lograr tener la semilla limpia y así lograr aumentar los rendimientos de producción ofreciendo semilla libre de virus y certificada al productor.

Se considera el problema de investigación, como la necesidad de conocer el efecto de las concentraciones de carbón activo, además de combinar con diferentes fuentes de carbono que pueden apoyar la multiplicación de vitro plantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena*). Para ello se dispone del apoyo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Facultad de Agronomía, de la Universidad Mayor de San Andrés.

MARCO TEORICO

Fuentes de carbón

Las células verdes del cultivo generalmente no son fotosintéticamente activas y requieren una fuente de carbono. En el cultivo de células se usa comúnmente sacarosa o glucosa al 2-5% (p/v). También se puede usar otras fuentes de carbohidratos, como la fructosa y el almidón. (Smith, 2013)

La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se le remplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100mg/L) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos. (Abriata, et al, 2010)

Según Arroyo (2017), la sacarosa está compuesta por dos monosacáridos (glucosa y fructuosa) unidos por enlaces covalentes, no contiene ningún tipo de nutrientes vitamínico o mineral, únicamente es la fuente de energía.

La melaza es un jarabe o sustancia espesa y viscosa de color oscuro, que ha sido aislada como residuo de la cristalización final del azúcar y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por método físico. Los nutrientes que posee la melaza son: vitamina del grupo B, potasio, calcio, ácido fosfórico, hierro, cobre y magnesio.

La miel de abeja es un producto fluido y viscoso, hidróscopio y de sabor dulce, las propiedades químicas físicas y organolépticas de la miel dependerán de la variedad del néctar que recolectan las abejas. Por lo general el contenido de la miel es de agua del 17-20%, carbohidratos del 75-80%, proteínas 0.3% y minerales 0.2%. los azúcares que predominan en la miel son fructuosa y la glucosa, encontrándose en menor proporción la maltosa y la sacarosa.

Pan y Van Staden (s/f), investigo el efecto del carbón activado, autoclave y medios de cultivo en la hidrólisis de sacarosa. La hidrólisis de la sacarosa en medios de cultivo de tejidos y/o soluciones acuosas de sacarosa (5%) que contienen carbón activado (tamponado a pH 5,8) dependió tanto de la concentración de iones de hidrogeno (pH) como del tratamiento en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, se registraron respectivamente 70%, 56% y 53% de hidrólisis de sacarosa en una solución de sacarosa al 5%, medio líquido de Murashige y Skoog (MS) y Gamborg BS (B5) en presencia de carbón activado al 1% , añadido antes del

autoclave .en ausencia de carbón activado, la esterilización en autoclave dio lugar a que aproximadamente el 20% de la sacarosa se hidrolizara.

Cultivo in vitro

Pérez, citado por Peralta (2007), menciona que los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a 1902 con la teoría de la totipotencia celular, enunciada por Haberlandt, quien postula que toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta completa genéticamente idénticas a sus progenitoras.

El cultivo *in vitro* se utiliza para realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica general; para la obtención de plantas libres de patógenos; para la conservación de germoplasma; para la producción de metabolitos secundarios; para le mejora genética mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* o la hibridación somática; para la introducción de nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y para la propagación masiva de plantas. (Alonso, 2002)

La propagación clonal in vitro permite obtener plantas homogéneas, en mayor cantidad y libres de patógenos, además en cultivo de papa permite generar vitroplantas nuevas en un corto tiempo, al decir de Gómez, citado por Quispe (2009).

Carbón activo

El carbón activo es un material poroso y sin sabor que se distingue del carbono elemental mediante la eliminación de todas las impurezas que no son de carbono y la oxidación de la superficie del carbono. Es un componente esencial de muchos medios de cultivo de tejidos vegetales, que previene el pardeamiento de los tejidos cultivados y los medios mediante la absorción de compuestos tóxicos como los polifenoles liberados por los tejidos cultivados. (Thomas, citado por Priya et al, 2015)

Algunas plantas se caracterizan por liberar pigmentos oscuros después de un corte. Estos pigmentos son compuestos fenoles y taninos que se oxidan y posteriormente dificultan el crecimiento y desarrollo del cultivo in vitro. El carbón activado es un compuesto antioxidante ya que contribuye a absorber esos compuestos fenólicos. Se adiciona en concentraciones cercanas al 0.1-9% (peso/vol).

La adición en los medios de cultivo podrá ser beneficiosa o adversa estando ello supeditado a los objetivos de investigación, mientras que sus efectos sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de tejidos dependerán del tipo de carbón activado utilizado, grado de activación y de la especie vegetal cultivada. (Pan y Staden, citado por Abedini et al, 2015)

Papa Imilla Negra

Su hábito de crecimiento, semi erecto ciclo vegetativo tardío (150 a 180 días), zonas de cultivo con alturas entre 3.000 a 4.000 msnm de los departamentos de La Paz, Potosí, Oruro, Chuquisaca y Cochabamba.

Morfológicamente es de color de la flor azul morado con jaspes violetas, forma del tubérculo redondo con ojos profundos, color de la piel negro, color de la pulpa blanco.

Es susceptible al nemátodo Rosario (*Nacobbus aberrans*), Verruga (*Synchytrium endobioticum*). Tolerante al virus PLRV, y ligeramente tolerante a sequías y heladas. (PROINPA,1994)

Según una encuesta familiar, al igual que la variedad Waych'a, se obtienen buenos rendimientos (23 qq/ha), los tubérculos son de tamaño grande, tienen demanda en el mercado, la cosecha es temprana. Esta variedad es considerada como la que genera mayor cantidad de ingresos. (Canqui y Morales, 2008)

Según Bustillos (2018), el color de la flor es azul morado con jaspes, el tubérculo es redondo con

ojos profundos, el color de la piel es negro, y de color blanco la pulpa. Tiene un hábito de crecimiento semi-erecto, su ciclo vegetativo es tardío de 150 a 180 días y se desarrolla entre 3.500 a 4.000 msnm el producto es consumida como papa hervida y puré.

MATERIALES Y METODOS

Localización

La presente investigación se llevó a cabo en laboratorio de Biotecnología Vegetal, ubicada en la Facultad de agronomía (UMSA) de la ciudad de La Paz que se encuentra a 3693 msnm de altitud, entre los 16° 30.378" de latitud sur y los 68° 07.970" de longitud Oeste del Meridiano de Greenwich. (GPS Essentials, 2016)

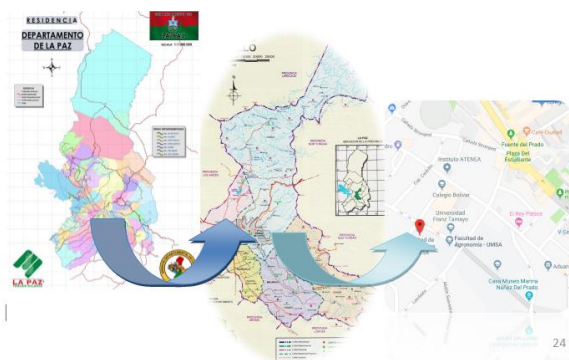


Figura 1. Localización del laboratorio de biotecnología Vegetal donde se llevó a cabo la investigación.

Materiales

Material biológico: Vitro plantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L. ssp. *Andigena*) recolectado de la comunidad Yanarico del municipio de Tiahuanaco que se encontraban en laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad.

Material de laboratorio: Tubos de ensayo, espátulas metálicas para pesar, pipeta, vasos de precipitado, gotero, magneta, botellas de agua destilada y esterilizada, piceta, aluminio, plastifilm, pinzas de disección, tijera, cajas petri, frasco pequeño con alcohol para el flameado de

pinzas y tijeras, mechero, gradillas, estantes con focos led, termómetro.

Reactivos de laboratorio: Macronutrientes, micro nutrientes, cloruro de calcio, quelato de hierro, vitamina, mynositol, agar, fuentes de carbono (sacarosa, miel, melaza y glucosa), carbono activo, hidróxido de sodio

Equipos de laboratorio: Destilador de agua, balanza analítica y de precisión, pHmetro, refrigerador, agitador magnético, micro ondas, autoclave vertical, cámara de flujo laminar, timer.

Material de gabinete: Cámara fotográfica, libreta de apuntes, material de escritorio.

Modelo estadístico

Según Ochoa (2009), el modelo lineal aditivo del diseño experimental es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Una observación cualquiera.

μ = Media poblacional.

α_i = Efecto de la i-ésima fuente de carbono .

β_j = Efecto de la j-ésima concentración de carbón activo.

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción entre fuente de carbono x concentración de carbón activo.

e_{ijk} = Error experimental.

Los factores evaluados fueron los siguientes:

Factor A. Fuente de carbono:

a_1 = Azúcar comercial (30 gr/lit)

a_2 = Miel de caña melaza (10 gr/lit)

a_3 = Miel de abeja (40 gr/lit)

a_4 = Glucosa (20 gr/lit)

Factor B. Concentración de carbón activo:

b_1 = C.A. 1 gr/lit

$b_2 = \text{C.A. } 2 \text{ gr/lt}$

$b_3 = \text{C.A. } 4 \text{ gr/lt}$

La combinación de estos factores da como resultado doce tratamientos, con diez repeticiones, haciendo un total de 120 unidades experimentales

Variables de respuesta

Número de hojas

Se realizó por conteo directo a cada una de las repeticiones, las cuales contaban con una vitroplanta por tubo.

Altura de planta

La medida se realizó a cada una de las repeticiones, desde la base de la yema insertada hasta el extremo del peciolo, en unidades de centímetro.

Obtención óptima de la coloración de la especie

Este tipo de observación se la realizó de manera directa a los tratamientos.

No se logró cuantificar el número de raíces por tratamiento esto porque el carbón activo oscureció el medio de los tratamientos como se puede ver en la siguiente fotografía

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Altura de planta

En la figura 2 se muestra el crecimiento de las vitroplantas después de 14 días de la multiplicación. Donde se puede observar que el T1 con azúcar comercial 30 gr/lt y 1 gr/lt de carbón activo, se diferencia de los demás tratamientos.

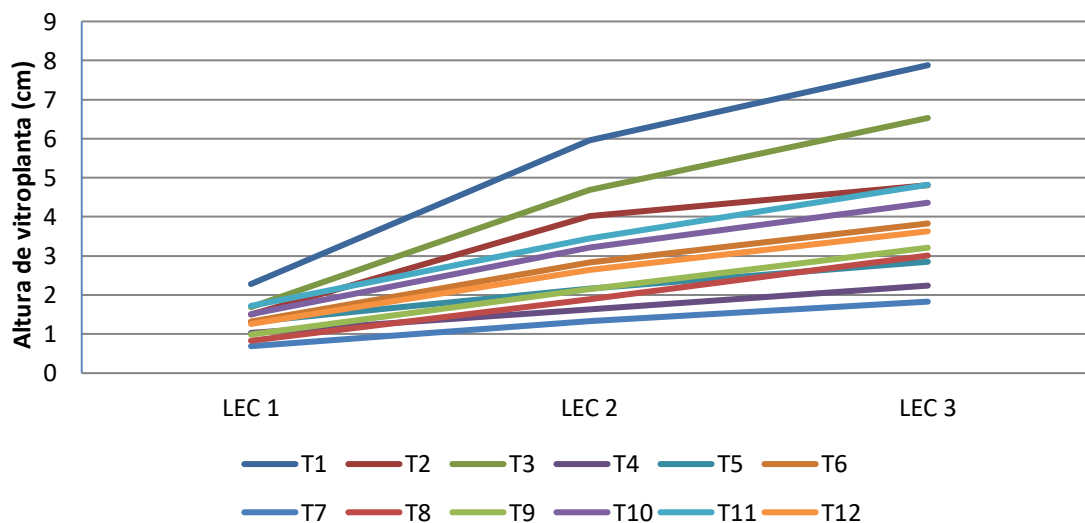


Figura 2. Curvas de crecimiento para doce diferentes tratamientos combinados de diferentes fuentes de carbono (azúcar comercial, miel de caña, miel de abeja y glucosa) con diferentes concentraciones de carbono activado, en tres tomas de datos cada 5 días.

El Análisis de varianza para la altura de planta se encontró una alta significancia para las fuentes de carbono y para la combinación fuentes de carbono-carbón activado, y una significancia para carbón activado. (ver tabla 1, en anexos)

Según la tabla 1, se puede determinar que existe diferencia altamente significativa entre el uso de diferentes fuentes de carbono en la utilización de carbón activo se puede observar un valor significativo por lo cual se recomienda ver las pruebas de Duncan en la tabla 3, como se

puede ver si existe el efecto de interacción con alta significancia al momento de realizar las diferentes combinaciones de los tratamientos para lograr un mayor crecimiento.

Weatherhead y heanshaw (1978), indican que la adición de carbón activado (AC) a varios sistemas de cultivo de tejidos tienen un efecto promotor sobre el crecimiento, en un intento por explicar este efecto se ha demostrado que absorbe las diferentes hormonas, donde el C.A. que se utilizó se en medio de cultivo se examinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear 1H y se encontró que contenía 5 hidroximetilfurfural (HMF). El HMF se produce por deshidratación de sacarosa durante el autoclavado y en ausencia de C.A. inhibió el crecimiento de cultivos de antera de *Nicotianatabacum*.

Pan y Staden (1998), informa que el carbón activado eliminaba los compuestos inhibidores del medio de cultivo (como el 5-hidroximetilfurfural que se produce a partir de la sacarosa durante el autoclave).

Según Thomas, el carbón activado se usa a menudo en el cultivo de tejidos para mejorar el crecimiento y el desarrollo celular. Desempeña un papel crítico en la micropropagación, la germinación de semillas de orquídeas, la embriogenesis somática, el cultivo de anteras, la producción de semillas sintéticas, el cultivo de protoplastos, el enraizamiento, el alargamiento del tallo, la formación de bulbos, etc.

Altura de planta y prueba de Duncan para las fuentes de carbono

Con las pruebas de Duncan en la tabla 2, se puede observar que con el azúcar comercial se obtuvieron datos más altos en el crecimiento y con una alta significancia, en comparación con las demás fuentes de carbono. Además la glucosa con una concentración menor que el azúcar también puede ser utilizada pero rinde un crecimiento menor, en cuanto a la melaza y miel de abeja se puede observar que no existe significancia alguna por lo tanto no se recomienda su uso. (ver tabla 2, en anexos)

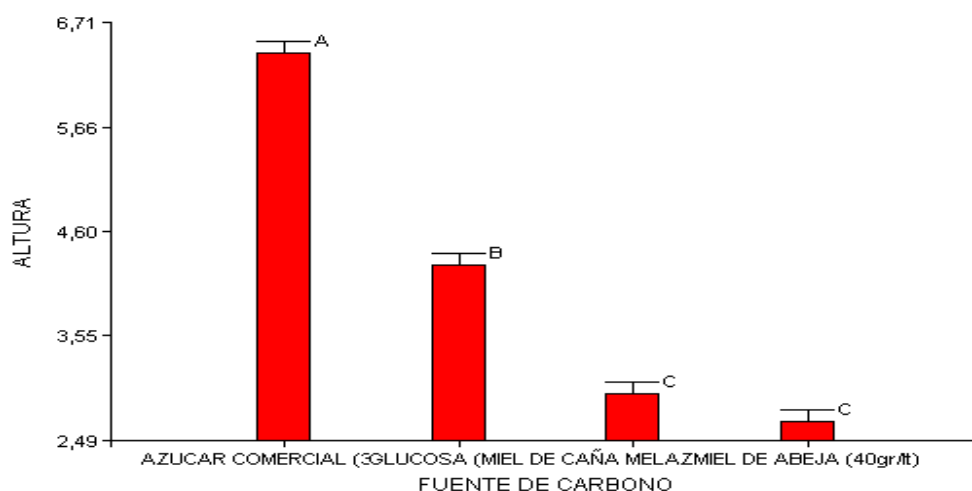


Figura 3. Altura de planta y prueba de Duncan para las fuentes de carbono.

En la figura 3 se puede observar muy claramente la diferencia de crecimientos que existe al momento de utilizar las diferentes fuentes de carbono.

Altura de planta y prueba de Duncan para carbono activado

En la tabla 4, según el test de Duncan se obtiene una mayor significancia si se utiliza el carbono activo a una concentración de 4 gr/lit en

comparación con la demás y se descarta el uso de la concentración de 1 y 2 gr/lit del mismo. (Ver tabla 3, en anexos)

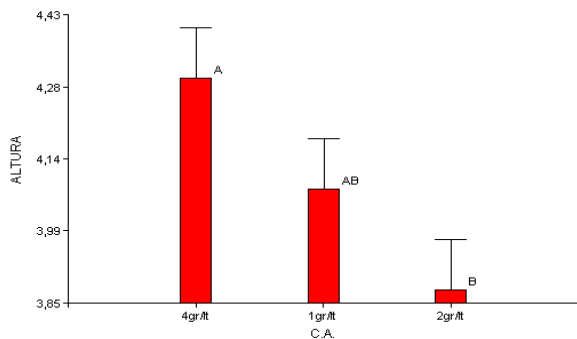


Figura 4. Prueba Duncan para el uso de carbono activado y Altura de planta.

En la figura 4, se puede observar la diferencia de crecimientos que existe al momento de utilizar las diferentes concentraciones de Carbono Activado.

Altura de plantas y prueba de Duncan para la interacción del uso de carbono activo y fuentes de carbono

El efecto de interacción nos muestra que el mayor crecimiento de *vitro plantasse* obtiene en T1 con el uso de azúcar comercial 30 gr/lit y C.A. 1 gr/lit y con un segundo lugar en obtener el mayor rendimiento se tiene T3 con el uso de azúcar comercial 30 gr/lit y C.A. 4gr/lit, la glucosa obtuvo un tercer lugar en el crecimiento con el T11, de esta forma se pueden descartar los demás tratamientos si se quiere obtener un crecimiento rápido de *vitro plantas*. (ver tabla 4, en anexos)

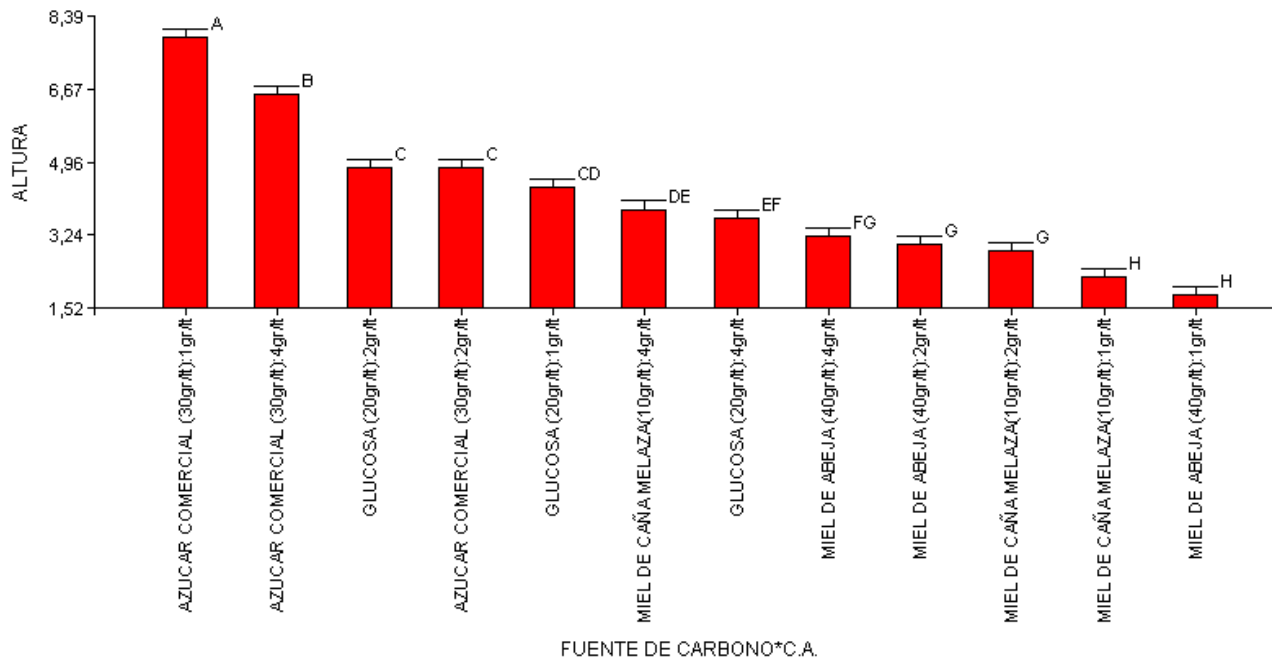


Figura 5. Efecto de interacción y los niveles de significancia en el crecimiento del cultivo.

Número de hojas

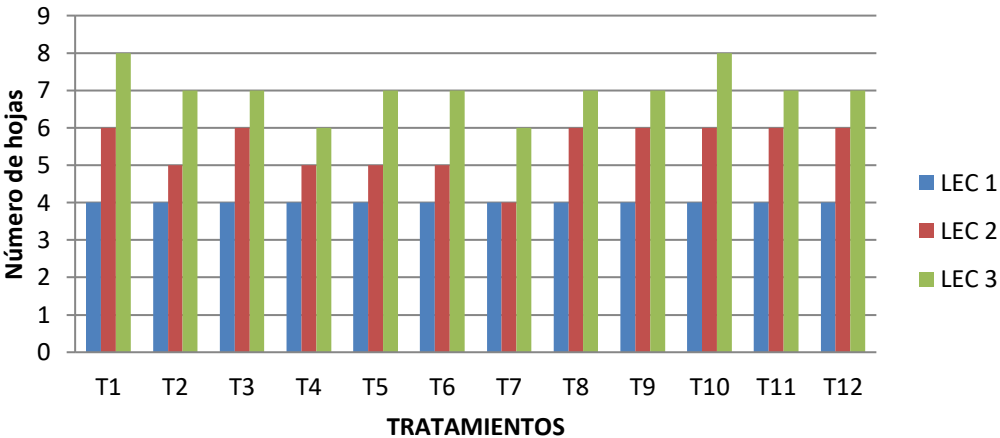


Figura 6. Desarrollo de hojas para doce diferentes tratamientos combinados de diferentes fuentes de carbono (azúcar comercial, miel de caña, miel de abeja y glucosa) con diferentes concentraciones de carbono activado.

Según la tabla 5, se puede determinar que existe diferencia significativa entre el uso de diferentes fuentes de carbono, sin embargo, la utilización de carbón activo no es significativo por lo cual se recomienda el uso de la concentración de 1 g/lit ya que esto puede tener influencia en la producción, como se puede ver si existe el efecto de interacción al momento de realizar las diferentes combinaciones de los tratamientos. (Ver tabla 5, en anexos)

Sudhir (1978), evaluó el efecto de la sacarosa, glucosa y el manitol sobre el polen en la formación de embriones de anteras cultivadas, el efecto de la sacarosa no pudo ser remplazado por glucosa sin embargo, cuando la sacarosa se utilizó junto con la glucosa (sacarosa 2% + glucosa4%) había un incremento triple en el porcentaje de respuesta, de esta manera sugiere que la sacarosa podría estar jugando algún papel morfo genético además suministrando la energía necesaria pero sin actuar como osmoticum.

Ramirez (2011), menciona que la combinación de altas concentraciones de sacarosa (116.86 mM) combinadas con carbón

activado (2g/L) redujo significativamente la organogenesis en *Annona glabra*.

Fridborg, citado por Ramírez (2011), menciona que el carbón activo es un coadyuvante útil para el crecimiento de las yemas debido a su capacidad para unir concentraciones excesivas de reguladores del crecimiento de las plantas y compuestos tóxicos que de otro modo podrían inhibir la morfogénesis.

Quorin, et al, (2001), indican que el uso de carbono activado en estudios de reproducción in vitro y enraizamiento en *Acacia mearnsii* De Wild. Demostró ser eficiente para promover el enraizamiento y el desarrollo normal de la parte aérea de la planta, así como para prevenir la clorosis de las hojas.

Número de hojas y prueba de Duncan para las fuentes de carbono

En la tabla 6, se observa que hay un mayor desarrollo en el número de hojas cuando se utiliza el azúcar comercial, y no se encuentra significancia entre al uso de las otras fuentes de carbono. (ver tabla 6, en anexos)

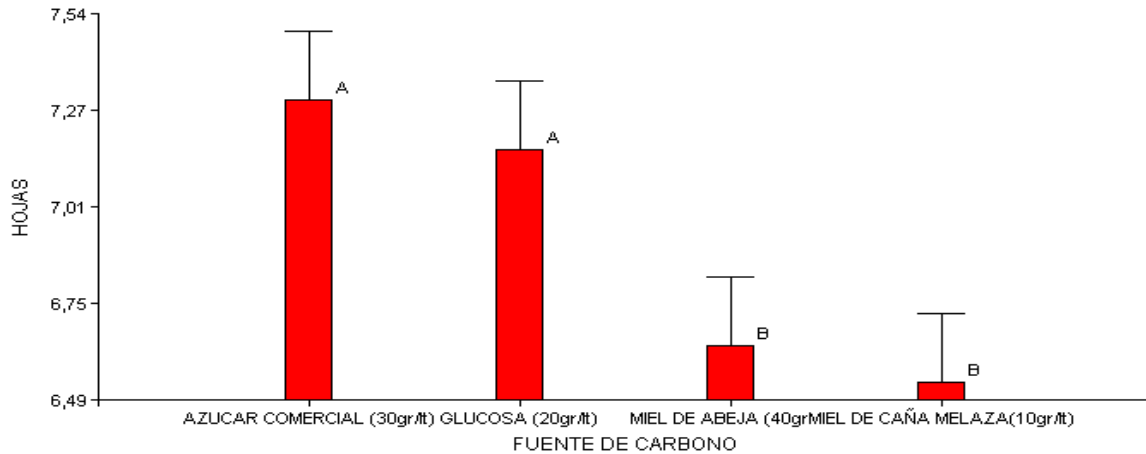


Figura 7. Hojas por diferentes fuentes de carbono.

Número de hojas y prueba de Duncan para la interacción del uso de carbono activo y fuentes de carbono.

En el efecto de interacción de las diferentes combinaciones según Duncan se obtuvo con alta significancia en mayor desarrollo

en número de hojas en el T1 con azúcar comercial (30 gr/lt) y C.A. 1 gr/lt con una media de 8 hojas por vitroplanta. Se puede observar que con un nivel de confiabilidad del 0.01% no hay diferencia significativa entre los otros tratamientos. (ver tabla 8, en anexos)

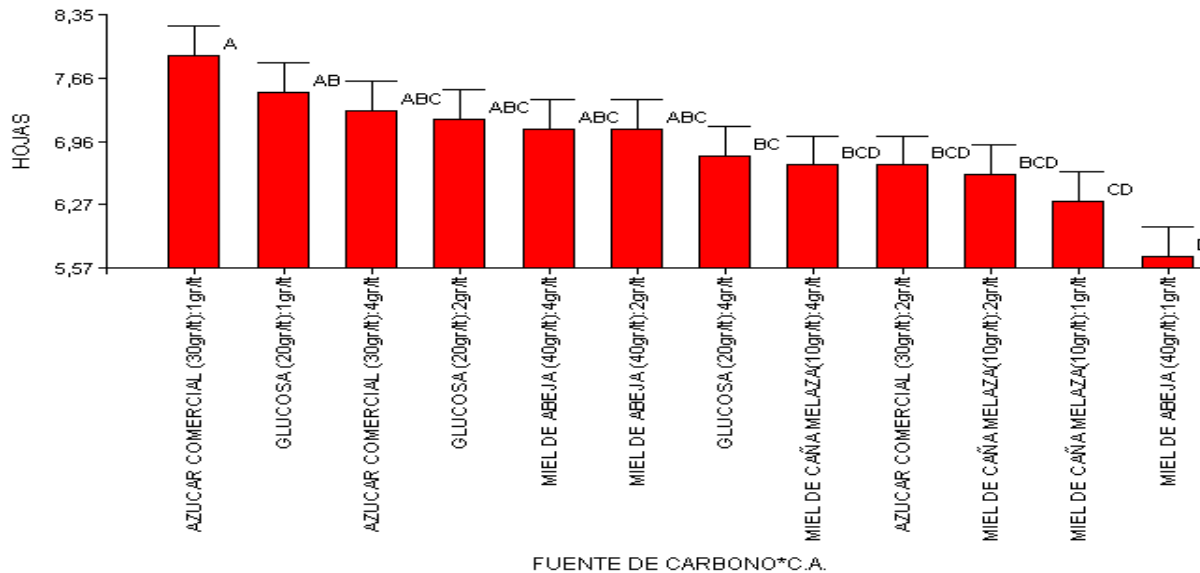


Figura 8. Interacción entre número de hojas y las diferentes combinaciones de C.A. y las diferentes fuentes de carbono.

Número de hojas y prueba de Duncan para el uso de carbono activo.

En el cuadro 7, se observa que hay un mayor desarrollo en el número de hojas cuando se utiliza el azúcar comercial, y no se encuentra

significancia entre al uso de las otras fuentes de carbono. (ver tabla 7, en anexos)

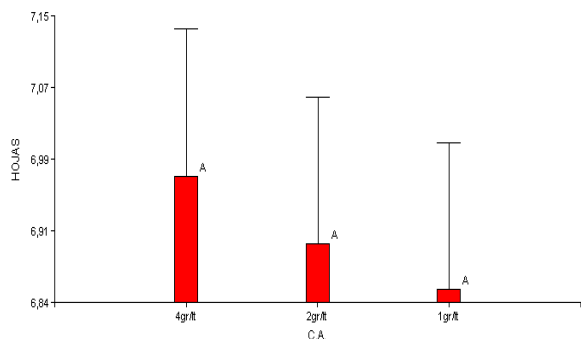


Figura 9. En el grafico se puede observar claramente la diferencia que existe al usar las diferentes concentraciones de C.A.

Coloración de plantas

La tabla 9, muestra que solo se mostró el color óptimo de la especie los tratamientos con azúcar comercial, miel de abeja y glucosa y no desarrollaron el color óptimo los tratamientos con melaza. (ver tabla 9, en anexos)

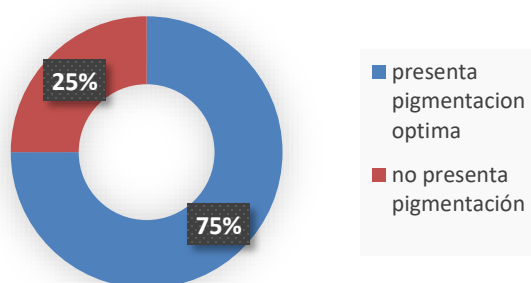


Figura 10. En este grafico se puede observar el porcentaje de plantas con coloración.

El 75 % de plantas logró una coloración óptima sin embargo el 25% perteneciente a los tratamientos con melaza, no logró obtener su coloración, desarrollando plantas verdes sin pigmentación correspondiente a la especie.

Se pueden producir efectos no deseados, así concentraciones de 10 g/l de sacarosa provocaron un bajo contenido de clorofila en la planta in vitro y fuerte tendencia a la vitrificación. (Wainwrighty, citado por

Troncoso, et.al, s/f)

De esta manera se puede comparar que el uso de melaza a la concentración de 10 gr/l tuvo influencia en la escasez de coloración de la especie, ya que no pudo ser influenciada por el ambiente porque todos los tratamientos contaban con condiciones homogéneas.

CONCLUSIONES

El establecimiento de vitroplantas de Papa Imilla Negra (*Solanum tuberosum* L. ssp. andigena) en el laboratorio de biotecnología vegetal, fue óptimo ya que no se presentó contaminación causada por hongos, levaduras y otros, en esta fase no se utilizó reguladores de crecimiento.

Bajo los diferentes tratamientos previos al uso de fuentes de carbono se logró establecer concentraciones de las diferentes fuentes a usar en la tesis como ser:

El uso de melaza con 10 gr/lit es el que desarrolla un mayor crecimiento, por lo tanto, es el más recomendable para el uso en crecimiento rápido.

El uso de glucosa con 20 gr/lit es el que desarrolla un mayor crecimiento, por lo tanto, es el más recomendable para el uso en crecimiento rápido.

El uso de miel de abeja con 40 gr/lit es el que desarrolla un mayor crecimiento, por lo tanto, es el más recomendable para el uso en crecimiento rápido.

Además, que para realizar cultivos de conservación es mejor el uso de glucosa ya que el desarrollo de las vitroplantas es mejor que con la sacarosa desarrollando de esta manera plantas de tallos gruesos con buenos nudos y hojas.

Como se puede observar en el análisis estadístico si existe interacción entre carbón activo y fuentes de carbono, desarrollándose

mejores vitroplantas con azúcar comercial 30 gr/lit y 1 gr/lit de C.A.

Por lo tanto, el mejor medio para la multiplicación de vitroplantas comparando los resultados del experimento es cuando se utiliza azúcar comercial 30 gr/lit y 1 gr/lit de C.A. con un crecimiento óptimo para el proceso de aclimatación de 10 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abedini, et al. (2015). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Universidad de la Plata, Edulp. Buenos Aires: Argentina. 233 p.

Abriata et al. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II (en línea). Argentina, ArgenBio. Recuperado el 23 de diciembre del 2018. Recuperado de: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_web.pdf

Alonso, M. (2002). Biotecnología aplicada a mejora de pelargonium. Memoria presentada para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de CC. Biológicas, Departamento de Genética. 142p.

Arroyo, F. (2017). Efecto antibacteriano de los azúcares no refinados sobre cepas de Streptococcus mutans: estudio in vitro. Proyecto de investigación presentado como requisito para obtener el título de odontólogo. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología, Quito Ecuador 89p.

Bustillos, L. (2018). Identificación de variedades (Solanum sp.) producidas en tres comunidades del municipio de Tiahuanaco. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 5(2), 177-124.

Canqui, F. y Morales, E., (2009). Conocimiento Local en el Cultivo de Papa. Fundación PROINPA. Cochabamba. Bolivia.

GPS Essentials. (2016). Programa para celulares android.

MJ Pan, J. VanStaden (1999). Effect of activated charcoal, autoclaving and cultura media on sucrose hydrolysis, Plant Growth Regulation, *Artículo de revista publicado en 1999 en la regulación del crecimiento vegetal, volumen 29, número 3 en las páginas 135 a 141*

Ochoa, R. (2009). Diseños Experimentales. 299 p. La Paz-Bolivia.

Pan, M. y Staden, J. (1998). The use of charcoal in vitro culture: a review. *Artículo Vol. 23, N°3*.

Peralta, P. (2007). Adaptación de vitroplantas de stevia (stevia rebaudiana) a cuatro sustratos abonados bajo ambiente protegido. (Tesis de grado). Licenciatura en Ingeniería Agronómica. U.M.S.A. La Paz, Bolivia. 112p.

Smith, R. (2013). Plant Tissue Culture. Texas: Elsevier. 188p, traducido por Jeannet Quisbert P 36-37.

PROINPA. (1994). Catálogo Boliviano de Cultivares de Papa Nativa. No. 2. Cochabamba, BO, Programa de investigación de la papa. 31p.

Priya, et al. (2015). Effects of Plant Growth Regulators and Activated Charcoal on Regeneration and Plantlet Development in NeerBrahmi (*Bacopamonnieri*). Efecto de los reguladores del crecimiento de las plantas y el carbón activado en la regeneración y el desarrollo de plántulas en NeerBrahmi (*Bacopamonnieri*). *Artículo científico, Vol 4. 2 Julio 2015, revista de investigación académica industrial (JAIR)*

- Quispe, E. (2009). Evaluación agronómica de tres genotipos de vitroplantas de papa nativa (*Solanum tuberosum* spp. *Andigenum* L.) para la producción de semilla pre-básica en invernadero. (Tesis de grado). Licenciatura en Ingeniería Agronómica .U.M.S.A. La Paz, Bolivia. 112 p.
- Quorin, M., et al. (2001). Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.66. Departamento de Botánica.
- Ramirez, J. (2011). Effect of different culture tube caps and concentrations of activated charcoal and sucrose on *Annona glabra* L. *Ciencia e Agrotecnologia*. Vol. 35, N°5
- Sudhir, K. (1978). Effect of sucrose, hormones, and metabolic inhibitors on the development of pollen embryoids in anther cultures of dihaploid *Solanum tuberosum*. Escuela de Ciencias de la Vida, universidad Jawaharlal Nehru, New Delhi -110067, India.
- Thomas, D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue *Culture .Biotechnology Advances*. New York, Vol (26), N°6. 14 p.
- Troncoso, A. et. al. (s.f.). Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid “in vitro”. IRNAS (CSIC) Apdo 1052, 41080 SEVILLA.
- Weatherhead, M. & heanshaw, G. (1978). Algunos efectos del carbón activado como aditivo para los medios de cultivo de tejidos vegetales. Departamento de biotecnología vegetal. Universidad de Birmingham, Inglaterra. Vol. (89), N°2.

ANEXOS

Tabla 1. Análisis de varianza para la altura de plantas de datos transformados donde se utilizó el método raíz $x+1$.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
FUENTE DE CARBONO	12,02	3	4,01	180,44	<0,0001 **
C.A.	0,21	2	0,11	4,8	0,0101 *
FUENTE DE CARBONO*C.A.	3,36	6	0,56	25,2	<0,0001 **
Error	2,4	108	0,02		
Total	17,99	119			
C.V. (%)	6,71				

Tabla 2. Test de Duncan para fuentes de carbono.

FUENTE DE CARBONO	Medias	n	E.E.			
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	6,41	30	0,12	A		
GLUCOSA (20gr/lt)	4,27	30	0,12		B	
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lt).	2,97	30	0,12			C
MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	2,68	30	0,12			C

Tabla 3. Test de Duncan para carbono activado.

C.A.	Medias	n	E.E.		
4gr/lt	4,3	40	0,1	A	
1gr/lt	4,08	40	0,1		AB
2gr/lt	3,87	40	0,1		B

Tabla 4. Efecto de interacción de carbono activado y fuentes de carbono en el crecimiento de las vitro plantas.

FUENTE DE CARBONO	C.A.	Media	n	E.E.									
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	1gr/lt	7,88	10	0,2	A								
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	4gr/lt	6,53	10	0,2		B							
GLUCOSA (20gr/lt)	2gr/lt	4,82	10	0,2			C						
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	2gr/lt	4,81	10	0,2			C						
GLUCOSA (20gr/lt)	1gr/lt	4,36	10	0,2			CD						
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lt).	4gr/lt	3,83	10	0,2				D E					
GLUCOSA (20gr/lt)	4gr/lt	3,63	10	0,2					DE F				
MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	4gr/lt	3,21	10	0,2						EF G			
MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	2gr/lt	3,01	10	0,2							F G		
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lt).	2gr/lt	2,85	10	0,2								G H	
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lt).	1gr/lt	2,24	10	0,2									HI
MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	1gr/lt	1,83	10	0,2									I

Tabla 5. Análisis de varianza para el número de hojas de datos transformados donde se utilizó el método raíz de x+1.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
FUENTE DE CARBONO	0,47	3	0,16	4,22	0,0073 *
C.A.	0,01	2	0,0037	0,1	0,9057ns
FUENTE DE CARBONO*C.A.	0,72	6	0,12	3,2	0,0063 *
Error	4,05	108	0,04		
Total	5,25	119			
C.V. (%)	6,91				

Tabla 7. Test de Duncan para carbono activado.

C.A.	Media	n	E.E.	
4gr/lit	6,98	40	0,2	A
2gr/lit	6,9	40	0,2	A
1gr/lit	6,85	40	0,2	A

Tabla 6. Test de Duncan para las fuentes de carbón.

FUENTE DE CARBONO	Medias	n	E.E.			
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lit)	7,3	30	0,19	A		
GLUCOSA (20gr/lit)	7,17	30	0,19		AB	
MIEL DE ABEJA (40gr/lit)	6,63	30	0,19		AB	
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lit).	6,53	30	0,19			B

Tabla 8. Efecto de interacción de carbono activado y fuentes de carbono en la producción de hojas.

FUENTE DE CARBONO	C.A.	Medias	n	E.E.					
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lit)	1gr/lit	7,9	10	0,3	A				
GLUCOSA (20gr/lit)	1gr/lit	7,5	10	0,3		AB			
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lit)	4gr/lit	7,3	10	0,3		AB			
GLUCOSA (20gr/lit)	2gr/lit	7,2	10	0,3		AB			
MIEL DE ABEJA (40gr/lit)	4gr/lit	7,1	10	0,3			ABC		
MIEL DE ABEJA (40gr/lit)	2gr/lit	7,1	10	0,3			ABC		
GLUCOSA (20gr/lit)	4gr/lit	6,8	10	0,3			ABC		
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lit).	4gr/lit	6,7	10	0,3			ABC		
AZUCAR COMERCIAL (30gr/lit)	2gr/lit	6,7	10	0,3			ABC		
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lit).	2gr/lit	6,6	10	0,3			ABC		
MIEL DE CAÑA MELAZA (10gr/lit).	1gr/lit	6,3	10	0,3				BC	
MIEL DE ABEJA (40gr/lit)	1gr/lit	5,7	10	0,3					C

Tabla 9. Presencia de pigmentación en la producción de hojas

TRATAMIENTO	FUENTE DE CARBONO	CARBONO ACTIVADO	PRESENCIA DE PIGMENTACIÓN
T1	AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	1gr/lt	SI
T2	AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	2gr/lt%	SI
T3	AZUCAR COMERCIAL (30gr/lt)	4gr/lt	SI
T4	MIEL DE CAÑA MELAZA(10gr/lt)	1gr/lt	NO
T5	MIEL DE CAÑA MELAZA(10gr/lt)	2gr/lt	NO
T6	MIEL DE CAÑA MELAZA(10gr/lt)	4gr/lt	NO
T7	MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	1gr/lt	SI
T8	MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	2gr/lt%	SI
T9	MIEL DE ABEJA (40gr/lt)	4gr/lt	SI
T10	GLUCOSA (20gr/lt)	1gr/lt	SI
T11	GLUCOSA (20gr/lt)	2gr/lt%	SI
T12	GLUCOSA (20gr/lt)	4gr/lt	SI