



Por un desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

Universidad Nacional Agraria
Facultad de Agronomía
Trabajo de Graduación

**Producción de microtubérculos de papa (*Solanum
tuberosum* L.), cultivar Servane en Biorreactores
Económicos de Inmersión Temporal**

AUTORES

Br. Carlos Rocha Tórrez
Br. Yaoscar Sánchez Machado

ASESORES

M Sc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
Ing. Roxana Cruz

Managua, Nicaragua
Enero 2016



Por un desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

Universidad Nacional Agraria Facultad de Agronomía

Trabajo de Graduación

Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Servane en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal

AUTORES

Br. Carlos Rocha Tórrez
Br. Yaoscar Sánchez Machado

ASESORES

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador
como requisito para optar al grado de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Enero 2016

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN		PÁGINA
	DEDICATORIA	i
	AGRADECIMIENTOS	iii
	ÍNDICE DE CUADROS	v
	ÍNDICE DE FIGURAS	vi
	ÍNDICE DE ANEXOS	vii
	RESUMEN	viii
	ABSTRACT	ix
I	INTRODUCCIÓN	1
II	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo general	3
2.2	Objetivos específicos	3
III	MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1	Ubicación del área de estudio	4
3.2	Esterilización de materiales y equipos	4
3.3	Establecimiento de ápices meristemáticos	4
	3.3.1 Selección del material vegetativo	4
	3.3.2 Preparación y desinfección del material vegetativo	4
	3.3.3 Siembra <i>in vitro</i> del material vegetativo	5
	3.3.4 Medios de cultivo	5
	3.3.5 Fase de multiplicación	5
3.4	Microtuberización	6
3.5	Diseño experimental y análisis estadístico	9
	3.5.1 Experimento fase de multiplicación	9
	3.5.1.1 Variables a evaluar	9
	3.5.2 Experimento fase de microtuberización	9
	3.5.2.1 Variables a evaluar	10
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1.	Longitud de planta	

4.2.	Número de entrenudos	11
4.3.	Número de hojas	12
4.4.	Número de brotes	12
4.5.	Inducción de la microtuberización	13
4.5.1.	Porcentaje de microtubérculos por planta.	14
4.5.2.	Diámetro de microtubérculos.	14
4.5.3.	Longitud	14
4.5.4.	Peso fresco de microtubérculos	15
V	CONCLUSIONES	19
VI	RECOMENDACIONES	20
VII	LITERATURA CITADA	21
VIII	ANEXOS	

DEDICATORIA

Le dedico la culminación de esta meta a Dios él es el mejor padre del mundo, guía nuestro camino y siempre nos brinda su misericordia a pesar de los errores que cometemos, a mi mama Lesbia Irene Torrez Vásquez y resto de familiares. Además de las personas con las que tengo lazos de sangre existen otras que también han estado conmigo en los buenos y malos momentos de mi vida entre ellas Mirna Indiana Ortiz Zelaya. Por último quiero agradecer a cada una de las personas que me han enseñado algo a través de un consejo o cualquier otra forma, agradable o no, ya que contribuyeron a que yo sea una persona mejor hoy.

Carlos Manuel Rocha Torrez

DEDICATORIA

Primeramente quiero dedicarle este trabajo de tesis a Dios por permitirme la vida, salud entendimiento, comprensión y permitirme llegar hasta el día de hoy. También quiero agradecer a mis padres Fara Machado y Oscar Sánchez, por estar conmigo en cada uno de los momentos difíciles de mi carrera por haberme dado su apoyo incondicional en cada día de mi vida.

Quiero agradecer a mis hermanas, Dalia, Fara, Carolina, María Guadalupe por haberme apoyado siempre y llenarme de fuerzas en los momentos duros, a mis tías Dalia y Mayra Sánchez y Violeta Machado, por haberme apoyado a lo largo de mi carrera, a mi sobrino que fue una gran inspiración.

En especial quiero dedicar esta tesis a mi abuelito (q.e.p.d.) José Salvador Sánchez Martínez ya que él fue mi inspiración para haber escogido la carrera de agronomía.

Me gustaría dedicar este trabajo también a mis mejores amigos que me apoyaron incondicionalmente a lo largo de esta dura lucha para culminar mi carrera, Sergio, Mirna, Johnston, Carelia.

Quiero dedicar este trabajo a mi compañero de tesis y mejor amigo Carlos Manuel Rocha Torrez por haber formado parte incondicional de mi vida y haberme apoyado a lo largo de toda mi carrera.

Yaoscar Natalie Sánchez Machado.

AGRADECIMIENTO

A los docentes que contribuyeron a mi formación profesional.

A los asesores de esta tesis MSc. Marbell Danilo Aguilar y Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona.

A la Universidad Nacional Agraria por haberme dado la oportunidad de cursar mi carrera en sus instalaciones.

A la Direccion de vida estudiantil por darme la oportunidad de gozar de beca externa.

Carlos Manuel Rocha Torrez

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido llegar hasta este momento de mi vida, amis padres Fara Machado y Oscar Sánchez y demás familiares por haberme dado su apoyo incondicional en todos los momentos que lo necesité.

A los asesores de esta tesis MSc. Marbell Danilo Aguilar y Ing. Roxana Yadira Cruz por su paciencia, comprensión y su apoyo incondicional en cada uno de los procesos de este trabajo de tesis.

A la Universidad Nacional Agraria por haberme dado la oportunidad de cursar mi carrera universitaria en sus instalaciones.

A la Direccion de vida estudiantil por darme la oportunidad de gozar de beca externa a lo largo de la carrera.

A mi compañero de tesis Carlos Manuel Rocha Torrez por su apoyo, comprensión y amistad incondicional durante los cinco años de mi carrera.

Al Br. Eduardo Enrique Maradiaga Sarantes por su apoyo y colaboración en procesamiento de datos.

Yaoscar Natalie Sánchez Machado.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación.	6
2. Variantes de medios de cultivo en fase de microtuberización.	8
3. Efecto del GA ₃ y el BAP en la longitud y el número de hojas del cultivar Servane en la fase de multiplicación.	11
4. Efecto del GA ₃ y el BAP en el número de entrenudos y número de brotes del cultivar Servane en la fase de multiplicación.	12
5. Efecto de la sacarosa en promedio, diámetro y la longitud de los microtubérculos.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Transferencia de microesquejes del cultivar Servané a unidad	6
2. A) Plantas en crecimiento en BEIT. B) Eliminación del medio de multiplicación	7
3. Plantas formadas del cultivar Servané cubiertas con lámina de aluminio para controlar la entrada de luz a los BEIT	8
4. Formación aérea de microtubérculos del cultivar Servane.	16
5. Porcentaje de microtubérculos del cultivar Servané de tres categorías de peso fresco producidos en cinco concentraciones de sacarosa (M ₁ , M ₂ , M ₃ M ₄ y M ₅).	17

INDICE DE ANEXOS

ANEXO	PÁGINA
1. Costos de Producción	24
2. Análisis Estadísticos	25

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria de marzo a septiembre de 2015. Se evaluaron las fases de multiplicación y formación de microtubérculos de papa cultivar Servane en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT). En cada fase de estudio se evaluaron 70 plantas inoculadas en cinco variantes de medios de cultivo. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial, y tres réplicas conformada por 3 BEIT, para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de medias de diferencia mínima significativa (LSD) ($\alpha = 0.05$). En el medio de cultivo con 0.10 mg l^{-1} de GA3 y 1.00 mg l^{-1} de BAP la longitud de planta, número de entrenudos, número de hojas y número de brotes axilares registraron diferencias estadísticas significativas. El medio con 80 g l^{-1} de sacarosa indujo el mayor promedio de microtubérculos por planta (1.30). En el medio con 90 g l^{-1} de sacarosa se obtuvo los mejores promedios diámetro y longitud de los microtubérculos con promedios respectivos de 0.57 y 0.83 cm. En los medios con concentraciones de sacarosa de 80, 90, 100 y 110 g l^{-1} se obtuvo un mayor el porcentaje de microtubérculos con peso fresco menores de 0.4 g con promedios respectivos de 68, 70, 70 y 68%. Mientras que el peso fresco de 0.4 a 0.6 g se presentó el mayor porcentaje (43%) cuando se adicionó 120 g l^{-1} de sacarosa. En todas las variantes de medios de cultivo la formación de microtubérculos con peso fresco mayores a los 0.6 g fue mínima.

Palabras Claves: *Solanum tuberosum* L., Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal, microtuberización.

ABSTRACT

The present research was performed at tissue culture laboratory of Universidad Nacional Agraria from March to September 2015. The phases of multiplication and microtuberization of potato cultivate Servane were evaluated in Economical Bioreactors of Temporary Immersion EBTI. In each phase were evaluated 70 plants inoculated in 5 variants of culture media. A complete randomized blocks design was used with an univariate arrangement and three replicas formed by three EBTI, to determine the statistical differences between the means of the treatments was performed the LSD test ($\alpha = 0.05$). In the medium of culture with 0.10 mg l^{-1} of GA_3 and 1.00 mg l^{-1} of BAP the length of plant, number of internodes, number of leaves and number of axillary outbreaks recorded significant statistical differences. The mean with 80 g l^{-1} of sucrose induced the highest average number of microtuber per plant (1.30). In the medium with 90 g l^{-1} of sucrose was obtained the best averages diameter and length of the microtubers (0.57 and 0.83mm) respectively. In the means with sucrose concentrations of 80, 90, 100 y 110 g l^{-1} was obtained a higher percentage of microtubers with fresh weight less than 0.4 g with averages of 68, 70, 70 y 68% respectively. Moreover the fresh weight from 0.4 to 0.6 g presented the highest percentage (43%) when was added 120 g l^{-1} of sucrose. In all the variants of culture medium the microtuber formation with fresh weight higher than 0.6 g was minimum.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., economical bioreactors of temporary immersion, microtuberization.

I. INTRODUCCIÓN

La FAO reporta que la papa es el cuarto cultivo sembrado en más de 100 países, siendo el alimento básico de los países desarrollados que consumen 75 kg per cápita anual, mientras que en Nicaragua el consumo per cápita anual es de 8 kg (INTA, 2013).

A nivel mundial se cultivan 13.85 millones de hectáreas donde se producen 290 millones de tm de papa. En Nicaragua se cultivan entre 800 a 1,200 ha que abastecen solamante entre el 35 y el 40 % de la demanda nacional. Los factores que limitan la producción de papa en Nicaragua son: la escasez de semilla, el alto costo y la baja calidad de los tubérculos semilla; por lo tanto el desarrollo de tecnologías que superen estas limitaciones son necesarias para lograr una expansión del cultivo y consumo de papa en el país (INTA, 2004).

En el mundo la mayoría de los sistemas de producción de papa son propagados vegetativamente a través de tubérculos-semilla. Como resultado, los cultivares son genéticamente estables, pero puede ocurrir una rápida acumulación de enfermedades crónicas transmitidas por el tejido, especialmente virus y bacterias, causando la degeneración de la calidad de la semilla de papa durante unos pocas generaciones clonales (Dhital y Lim, 2012).

En Nicaragua la falta de semilla básica de papa libre de patógenos y falta de uniformidad de la misma es el problema clave para los productores de nuestro país, lo que incide en los bajos rendimientos de la producción y consecuente a esto el alza permanente del precio de la papa. Es por eso necesario establecer un programa de producción de semilla de papa certificada, que contribuya en parte a solucionar el problema de escasez de semilla de buena calidad genética y sanitaria, en beneficio de pequeños, medianos y grandes productores y comercializadores, así como de la población nacional que consume este tubérculo (INTA, 2004).

El cultivo de tejidos vegetales es la única técnica que puede eliminar aproximadamente 100% de virus en los programas de producción de semillas y los microtubérculos son una de las estrategias en esta perspectiva (Nistor *et al.*, 2010).

Los microtubérculos son la primera generación de semillas de papa a partir de cultivo de tejidos: se utilizan para resolver los problemas del trasplantante de las plántulas *in vitro* condiciones *in vivo* (Nistor *et al.*, 2010). Estos generalmente se originan en estructuras aéreas de la planta aunque algunos pueden formarse en el medio de cultivo (Hussey y Stacey, 1984).

Jiménez *et al.*, (1999) destacan como la principal problemática asociada con la obtención de microtubérculos mediante cultivos a los que se adiciona agar, es la baja producción por planta de 1.0 a 1.5 y el pequeño tamaño de los mismos, que limita la plantación directa en condiciones de campo, problemas que disminuyen con el empleo de técnicas de cultivo más eficientes basadas en la semiautomatización del proceso, que a su vez permiten reducir los costos de producción.

Los BEIT presentan las siguientes ventajas: a) Ensamblaje sencillo y económico b) la reducción significativa de los costos de producción de las plantas *in vitro* c) son tan eficientes o mejor que los biorreactores que se ofertan en el mercado internacional d) la esterilización de recipientes de vidrio es efectiva para la eliminación de microorganismos contaminantes e) permite la entrada de mayor cantidad y calidad de luz. (Castro y Maradiaga, 2015).

El empleo de los medios de cultivo líquido en el cultivo *in vitro* es un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala (Debergh, 1988; Tisserat, 1991 y Aitken-Christie *et al.*, 1995, citados por Pérez *et al.*, 2001).

La calidad de las plantas de papa y los tubérculos *in vitro* producidos en sistemas semiautomatizados basados en la inmersión temporal de los explantes es superior a los obtenidos con el empleo de métodos convencionales (Jiménez *et al.*, 1999).

II. OBJETIVOS

General:

- Evaluar la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) del cultivar Servane en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal.

Específicos:

- Analizar la morfología de las plantas obtenidas a partir de micro esquejes por efecto de cinco variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación.
- Determinar la concentración de sacarosa que mejor favorece la inducción de microtubérculos en el sistema BEIT.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía en la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 ½ carretera Norte, Managua, en el período comprendido de Marzo a Septiembre de 2015.

3.2. Esterilización de materiales y equipos

En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO_3) al 1% con la sumersión de los recipientes de vidrio (BEIT) durante 24 horas. Los residuos de cloro en los recipientes se eliminaron con agua del grifo, posteriormente se dejaron escurrir durante 30 minutos. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C a una atmósfera de presión durante 20 minutos. Los platos petri, pinzas y escalpelos se esterilizaron en seco en el horno a temperaturas de 180 °C durante una hora. Previo a la siembra de los tejidos se desinfectó el área de trabajo de la cámara de flujo laminar con NaClO_3 al 1% y posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

3.3. Establecimiento de ápices meristemáticos

3.3.1. Selección del material vegetativo

Se utilizaron tubérculos de papa importados de Francia con categoría de semilla certificada que presentaban buen estado fitosanitario, como fuente inicial de material de propagación.

3.3.2. Preparación y desinfección del material vegetativo

Los tubérculos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNA, se lavaron con agua y detergente para eliminar los residuos polvo y con cuchillo desinfectado con NaClO_3 al 1%, se dividieron en cuatro secciones, cada una conteniendo al menos una yema axilar y se sumergieron durante 20 minutos en 2 g de benomil diluido en 1 l de agua.

La división de los tubérculos favorece la brotación de un mayor número de yemas por tubérculo. Cuatro trozos de tubérculos se sembraron en cajas rectangulares de plástico transparente (largo de 21 cm, ancho y alto de 8 cm) que contenía un sustrato de arena de construcción desinfectada con agua hirviendo. Una vez que la arena desinfectada se enfrió se

procedió a la siembra y a los 15 días se extrajeron los brotes de yemas con ayuda de hojas de escalpelo y se colocaron en beaker de 200 ml desinfectado.

3.3.3. Siembra *in vitro* del material vegetativo

Los brotes de yemas se desinfectaron durante 5 minutos con NaClO₃ al 1%, luego se eliminaron los residuos de cloro con tres pases sucesivos en agua estéril. Con las hojas estériles de escalpelo se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 0.2 mm y se sembraron individualmente en tubos de ensayos de 15 cm de longitud y 1 cm de diámetro a los que se les adicionó 10 ml de medio de cultivo MS con 0.2 mg l⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 0.1 mg l⁻¹ de ácido giberélico (GA₃).

Los ápices meristemáticos se trasladaron al cuarto de crecimiento en condiciones de 22 ± 3 °C y luz natural. A los 30 días del establecimiento, con las plantas formadas se inició la multiplicación por micro esquejes para reproducir el material necesario que permitió definir la mejor variante de medio de cultivo en la fase de multiplicación.

3.3.4 Medios de cultivo

En los experimentos realizados se utilizó como medio basal las sales de Murashige y Skoog (1962) al 100%. En la fase de multiplicación se agregaron ácido giberélico y 6-BAP incorporadas a las variantes de medios de cultivo solas o combinadas. En el experimento de microtuberización la sacarosa fue el único compuesto que se suministró en diferentes concentraciones. En todas las variantes de medios de cultivo de multiplicación como de microtuberización se adicionaron 100 mg l⁻¹ de carbón activado.

3.3.5 Fase de multiplicación

De plantas formadas se seccionaron micro esquejes de 1 cm de longitud y se inocularon 70 en cada uno de los BEIT de 3000 ml. Después de la siembra se trasladaron a condiciones ambientales de 20 a 24 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas en oscuridad con una intensidad de luz de 2000 lux. En la Figura 1 se observa la transferencia de los micro esquejes en el BEIT.



Figura 1. Transferencia de micro esquejes del cultivar Servané a los BEIT

Las variantes de medio de cultivo que se estudiaron en la fase de multiplicación se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación de micro esquejes.

Variantes del Medio	GA₃ (mg l⁻¹)	BAP (mg l⁻¹)
MS (1962)		
1	0.00	0.00
2	0.10	0.50
3	0.10	1.00
4	0.20	0.50
5	0.20	1.00

3.4. Microtuberización

Para garantizar la formación de plantas con buenas características morfológicas y un buen vigor que permita la obtención de microtubérculos de mayor peso fresco, mayor diámetro y

mayor longitud, se sembraron micro esquejes en la mejor variante del medio de cultivo que resultó del experimento de multiplicación en BEIT de 3000 ml adicionado 700 ml de cada variante de medio de cultivo en condiciones de crecimiento de 20 ± 3 °C, 16 horas luz y 8 de oscuridad con intensidad de luz de 2000 lux durante 30 días. En la Figura 2 A se aprecian las plantas que crecieron en el medio de multiplicación en los BEIT.



Figura 2. A) Plantas en crecimiento en BEIT. B) Eliminación del medio de multiplicación

A los 30 días se procedió a eliminar el medio de cultivo de multiplicación contenido en cada BEIT con el cuidado de no causar daños mecánicos en las plantas contenidas en ellos, como se aprecia en la Figura 2 B.

Con las plantas formadas en los BEIT se realizó el experimento de microtuberización. Se distribuyó la misma cantidad de medio de cultivo en BEIT del mismo volumen utilizado en la fase de multiplicación. Las variantes de medio de cultivo para la microtuberización se presentan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Variantes de medios de cultivo en fase de microtuberización de plántulas

Variantes del Medio MS (1962)	Sacarosa (g l⁻¹)
1	80
2	90
3	100
4	110
5	120

Después de cuatro semanas en que las plantas adquirieron un buen crecimiento y vigor se cubrieron los BEIT con lámina de aluminio para impedir la entrada de luz a las plantas y favorecer el proceso de microtuberización como lo reportan Jiménez (1998), Figura 3.



Figura 3. Plantas formadas del cultivar Servane cubiertas con lámina de aluminio para evitar la entrada de luz a los BEIT.

3.5. Experimento de fase de multiplicación

3.5.1. Diseño experimental y análisis estadístico

A cada BEIT se agregó 700 ml de medio de cultivo líquido. Se suministró un riego de inmersión al día durante tres minutos. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial, y tres réplicas conformada por 3 BEIT. En cada réplica se sembraron 70 plantas, se evaluaron únicamente 30 y por cada variante de medio de cultivo se sembraron 210 plantas.

Los datos de las variables longitud de planta, número de hojas, número de entrenudos y brotación de yemas axilares se les realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de medias de diferencia mínima significativa (LSD) con $\alpha = 0.05$). Los datos se procesaron y analizaron en paquetes estadísticos con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

3.5.1.1. Variables evaluadas

A las cuatro semanas de establecido el experimento se evaluaron las siguientes variables:

- a. Longitud de planta (cm), se midió a partir de la base al ápice.
- b. Número de hojas
- c. Número de entrenudos
- d. Brotación de yemas axilares
- e. Porcentaje de plantas con raíces

3.5.2. Experimento fase de microtuberización

Cada unidad experimental se constituyó por 70 plantas para cada variante de medio de cultivo y en cada frasco se sembraron cinco plantas. Se utilizó un diseño de BCA con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 3 BEIT. Los datos de las variables número de microtubérculos por planta, número de brotes por microtubérculo, diámetro y longitud del microtubérculo se les realizó un ANDEVA y la prueba LSD con $\alpha = 0.05$ para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos. Los datos fueron procesados y analizados

en SAS versión 15. El peso fresco de los microtubérculos se obtuvo de acuerdo a la distribución porcentual en tres categorías en cada variante de medio de cultivo.

3.5.2.1. Variables evaluadas

A las ocho semanas de establecido el experimento se realizaron las evaluaciones de las siguientes variables.

- a.** Promedio de microtubérculos por planta.
- b.** Número de microtubérculos por planta.
- c.** Diámetro y longitud en cm de microtubérculos.
- d.** Peso fresco en tres categorías (<0.4 g, 0.4-0.6 g y >0.6 g).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Longitud de planta

En las variantes de medios de cultivo que se les suministró 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 1 mg l⁻¹ de BAP; 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.50 mg l⁻¹ de BAP y 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ con 0.1 mg l⁻¹ de BAP se registraron las mayores longitudes de planta con medias respectivas de 10.74, 10.82 y 10.0 cm. La menor respuesta estadística se obtuvo en el medio MS más 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ de BAP (8.78 cm) (Cuadro 3).

4.2. Número de entrenudos

En el medio MS mas 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ de BAP resultó un promedio (7.46) entrenudos, estadísticamente superior a los promedios obtenidos en las variantes con concentraciones de 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ combinadas con 0.50 y 1 mg l⁻¹ de BAP (6.67 y 6.33) entrenudos respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del GA₃ y el BAP en la longitud y el número de entrenudos del cultivar Servane en la fase de multiplicación.

Variantes de Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Longitud de planta	Número de entrenudos por planta
	GA ₃	BAP		
	(mg l ⁻¹)			
1	0.00	0.00	9.12 bc	6.74 ab
2	0.10	0.50	8.78 c	7.46 a
3	0.10	1.00	10.74 a	6.78 ab
4	0.20	0.50	10.82 a	6.67 b
5	0.20	1.00	10.00 ab	6.33 b

Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<= 0.05.

4.3. Número de hojas

La variante de medio de cultivo que se le agregó 0.10 mg l⁻¹ de GA₃ y 0.50 mg l⁻¹ de BAP con un promedio de 8.52 hojas superó significativamente al promedio alcanzado en la variante con 0.20 mg l⁻¹ de GA₃ y 1 mg l⁻¹ de BAP con promedio de 7.41 hojas (Cuadro 4).

4.4. Número de brotes

En las variantes de medios de cultivo que se agregaron GA₃ y BAP los promedios de brotes axilares entre 3.18 y 3.73 superaron significativamente al promedio de 1.95 brotes logrado en la variante de medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del GA₃ y el BAP en el número de hojas y número de brotes del cultivar Servane en la fase de multiplicación.

Variantes de Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Número de hojas por planta	Número de brotes axilares por planta
	GA ₃	BAP		
1	0.00	0.00	7.90 ab	1.95 b
2	0.10	0.50	8.52 a	3.73 a
3	0.10	1.00	7.96 ab	3.18 a
4	0.20	0.50	7.82 ab	3.68 a
5	0.20	1.00	7.41 b	3.53 a

Medias aritméticas seguidas de letras desiguales dentro de cada

Srivastava *et al.*, (2012) en seis cultivares de papa emplearon el medio de cultivo basal MS con adiciones de 2 mg l⁻¹ de D-pantotenato de calcio, 0.1 mg l⁻¹ de GA₃, 0,01 mg l⁻¹ de ácido naftalenacético y 30 g l⁻¹ sacarosa, solidificado con 7 g l⁻¹ de agar, a las seis semanas obtubieron promedios en longitud de tallo y número de nudos en los cultivares Kufri Giriraj, Kufri Girdhari, Kufri Himalini y Kufri Himsona dentro del rango de los promedios de longitud y de número de nudos obtenidos a las cuatro semanas en cultivar Servane en las cinco variantes de medios de cultivo estudiadas.

Los resultados registrados en este estudio superaron a los reportados por Jiménez *et al.*, (1999) en los cultivares Desiree y Atlantic en longitud de la planta y número de entrenudos establecidos en medio MS mas con 20 g l⁻¹ de sacarosa y solidificado con 7 g l⁻¹ de agar durante tres semanas con promedios respectivos en longitud de planta de 6.5 y 6.6 cm y en número de entrenudos (4.5) en ambos cultivares. El cultivar Servane a las cuatro semanas los promedios fueron superiores en longitud de plantas en el rango de 8.78 a 10. 82 cm y en número de entrenudos entre 6.33 y 7.46.

Cuando se compararon los resultados que reportan Jiménez *et al.*, (1999) en los cultivares Desiree y Atlantic en el Sistema Inmersión Temporal (TIS) de 4000 ml, los promedios de las variables longitud y número de entrenudos fueron superiores a los obtenidos en el cultivar Servane en BEIT.

Los mejores resultados reportados por Jiménez *et al.*, (1999) se explican por el uso de un sistema de control automático programado de suministro de aireación forzada, así como de las frecuencias y del tiempo de inmersión (ocho inmersiones por día cada una de cinco minutos). Todo conlleva al incremento de la concentración del oxígeno dentro de los TIS y está más fácilmente disponible para los tejidos dentro de los medios de cultivo.

Otro factor que puede incidir favorablemente en el crecimiento de las plantas es la densidad de siembra de los tejidos en los TIS que solamente inocularon 50 segmentos nodales en cada uno de ellos, comparados con los 70 que se inocularon en el estudio con el cultivar Servane. Otros autores reportan que a mayor densidad de siembra de tejidos, mayor es la competencia por luz, nutrientes, oxígeno y CO₂.

4.5. Inducción de la microtuberización

La inducción y desarrollo de los microtubérculos pueden ser influenciados por varios factores como la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, las condiciones de cultivo, la temperatura, el fotoperíodo y la intensidad de la luz, la formulación y los componentes de los medios de cultivo y el genotípico (Garner y Blake 1989; Hussey y Stacey 1984).

En la microtuberización de papa, uno de los factores más importantes en el crecimiento del tubérculo es la fuente de carbono, el tipo y la concentración que se suministre al medio de

cultivo. La sacarosa se considera la fuente de carbono óptima en comparación con sus constituyentes hexosas-glucosa y fructosa. El óptimo reportado de concentración de sacarosa varía de 60 a 80 g l⁻¹ (Dodds *et al.*, 1992).

La sacarosa puede jugar un doble papel en el desarrollo de microtubérculos. Aparte de ser una fuente de carbono adecuada fácilmente asimilada por las plantas *in vitro* y convertida en almidón en el desarrollo de los microtubérculos a una concentración de sacarosa de 80 gl⁻¹, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo de microtubérculos (Khuri y Moorby, 1995).

4.5.1. Porcentajes de microtubérculos producidos por planta

En el medio que se adicionaron 80 g l⁻¹ de sacarosa se obtuvo el mayor promedio de microtubérculos por planta (1.30). Con 110 y 120 g l⁻¹ de sacarosa la producción de microtubérculos por planta fue intermedia con promedios de 1.21 y 1.19 respectivamente, mientras que en concentraciones de sacarosa de 90 y 100 g l⁻¹ el promedio de microtubérculos fue menor con valores respectivos de 1.11 y 1.14 (Cuadro 5).

4.5.2. Diámetro de microtubérculo

Los medios que contenían 90 y 120 g l⁻¹ de sacarosa fueron estadísticamente superior a las medias registradas en los medios MS más 80 y 110 g l⁻¹ de sacarosa, pero resultaron similares estadísticamente a la media del diámetro de microtubérculo del medio MS mas 100 g l⁻¹ (Cuadro 5).

4.5.3. Longitud de microtubérculos

Los medios de cultivo que se adicionaron 90 y 110 g l⁻¹ de sacarosa registraron promedios de longitud de microtubérculos de 0.83 y 0.85 cm, superiores estadísticamente al resto. Entre las medias de longitud que se presentaron en los medios MS mas 80, 100 y 120 g l⁻¹ de sacarosa con valores respectivos de 1.3, 1.4 y 1.19 cm por microtubérculo. (Cuadro 5)

Cuadro 5. Efecto de la sacarosa en promedio, diámetro y la longitud de los microtubérculos.

Variantes del medio	Fuente de carbono	Promedio de microtubérculos por planta	Diámetro (cm)	Longitud (cm)
MS (1962)	Sacarosa (g l⁻¹)			
1	80	1.30	0.50 c	0.73 b
2	90	1.11	0.57 a	0.83 a
3	100	1.14	0.55 ab	0.73 b
4	110	1.21	0.53 bc	0.85 a
5	120	1.19	0.59 a	0.75 b

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$

4.5.4. Peso fresco de microtubérculos

La falta de luz a la que fueron sometidas las plantas del estudio de microtuberización provocó su senescencia. Al parecer la reserva de agua, nutrientes y otros compuestos orgánicos son empleados en una rápida formación de los microtubérculos. Esta respuesta de las plantas en el proceso de formación y crecimiento de los microtubérculos coincide con lo observado por Gopal *et al.*, (1998) que reportan una tasa más rápida de microtuberización acompañada de una senescencia temprana de las plántulas por efecto de la oscuridad.

Los microtubérculos producidos en los BEIT en oscuridad crecieron en la parte aérea de las plantas sobre el medio de cultivo. En condiciones de fotoperíodos 16 h luz y 8 de oscuridad, la formación de microtubérculos ocurre dentro de los medios de cultivo mostrando lenticelas muy prominentes en comparación con los formados por encima del medio. Resultó similar a los resultados obtenidos por Ranalli (1997) en los cultivares de papa Red Pontiac y Shepody,

Las lenticelas prominentes pueden, sin embargo, provocar que los microtubérculos sean más susceptibles a la desecación inmediatamente después de la cosecha que tiene un efecto directo

sobre el peso fresco del microtubérculo. En la Figura 4 se presenta la formación aérea de los microtubérculos del cultivar Servane en los BEIT.



Figura 4. Formación aérea de microtubérculos del cultivar Servane.

En concentraciones de sacarosa de 80, 90, 100 y 110 g l⁻¹ se presentaron los mayores porcentajes de microtubérculos con peso fresco menores de 0.4 g (categoría a) con valores respectivos de 68, 70, 70 y 68%. En el medio MS más 120 g l⁻¹ de sacarosa el porcentaje de peso fresco fue del 47%. En la segunda categoría (0.4 a 0.6 g), el medio MS mas 120 g l⁻¹ de sacarosa registró porcentaje fue superior al obtenido en las otras variantes de medio de cultivo. Solamente el medio de cultivo MS mas 90 g l⁻¹ alcanzó el 1% de microtubérculos con peso mayor al 0.6 g (categoría c) y en las demás variantes los porcentajes oscilaron entre el 8 y el 14 (Figura 5).

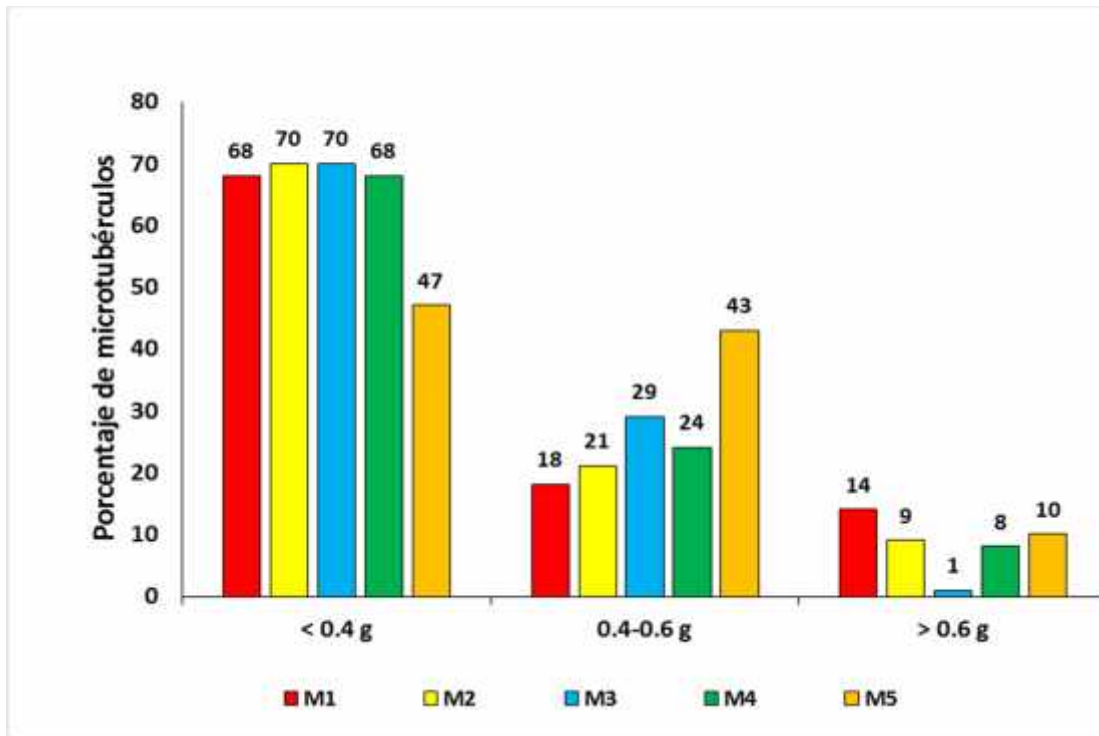


Figura 5. Porcentaje de microtubérculos del cultivar Servane de tres categorías de peso fresco producidos en cinco medios con diferentes concentraciones de sacarosa (Medio₁, Medio₂, Medio₃, Medio₄ y Medio₅).

Dhital y Lim (2008) en el cultivar Diamant, reportan que en medios de cultivo gelificados con agar y adiciones de 0, 5 y 7 mg/l de BAP no se formaron microtubérculos con peso mayores de 300 mg, pero se presentaron los mayores porcentajes de microtubérculos con peso menores de 300 mg con 100, 91.3 y 48.4% respectivamente. Con 10 mg l⁻¹ de BAP el 28% de microtubérculos resultaron ser de la categoría de mayores de 300 mg.

Dado que el crecimiento de microtubérculos es fuertemente afectada por tipo de azúcar y la concentración, la comprensión de cómo estos dos factores se cambian con el tiempo es importante para el funcionamiento óptimo de los sistemas de producción de microtubérculos. Aunque la sacarosa es susceptible a la parcial o total hidrólisis en biorreactores microtubérculos de patata (Dodds, 1992; Akita y Takayama, 1994).

La sacarosa adicionada al medio de cultivo, puede actuar como fuente de carbohidratos, como sustancia osmótica o como ambas. Además de ser una fuente de carbono adecuada y

fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo del microtubérculo, la sacarosa a una concentración de 80 g l^{-1} , también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo (Khuri y Moorby, 1995).

En el presente estudio no se obtuvieron los resultados reportados por Jiménez *et al.*, (1999) quienes empleando el sistema de inmersión de dos biorreactores de 10 litros de policarbonato, en el cultivar Atlantic lograron un peso medio fresco de 1.3 g, un diámetro de 1.1 cm y una longitud de 1.2 cm. Estas diferencias se deben posiblemente a la respuesta del genotipo, al tiempo y frecuencia de inmersión.

Los resultados en la microtuberización del cultivar Servane en el sistema BEIT, superaron a las medias de diámetro de $3.60 \pm 0.04 \text{ mm}$ y peso fresco de $0.08 \pm 0.002 \text{ gramos}$ reportados por Fufa y Diro, (2013), logrados en el cultivar Ararsa que después de seis semanas en el medio de cultivo gelificado con 8 gramos por litro^{-1} de agar y con 60 gramos l^{-1} de sacarosa y condiciones de 16 horas de fotoperíodo a 24°C . Pero en número de microtubérculos por planta de 1.97 ± 0.02 obtuvieron una mejor respuesta que superó al promedio máximo de 1.30 logrado en el medio de cultivo que contenía 80 g l^{-1} de sacarosa.

V. CONCLUSIONES

El medio de cultivo MS mas 0.10 mg l^{-1} de GA_3 y 0.10 mg l^{-1} de BAP registró en longitud de planta, número de entrenudos, número de hojas y número de brotes axilares estadísticamente superior a los otros tratamientos.

El medio MS mas 80 g l^{-1} de sacarosa indujo el mayor número de microtubérculos por planta (1.30).

El medio MS mas 90 g l^{-1} de sacarosa registró diámetro (0.57 cm) y longitud de microtubérculos (0.83 cm) estadísticamente superior al resto de los tratamientos.

Las concentraciones de sacarosa 80, 90, 100 y 110 g l^{-1} favorecieron la formación de microtubérculos con peso fresco menores de 0.4 g con valores respectivos de 68, 70, 70 y 68%. Mientras que peso fresco entre 4 a 6 g con la adición de 120 g l^{-1} de sacarosa se presentó el mayor porcentaje (43%). En todas las variantes de medios de cultivo el porcentaje de microtubérculos con peso fresco mayor a los 6 g fue mínimo.

VI. RECOMENDACIONES

Considerar en futuros estudios los factores que inciden en la microtuberización del cultivar Servane en el sistema BEIT para el peso fresco, el diámetro y la longitud de los mismos.

Estudiar el comportamiento de los microtubérculos en la producción de minitubérculos en invernadero y en siembra directa en condiciones de campo.

VII. LITERATURA CITADA

- A. Nistor. G. Campeanu. N. Atanasiu. N. Chiru. D. Karácsonyi. 2010. Influence of potato genotypes on “in vitro” production of microtubers. Consultado el 13 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://www.rombio.eu/rbl3vol15/17%20TICAN.pdf>.
- Bryan, J. E.; Jackson, M. T y Meléndez, N. 1983. Rapid Multiplication Techniques for Potatoes. CIP, Lima, Perú.
- Castro, J, Agramonte, D.; Alvarado Y; de Feria, M.; Pugh, T. 2012. Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. Biotecnología Vegetal. 1: 3 – 24.
- Castro, J.; Agramonte, D.; de Feria, M.; Jaime, J.; Pérez, M.; San Román, M. 2011. Obtención de microtubérculos papa cv. Andinita en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal. 1: 59 – 62.
- Castro, S. E. y Maradiaga, E. E. 2015. Micropropagación tradicional y del empleo de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal en el cultivar de plátano (*Musa spp.*) CEMSA ¾. (Tesis) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.2- 10 p.
- Dhital, S. P y Lim, H.T. 2012. Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) as influenced by supplementary nutrients, plant growth regulators, and *in vitro* culture conditions. Potato Research: 55:97–108.
- Dodds, J. H.; Silva, R. D.; Tovar P. 1992. Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry: High- Tech and micropropagation III, (Ed. Bagaj, Y.S.P), Springer, NewYork 19, 91-106.
- Dodds, J. H. 1988. Tissue culture technology: practical application of sophisticated methods. Am. Potato J. 65: 167-180.
- Fufa, M y Diro M. 2013. The Effects of Sucrose on *in vitro* Tuberization of Potato Cultivars. Adv Crop Sci Tech 1: 114
- HUSSEY, G. y STACEY, N.J. 1984. Factors Affecting the Formation of In vitro Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Annals of Botany 53. pp. 565-578.
- INTA (Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria). 2004. Guía del MIP en el cultivo de la papa. Consultado el 28 de octubre de 2014. Disponible en:

<http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/GUIA%20MIP%20papa%202014.pdf>

INTA (Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria) 2013. Manejo Integrado de Plagas. Consultado el 13 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENH10M722.pdf>.

J. Gopal · J. L. Minocha · H. S. Dhaliwal. 1998. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) Consultado el 13 de diciembre de 2014. Disponible en: http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/Gopal%20et%20al%201998%20microtubers.pdf

Jiménez E. 1999. “Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en sistema de inmersión temporal”. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

Jiménez, E.; Pérez N.; de Feria M.; Barbón R.; Capote A.; Chávez M.; Quiala, E y Pérez JC. 1999. Improved production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 19-23

M, Fufa y M, Diro. 2013. The Effects of Sucrose on *in vitro* Tuberization of Potato Cultivars. In *Adv Crop Sci Tech* 2013, 1:4.

Muñoz, G. 1996. Propagación *in vitro* y microtuberización de cultivares de *Solanum tuberosum* L. spp. *tuberosum* Hawkes en medios líquidos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia: Citando a SANDOVAL y ROJAS, 1986. Recuperado el 7 de diciembre de 2014.

Perea, D. M. 2000. Utilización de los sistemas *in vitro* para la obtención de plantas de ñame. Unibiblios-Universidad-Nacional, Bogotá, Colombia.

Pérez Ponce, J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ed. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba.

Pérez-Estrada, N; De Feria, M.; Jiménez, E; Capote, A., Chávez, M., Quiala, E. 2001. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo. *Biotecnología Vegetal* 1 (1): 11-17.

Pérez, N. M., Restrepo, D. C., García, J. D. y Giraldo, D. R. (2008). Tuberización *in vitro* de papa. Maracaibo: CIENCIA.

- Ranalli, P. 1997. Innovative propagation methods multiplication programmes. In: Potato Research 40 (1997) 439 – 453.
- S. Takayama y M. Akita. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. Consultado 14 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2F00033922#page-2>
- S. Khuri y J. Moorby. 1994. Investigations into role of sucrose in potato cv, estima microtuber production in vitro. Consultado 14 de diciembre de 2014. Disponible en: http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/Khuri%20Moorby%201995%20tuberisation.pdf.
- S. Dhital y H. T. Lim. 2008. Virus elimination and seed production of potato (*Solanum tuberosum* L.). 14 de diciembre de 2014. Disponible en: http://www.ebay.com/itm/Virus-Elimination-Seed-Production-Potato-Dhital-Tae-Lim-Biology-9783844315172-/151711160807/?_ul=BO
- Srivastava, A. K.; Diengdoh, L. C.; Rai, R.; Bag T. K. P. Singh B. 2012. *In vitro* Micropropagation and Microtuberization Potential of Selected Potato Varieties. Indian Journal of Hill Farming 25(2):14-17.
- UNC. 2013. Influencia del tipo de regulador de crecimiento (ANA y BAP), en la micropropagación de segmentos nodales de papa (*Solanum Tuberosum* L.) var. Diacol Capira. Consultado el 13 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://www.slideshare.net/taticardona/anteproyecto-fc>

VIII. ANEXOS

Costos de Producción

Insumo	Unidad de medida	Cantidad
Requerimiento x Ha (Pre-básica)	Minitubérculos	41,666.67
Precio del Tubérculo	\$	0.10
Costo de semilla	\$	4,234.29
Otros costos de producción	\$	1,866.72
Rendimiento x Ha (Básica)	Tubérculos	6.00
Producción x Ha	Tubérculos	250,000.00
Cant. Semilla x QQ (Registrada)	Tubérculos	750.00
Producción de semilla x Ha (Certificada)	QQ	333.33
Precio Vta del QQ	\$	50.00
Ingresos del productor	\$	16,666.67
Total costos	\$	6,101.01
Ingresos Netos	\$	10,565.66

Análisis estadísticos

The SAS System

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
BEIT1	3	BEIT1 BEIT2 BEIT3
Medio	5	1 2 3 4 5

Dependent Variable: L planta

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	41.01229167	6.83538194	6.55	<.0001
Error	38	39.62681944	1.04281104		
Corrected Total	44	80.63911111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	L planta Mean
0.508591	10.31959	1.021181	9.895556

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BEIT1	2	10.29540278	5.14770139	4.94	0.0124
Medio	4	30.71688889	7.67922222	7.36	0.0002

The SAS System

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: N hojas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	9.64260317	1.60710053	2.32	0.0526
Error	38	26.34050794	0.69317126		
Corrected Total	44	35.98311111			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	N hojas Mean
0.267976	10.50634	0.832569	7.924444

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BEIT1	2	3.93949206	1.96974603	2.84	0.0708
Medio	4	5.70311111	1.42577778	2.06	0.1058

Dependent Variable: brotes NX

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	19.75809524	3.29301587	5.48	0.0004
Error	38	22.85390476	0.60141855		
Corrected Total	44	42.61200000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	brotesNX Mean
0.463674	24.08422	0.775512	3.220000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BEIT1	2	0.12609524	0.06304762	0.10	0.9007
Medio	4	19.63200000	4.90800000	8.16	<.0001

The SAS System

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for N hojas

NOTE: This test controls the Type I comparison wise error rate, not the Experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	38
Error Mean Square	0.693171
Critical Value of t	2.02439
Least Significant Difference	0.7945

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Medio
A	8.5222	9	2
A			
B A	7.9667	9	3
B A			
B A	7.9000	9	1
B A			
B A	7.8222	9	4
B			
B	7.4111	9	5

The SAS System

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for brotes NX

NOTE: This test controls the Type I comparison wise error rate, not the Experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	38
Error Mean Square	0.601419
Critical Value of t	2.02439
Least Significant Difference	0.7401

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Medio
A	3.7333	9	2
A			
A	3.6889	9	4
A			
A	3.5333	9	5
A			
A	3.1889	9	3
B	1.9556	9	1

The SAS System

The ANOVA Procedure

t Tests (LSD) for N entrenudos

NOTE: This test controls the Type I comparison wise error rate, not the Experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	38
Error Mean Square	0.619443
Critical Value of t	2.02439
Least Significant Difference	0.7511

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	Medio
A	7.4667	9	2
A			
B A	6.7889	9	3
B A			
B A	6.7444	9	1
B			
B	6.6778	9	4
B			
B	6.3333	9	5