

## Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



### DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE INTRODUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN RÁPIDA DE *tropaeolum tuberosum* (MASHUA NEGRA), EMPLEANDO LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Tesis presentada por el Bachiller:

**Márquez Chávez, Luis Ángel**

Para optar el Título Profesional de  
**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesor:

M.Sc. Bardales Álvarez, Roxana Margarita

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2016000048918  
N° Trámite en Fac. 317-2016  
Fecha Recep. Fac. 13-12-2016

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

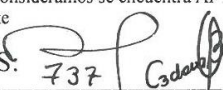
DE: **MARQUEZ CHAVEZ, Luis Angel**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE INTRODUCCION Y MULTIPLICACION RAPIDA DE MASHUA NEGRA (*Tropaeolum tuberosum*), EMPLEANDO LA PROPAGACION IN VITRO”**

DICTAMINADORES: 1) *Blgo. Carlos Paz Aliaga* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **“DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE INTRODUCCION Y MULTIPLICACION RAPIDA DE *Tropaeolum tuberosum* (*Mashua negra*), EMPLEANDO LA PROPAGACION in vitro”** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **22-12-16**

ASESOR: **Mgter. Roxana Bardales Álvarez**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad  
Atentamente

FIRMA



FECHA **07-03-18**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Blgo. Carlos Paz Aliaga*
- 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*
- 3) *Mgter. Natalia López Álvarez*

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA



(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **19-03-2018**

JURADOS: PRESIDENTE **CARLOS PAZ ALIAGA**  
VOCAL **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**  
SECRETARIO **MATER. NATALIA LOPEZ ALVAREZ**

FECHA

**23/03/18**

HORA

**19:00**

LOCAL

**SJM C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA

## ***DEDICATORIA***

*Dedicado a mis padres Gladys y Angel, a mis hermanos Liz y Orlando y a toda mi familia en especial a mis tíos Rossana y Zenón; así como mis primos Janet, Juan y Pepe, por ser mi inspiración y motivación, por su inmenso amor, esfuerzo, sacrificio, y consejos que me ayudan en la vida.*



## AGRADECIMIENTOS

*Primero deseo expresar mi agradecimiento a Dios por haberme dado fortaleza y voluntad para cumplir una de mis metas.*

*Segundo dar mi más sincero agradecimiento a la profesora Roxana Bardales por su confianza y todo el apoyo brindado durante la elaboración de la tesis.*

*Un especial agradecimiento a la profesora Lourdes Tapia directora del Instituto de Biotecnología por haberme ayudado y permitido desarrollar este importante proyecto, haciendo posible la ejecución.*

*Tercero nunca me cansare de agradecer a mis padres Gladys y Angel quienes me siguen brindando su apoyo incondicional, me motivan y creen en mí.*

*De la misma manera agradezco haber conocido y formar parte del Instituto de Biotecnología, gracias Sra. Milagritos, Sra. Olga, Andrea, Roxana, Sra. Gaby, Raquel por toda la ayuda y apoyo en el desarrollo de esta tesis desarrollada en la Universidad Nacional Agraria La Molina.*

*Gracias a mí enamorada Gretta Suárez por creer en mí y apoyarme incondicionalmente; gracias a mis amigas tesistas Fabiola Casanova, Deysi Huayllacallan, Mónica Ñahuinlla, por el apoyo y consejos.*

*Por último agradezco a mis amigos incondicionales Daniela Delgado y Christian Zevallos por sus palabras de aliento, amistad sincera durante todos estos años que pasamos juntos.*

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo y financiamiento del Instituto de Biotecnología, Área de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional Agraria La Molina.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
INTRODUCCIÓN .....	III
OBJETIVOS .....	V
HIPÓTESIS.....	VI
CAPÍTULO 1.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO <i>TROPAEOLUM</i> .....	1
1.1 TAXONOMÍA .....	1
2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ORIGEN .....	2
3. NOMBRES COMUNES .....	3
4. DESCRIPCIÓN BOTANICA .....	5
5. CONDICIONES DE CULTIVO .....	7
6. PROPAGACIÓN DE LA MASHUA.....	9
7. COMPOSICION QUIMICA Y USOS DE MASHUA .....	10
8. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO IN VITRO .....	13
8.1. DEFINICIÓN .....	13
8.2. MICROPROPAGACIÓN .....	14
8.3. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	14
8.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN..	16
8.5. MEDIOS DE CULTIVO.....	16
9. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO.....	19
9.1. ELEMENTOS MINERALES .....	19
9.2. COMPONENTES ORGÁNICOS .....	20
9.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO O FITOHORMONAS .....	21
9.4. AGENTE GELIFICANTE.....	23
10. CULTIVO DE SEGMENTOS NODALES.....	23
11. FACTORES QUE AFECTAN LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS .....	23
12. PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	27
CAPÍTULO 2.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31

1.	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	31
2.	MATERIALES .....	31
2.1.	MATERIAL VEGETAL .....	31
2.2.	MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	32
3.	MÉTODOS.....	34
3.1.	SELECCIÓN DE EXPLANTES .....	34
3.2.	DESINFESTACIÓN DE EXPLANTES .....	35
3.3.	ENSAYO ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> .....	38
3.4.	ENSAYO MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	41
3.5.	PARÁMETROS EVALUADOS .....	42
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	43
	CAPÍTULO 3.....	45
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
1.	TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN.....	45
1.1.	CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES.....	45
1.2.	SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES .....	48
2.	ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE MASHUA NEGRA .....	51
2.1.	LONGITUD DEL EXPLANTE .....	52
2.2.	NÚMERO DE HOJAS.....	56
2.3.	NÚMERO DE BROTES .....	58
2.4.	ELECCIÓN DEL MEDIO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE MASHUA NEGRA .....	60
3.	MULTIPLICACIÓN <i>IN VITRO</i> DE MASHUA NEGRA .....	61
3.1.	NÚMERO DE BROTES .....	62
3.2.	NÚMERO DE HOJAS.....	66
3.3.	LONGITUD DE EXPLANTES.....	69
3.4.	PRESENCIA DE CALLO .....	75
3.5.	PRESENCIA DE RAÍZ.....	79
	CONCLUSIONES .....	82
	RECOMENDACIONES .....	83
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
	ANEXOS.....	91

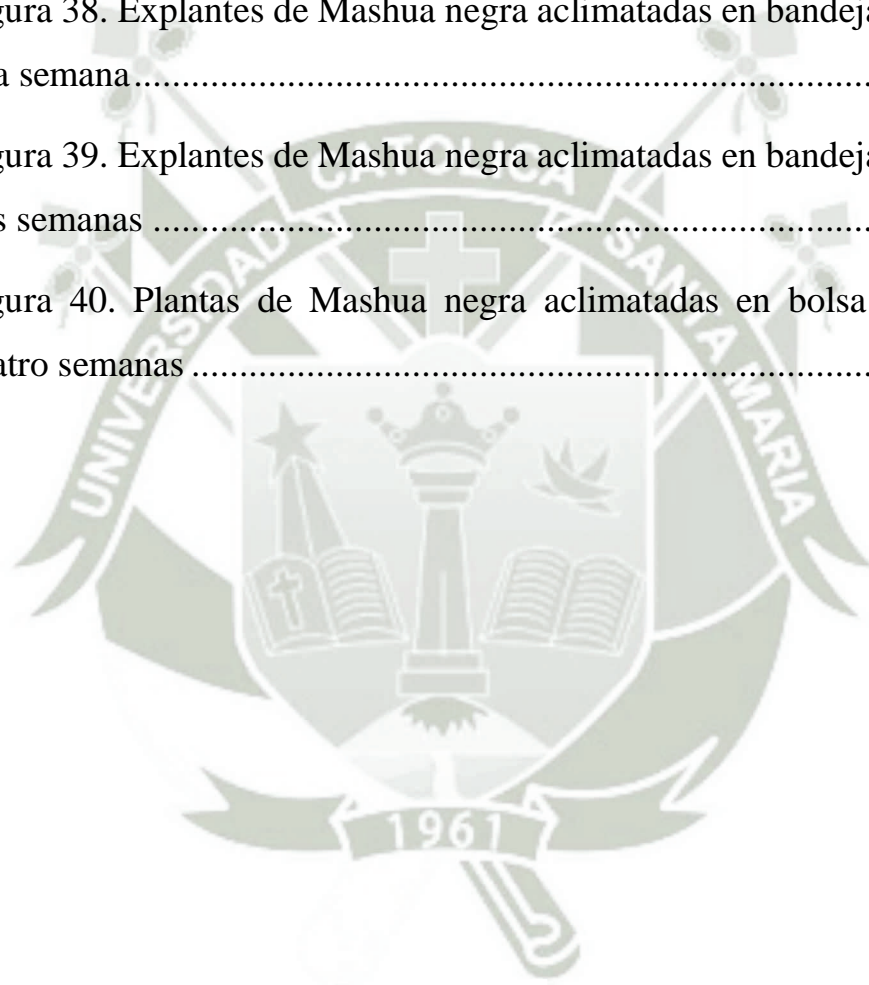
## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseños de la cerámica Nazca donde se representan los tubérculos andinos; papa, oca, ulluco y mashua (Yacovleff y Herrera, 1935).....	2
Figura 2. Planta de Mashua parte superior derecha; partes reproductivas; inferior (Ruiz y Pavón, 1802) .....	6
Figura 3. Desarrollo de Mashua 1, aparición: 2 formación del Estolón; 3, Tuberización; 4-5, floración; 6, fructificación; 7, tubérculo maduro (Lescano, 1994).....	9
Figura 4. <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua Negra) en invernadero del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina .....	32
Figura 5. Segmentos nodales empleados sin hojas caulinares de rama primaria de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua Negra) .....	35
Figura 6. Explantes de Mashua negra en frasco antes de ser desinfestados .....	37
Figura 7. Explantes de Mashua negra después del proceso de desinfestación en tubos de ensayo .....	38
Figura 8. Tasa de desinfestación de T1, T2 y T3 .....	46
Figura 9. Explantes de Mashua negra, A: explante contaminado con bacteria, B: explante vivo, C: explante muerto; a la 2 semana de ser introducidas.....	48
Figura 10. Porcentaje de Sobrevivencia de explantes de Mashua negra por tratamiento .....	50

Figura 11. Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes de Mashua negra por tratamiento M1, M2 y M3 .....	52
Figura 12. Diferencia de Longitud de tallo de plantas de Mashua negra en medio M1, M2 y M3 a las cuatro semanas .....	55
Figura 13. Gráfico de barras de promedio de hojas de explantes de Mashua negra por tratamiento M1, M2 y M3.....	57
Figura 14. Gráfico de barras de promedio de brotes de explantes de Mashua negra por tratamiento en el establecimiento .....	59
Figura 15. Explante de Mashua negra obtenida por el tratamiento M3 después de cuatro semanas en incubación.....	60
Figura 16. Gráfico de barras de promedio de brotes de explantes de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación .....	64
Figura 17. Explante de Mashua negra obtenida por el tratamiento MM2 después de cuatro semanas en incubación.....	65
Figura 18. Explantes de Mashua negra obtenidas por el tratamiento MM3 después de cuatro semanas en incubación.....	65
Figura 19. Gráfico de barras de promedio de hojas de explantes de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación <i>in vitro</i> .....	68
Figura 20. Explantes de Mashua negra obtenidas por el tratamiento MM2 después de cuatro semanas en incubación.....	69
Figura 21. Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes de Mashua negra por tratamiento (MM1, MM2, MM3 Y MM4) en la multiplicación <i>in vitro</i> .....	70
Figura 22. Planta de Mashua negra en medio MM1 a las cuatro semanas .....	73

Figura 23. Planta de Mashua negra en medio MM2 a las cuatro semanas .....	74
Figura 24. Planta de Mashua negra en medio MM3 a las cuatro semanas .....	74
Figura 25. Planta de Mashua negra en medio MM4 a las cuatro semanas .....	75
Figura 26. Porcentaje de presencia de callos en explantes de Mashua negra por tratamiento .....	77
Figura 27. Callo de Mashua negra en el tratamiento 4 a las cuatro semanas .....	78
Figura 28. Porcentaje de presencia de raíz en explantes de Mashua negra por tratamiento .....	80
Figura 29. Raíz de Mashua negra en el tratamiento MM3 a las cuatro semanas .....	81
Figura 30. Plantas madre de Mashua negra empleadas en la investigación .....	100
Figura 31. Segmentos Nodales de Mashua negra luego del protocolo de desinfestación con T1 .....	101
Figura 32. Gradilla con tubos de ensayo con explantes de Mashua negra en medios de establecimiento T1 y T2 a la segunda semana de evaluación .....	101
Figura 33. Explante de Mashua negra en cámara de flujo laminar obtenido con M3 lista para ser propagada .....	102
Figura 34. Explantes de Mashua negra en cámara de flujo laminar obtenidos en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> con MM2 .....	102

Figura 35. Explantes de Mashua negra con presencia de raíz obtenidos a las cuatro semanas en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> con MM3 ...	103
Figura 36. Explantes de Mashua negra con presencia de callo obtenidos a las cuatro semanas en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> con MM4 ...	103
Figura 37. Explantes de Mashua negra en frasco de multiplicación <i>in vitro</i> masiva obtenidos con MM3 .....	104
Figura 38. Explantes de Mashua negra aclimatadas en bandeja después de una semana.....	104
Figura 39. Explantes de Mashua negra aclimatadas en bandeja después de dos semanas .....	105
Figura 40. Plantas de Mashua negra aclimatadas en bolsa después de cuatro semanas .....	105



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombres comunes de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) .....	4
Tabla 2. Nombres de las diferentes variedades de Mashua .....	4
Tabla 3. Composición química y nutricional de la mashua (en 100g de porción comestible fresca).....	11
Tabla 4. Medio basal Murashige y Skoog (1962) .....	18
Tabla 5. Tratamientos de desinfestación.....	37
Tabla 6. Composición de los medios de cultivo para la fase de establecimiento de Mashua negra .....	40
Tabla 7. Codificación para los medios de cultivo para el establecimiento de Mashua negra.....	41
Tabla 8. Medios de cultivo para multiplicación de Mashua negra .....	41
Tabla 9. Valores de las variables cualitativas .....	43
Tabla 10. Porcentaje de contaminación y desinfestación de explantes de Mashua negra .....	45
Tabla 11. Porcentaje de Supervivencia de explantes de Mashua negra.....	49
Tabla 12. ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III) .....	53
Tabla 13. Prueba de Tukey para longitud de explantes de Mashua negra .....	53
Tabla 14. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas .....	56
Tabla 15. Resultados de promedio de hojas de Mashua negra por tratamiento.....	56
Tabla 16. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de brotes de Mashua negra .....	58
Tabla 17. Resultados de promedio de brotes de Mashua negra por tratamiento.....	59
Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes de Mashua negra en medios de multiplicación.....	63
Tabla 19. Promedio de brotes por explante de Mashua negra por tratamiento.....	63

Tabla 20. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas en la multiplicación de Mashua negra .....	67
Tabla 21. Resultados de promedio de hojas de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación <i>in vitro</i> .....	67
Tabla 22. ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III) .....	71
Tabla 23. Prueba de Tukey para longitud de explantes de Mashua negra .....	71
Tabla 24. Presencia de callos en los explantes de Mashua negra .....	76
Tabla 25. Presencia de raíz en los explantes de Mashua negra.....	79



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M1 .....	92
Anexo 2. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M2 .....	93
Anexo 3. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M3 .....	94
Anexo 4. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM1 .....	95
Anexo 5. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM2 .....	96
Anexo 6. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM3 .....	97
Anexo 7. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM4 .....	98
Anexo 8. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM2 y MM3 .....	99
Anexo 9. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM1 y MM4 .....	99
Anexo 10. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM1, MM2, MM3 y MM4.....	99
Anexo 11. Presencia de callos en los explantes de Mashua negra.....	99
Anexo 12. Presencia de raíz en los explantes de Mashua negra .....	100
Anexo 13. Figuras complementarias del proyecto de la Mashua negra ( <i>Tropaeolum tuberosum</i> ).....	100

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó *in vitro*, la capacidad de segmentos nodales de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra) a ser establecidas y multiplicadas *in vitro*, como una alternativa viable de ser implementada para la propagación rápida de esta especie. Este estudio fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se usó un diseño experimental completamente al azar (DCA), un análisis de varianza para comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) y Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05$ ) para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos. En los resultados; la desinfección obtuvo luego de realizar pruebas con tres tratamientos hasta un 92% sin contaminación y 67% de sobrevivencia de explantes de Mashua Negra, empleando alcohol de 70% por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos. En la establecimiento *in vitro* se probaron tres tratamientos con sales de MS modificadas, los explantes fueron colocados a 4000 luz, fotoperiodo 12h luz y  $22 \pm 4^\circ\text{C}$ . La mejor respuesta de los explantes fue encontrada, luego de cuatro semanas de cultivo, en el medio M3, 2mL/L de ppm, 30g/L de sacarosa y 7g/L de agar. Con estas sales se obtuvieron promedios de 5.3 brotes, 5.2 hojas por explante y 5.82 cm de tamaño. Para la multiplicación *in vitro* de Mashua Negra se probaron cuatro tratamientos. Los mejores resultados se obtuvieron a las cuatro semanas de cultivo con una clara diferencia en el número de brotes producido por medio MM2 y MM3, con 2mL/L de ppm, 30g/L de sacarosa y 7g/L de agar, en tubos de ensayo y bajo las mismas condiciones las plántulas de Mashua negra produjeron 7.7 y 7.8 brotes respectivamente. En conclusión, se estableció un protocolo de introducción y multiplicación *in vitro* de Mashua Negra debido a los resultados obtenidos sin afectar la viabilidad de la planta y con explantes vigorosos.

**Palabras clave:** Segmento nodal, desinfección, introducción *in vitro*, multiplicación *in vitro*, Mashua Negra.

## ABSTRACT

In this present *in vitro* study was evaluated the ability of nodal segments of *Tropaeolum tuberosum* (Mashua black) to be established and multiplied *in vitro* as a viable alternative be implemented for the rapid spread of this species. This study was conducted in the laboratory of crop of tissues of the Institute of biotechnology (IBT) of the Universidad Nacional Agraria La Molina. An experimental design was used completely at random (DCA), an analysis of variance for means comparison of Tukey ( $p \leq 0.05$ ) and Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05$ ) to establish the significant differences among the treatments. In the results; disinfection got to testing with three treatments up to 92% without pollution and 67% of explants of Mashua black survival, using 70% for 30 seconds alcohol and sodium hypochlorite at 1% for 5 minutes. Three treatments with modified MS salts were tested *in vitro* establishment, the explants were placed to 4000 light, 12 h light photoperiod and  $22 \pm 4^\circ$  C. The best response of the explants was found, after four weeks of culture, the medium M3, 2 mL/L ppm, 30 g/L sucrose and 7 g/L agar. Were obtained 5.3 averages with these salts shoots, 5.2 leaf explant and 5.82 cm in size. Four treatments were tested for *in vitro* multiplication of Mashua black. The best results were obtained at four weeks of cultivation with a clear difference in the number of shoots produced by average MM2 and MM3, with 2 mL/L ppm, 30 g/L sucrose and 7 g/L agar in test tubes and under the same conditions the seedlings of black Mashua produced 7.7 and 7.8 outbreaks respectively. In conclusion, was established a protocol introduction and multiplication *in vitro* of Mashua black due to the results obtained without affecting the viability of the plant and with vigorous explants.

**Key words:** Nodal segment, disinfection, introduction *in vitro*, multiplication *in vitro*, Mashua black.

## INTRODUCCIÓN

*Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra) es una planta herbácea que pertenece a la familia *Tropaeolaceae*. Ruiz y Pavón (1794) describen a *Tropaeolum tuberosum*, como una planta herbácea de características pequeña y homogénea, la cual produce un tubérculo comestible cultivado desde la época prehispánica en los Andes desde Pasto, Colombia hasta el noroeste de Argentina (Cárdenas, 1989).

Otros tubérculos y la Mashua se cultivan en toda la sierra del Perú y el Sur de los Andes a partir de los 3000 a 3900 m.s.n.m.; son de importancia en la alimentación de los pueblos rurales de la región Andina ya sea en el Perú, Colombia y Bolivia. Uno de los problemas de los últimos años es el peligro de perder la gran variabilidad genética de estos cultivos, debido a varias causas, tales como el remplazo por otros cultivos y falta de promoción, además del peligro de extinguir variedades nativas debido a condiciones climáticas y daños físicos como ataques de plagas o enfermedades (Hermann, 1992).

Existen por lo menos 30 genotipos de Mashua con una alta capacidad antioxidante, pero los valores más altos pertenecen a tres genotipos de coloración morada-negra o comúnmente llamada Mashua negra, poseen un alto contenido de antioxidantes, antocianinas y carotenoides, encontrados en los tres genotipos evaluados, además las antocianinas encontradas serían las principales responsables de la capacidad antioxidante de la Mashua negra (Huaccho, 2016).

Gracias a sus propiedades, la Mashua negra es tradicionalmente empleada por la medicina folklórica para tratar a personas con problemas renales y hepáticos, también se emplea bajo aplicación tópica en casos de eczemas y manchas. Los beneficios de los tubérculos de Mashua se deben a las propiedades relacionadas con la salud y podrían estar relacionadas con el contenido en glucosinolatos (Campos et al., 2006). La Mashua es consumida generalmente por los pobladores andinos, tiene propiedades benéficas sobre el hígado y los riñones (Oblitas, 1969) y también sobre la próstata y trastornos urinarios (Salcedo, 1986; Brack, 1999).

La Mashua se produce y propaga con fines de producción en la Agricultura Andina tradicional exclusivamente a través de los tubérculos, los cuales deben ser retirados de la cosecha para ese propósito. Como es el caso en otros tubérculos andinos (papas, oca, ulluco), las semillas de mashua no se utilizan para fines de propagación en las actuales prácticas agrícolas. Las razones son probablemente las mismas que los demás tubérculos: falla en el verdadero método de propagación sexual, además de la duración de cultivo de plantas propagadas mediante semillas y predominio de la agricultura vegetal en los sistemas tradicionales de los Andes (Camino, 1997).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es un grupo de técnicas; la propagación *in vitro* es la más importante; mediante la cual un explante, cualquier parte separada de una planta, células, tejidos, embriones, etc. con potencial de diferenciación puede ser cultivado bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y fitohormonas que se incuban en condiciones controladas. Esta técnica de cultivo aséptico se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad, que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se colocan en condiciones controladas y adecuadas (Luna, 2002).

El cultivo *in vitro* se utiliza cada vez más para la propagación de especies amenazadas en peligro de extinción, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo. Además, la propagación de plantas a través del cultivo de tejidos *in vitro* ha sido lograda con éxito en varias especies con el fin de multiplicar genotipos de interés (Pedroza, 2008).

En el presente trabajo se propone contribuir con el desarrollo de un protocolo para la introducción y multiplicación rápida Mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*), empleando la propagación *in vitro*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo para la introducción y multiplicación rápida de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra), empleado la propagación *in vitro*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el tratamiento adecuado para la desinfestación de los explantes de segmentos nodales de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra).
2. Evaluar la respuesta de los explantes en el establecimiento *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra), utilizando medio basal semi sólido Murashige y Skoog, Murashige y Skoog  $\frac{1}{2}$  y Murashige y Skoog modificado.
3. Comprobar la influencia de medio basal semi sólido de Murashige y Skoog modificado en la fase de multiplicación *in vitro* en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra) bajo el efecto de reguladores de crecimiento.

## HIPÓTESIS

Debido a que diversas investigaciones relacionados con la micropropagación *in vitro* de diferentes tubérculos que crecen en condiciones extremas como las condiciones climáticas, es posible desarrollar un protocolo adecuado de establecimiento y multiplicación en la propagación *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra).



## CAPÍTULO 1

### MARCO TEÓRICO

#### 1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO *Tropaeolum*

##### 1.1 TAXONOMÍA

Según la clasificación de Cronquist (1981):

- Reino : Plantae
- División : Magnoliophytes
- Clase : Magnoliopsida
- Subclase : Rosidae
- Orden : Geraniales
- Familia : *Tropaeolaceae*
- Género : *Tropaeolum*
- Especie : *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz y Pavón)

La familia *Tropaeolaceae* es herbácea y se caracterizan por ser pequeñas y bastante homogéneas. Esta familia incluye tres géneros, dos de ellos, *Trophaeastrum* Sparre y *Magallana* Cav. y el género *Tropaeolum*, que es el más grande, contiene 86 especies, distribuidas desde el sur de México hasta América del Sur. La capacidad formadora de tubérculos está presente en todos los géneros de la familia (Sparre y Andersson, 1991).

Ruiz y Pavón (1794) describen la planta de *Tropaeolum tuberosum* durante la expedición Botánica del Virreinato del Perú bajo Carlos III de España. Taxonómicamente pertenece al género *Tropaeolum* de la familia *Tropaeolaceae*.

## 2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ORIGEN

*Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra) es un tubérculo comestible cultivado desde la época prehispánica en los Andes desde Pasto, Colombia hasta el noroeste de Argentina (Cárdenas, 1989). Según Hawkes (1989) la domesticación de *Tropaeolum tuberosum* se produjo en la región que comprende Ecuador a Bolivia, ya que existe una gran diversidad en estas zonas.

La primera evidencia arqueológica de la Mashua encontrada en las excavaciones de Huachumachay localizado en Jauja, Perú nos indica que la domesticación de este tubérculo fue relativamente tarde data de 650 a 1350 D.C. (Pearsall, 1992).

Sin embargo, la ausencia de un estudio amplio sobre la diversidad de formas silvestres y cultivadas de Mashua, hacen difícil determinar el centro de origen probable. Asimismo, se sabe poco sobre la historia de cultivo Mashua y su dispersión. La Mashua es menos conocida que otros tubérculos andinos como la oca y ulluco. Según Johns (1982) la Mashua tiene un gran valor ya que en pasado sirvió de alimento y uso medicinal.

La cerámica Nazca lleva algunas pinturas que representan la Mashua que datan de 1000 A.C. (Yacovleff y Herrera, 1935).



**Figura 1. Diseños de la cerámica Nazca donde se representan los tubérculos andinos; papa, oca, ulluco y mashua (Yacovleff y Herrera, 1935)**

### 3. NOMBRES COMUNES

Mashua o Maswa, palabra quechua cuyo significado no es conocido, es usada en la región de Ayacucho; es el nombre más conocido para la planta de Mashua; tubérculo del Perú, Sur de Colombia y Ecuador. También es conocida con otros términos, como Maxua, Majua, Mazuco, Maswallo, Mashco, probablemente son variaciones debido a la influencia de la lengua española. Los quechuas se refieren también a la Mashua como "Añu", una palabra derivada del término aymara Isañu o Isaño; Añu es usada en la región del Cusco, mientras Isaño es común en alrededores del Lago Titicaca y Sur de Bolivia. En Colombia, Mashua es también conocida como "Cubio", un término cuyo origen es desconocido, pero podría ser derivado del lenguaje precolombino, el cual indica la antigüedad del cultivo de Mashua en este país. "Navo", "Navios" o "Nabos" también son términos de Mashua restringida a Colombia que parecen ser modificaciones de "Nabo". Una lista que incluye nombres comunes se presentan en la Tabla 1.

La presencia de al menos tres nombres completamente diferentes como Cubio, Mashua, Añu fueron establecidos ante el efecto de homogeneización de la conquista Inca por los españoles. Este fenómeno apoya la noción de que la Mashua fue domesticada independientemente en diferentes zonas de los Andes. También los tubérculos de Mashua muestran una amplia gama de colores que van desde blanco-amarillo hasta morado-negro y se califican en nombres de variedades que suelen referirse a ellos. Una lista de los nombres más frecuentes se presenta en la Tabla 2, donde las denominaciones hacen referencia a atributos tales como la forma, el color y el sabor (Hermann y Cruz, 1991).

**Tabla 1. Nombres comunes de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)**

Nombre	Idioma	País	Referencia
Añu	Quechua	Perú	(Cárdenas, 1989)
Apilla	Quechua	Bolivia	(Cárdenas, 1989)
Apiñamama	Quechua	Perú	(Herrera, 1941)
Cubios	Español	Colombia	(Pérez, 1947)
Isaño	Aymara	Bolivia	(Cárdenas, 1989)
Majua	Español	Ecuador	(Lescano, 1994) (Espinosa <i>et al.</i> , 1997)
Mashua	Quechua	Ecuador	(Tapia <i>et al.</i> , 1996) (Espinosa <i>et al.</i> , 1997)
Mashua		Perú	(Herrera, 1941)
Maxua	Español	Ecuador	(Lescano, 1994) (Patiño, 1964)
Navios	Español	Colombia	(Pérez, 1947)
Navos	Español	Colombia	(Pérez, 1947)
Navos	Español	Colombia	(Pérez, 1947)

**Tabla 2. Nombres de las diferentes variedades de Mashua**

Nombre	Color del tubérculo	Fuente
Occe añu	Plomizo	(Herrera, 1941)
Yana-añu	Negro	(Herrera, 1941)
Checche añu	Gris	(Herrera, 1941)
Ckello añu, K'ello-añu	Amarillo	(Herrera, 1941)
Muru añu	Violeta	(Herrera, 1941)
Puca-añu	Rojo	(Herrera, 1941)
Yana-añu	Negro	(Hermann y Cruz, 1991)
Yurac añu	Blanco	(Herrera, 1941)
Mashua-Quillu	Amarillo	(Espinosa <i>et al.</i> , 1997)
Mashua yana-saco	Negro	(Espinosa <i>et al.</i> , 1997)

#### 4. DESCRIPCIÓN BOTANICA

Ruiz y Pavón (1802) describieron botánicamente y gráficamente la *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), un geófito por presentar órganos subterráneos de reserva. Produce tubérculos de 5 a 15 cm de largo, cuyo color varía entre el blanco, amarillo, anaranjado y negro (Rodríguez et al., 2001).

Tallo: Es aéreo cilíndrico inicialmente erecto, adopta posteriormente un hábito postrado, enredándose mediante peciolos sensibles, formando una cobertura densa.

Hojas: Alternas, pecioladas, glabras, sin peltadas, palmatisectas, con tres a cinco lóbulos, palminervia, con la superficie adaxial verde oscura, superficie abaxial verde pálido.

Raíz: Las raíces son delgadas y filiformes, desarrollando posteriormente a una raíz tuberosa. El sistema radical es fibroso, ramificado y extendido más bien superficialmente, pudiendo penetrar hasta 0,8 metros de profundidad. Las plantas originadas a partir de tubérculos, por provenir de yemas y no de semillas, carecen de radícula; sus raíces, que son de carácter adventicio, se originan a partir de yemas subterráneas. Estas raíces se ubican en la porción de los tallos comprendida entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo; por esta razón, el tubérculo debe ser plantado a una profundidad tal que permita una adecuada formación de raíces y de rizomas.

A partir de los primeros estados de desarrollo, y hasta el momento en que comienza la formación de tubérculos, las raíces presentan un rápido crecimiento.

Flores: Pentámeras, gamosépalas y gamopétalas, zigomorfas, hipogineas, solitarias, pedunculadas, solitarias, dispuestas en la axila de las hojas. Cáliz mayormente de color rojo, anaranjado, pero algunas veces amarillo; los tres sépalos superiores fusionados se prolongan en la base formando un espolón que contiene tricomas secretores de néctar; en algunos casos pueden presentarse dos espolones en la misma flor.

Corola comúnmente de color amarillo a naranja con venas más oscuras, algunas veces lila claro a rojizo.

Androceo, conformado por ocho estambres, anteras pequeñas y caedizas.

El ovario sincárpico supero tricarpelar, trilocular, estilo simple con tres estigmas, cada lóculo contiene un ovulo en posición axial.

Fruto: Seco indehisciente, esquizocárpico, con tres semillas, la que posee un embrión recto y cotiledones gruesos y carnosos.

Tubérculos: Se forman en el extremo de los estolones, son alargados mazudos o globosos, usualmente de 5 a 15 cm de longitud y de 3 a 6 cm de ancho en su parte distal, es cubierto por una epidermis cerosa de diversos colores, con numerosas yemas (ojos) hundidas. Está formado por un tejido parenquimatoso reservante acuífero.



**Figura 2. Planta de Mashua parte superior derecha; partes reproductivas; inferior (Ruiz y Pavón, 1802)**

## 5. CONDICIONES DE CULTIVO

Los tubérculos como las ocas, ullucos y mashuas se cultivan en toda la sierra del Perú y el Sur de los Andes a partir de los 3000 a 3900 m.s.n.m. Los tubérculos andinos dentro de estos está considerada la *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) son de importancia en la alimentación de los pueblos rurales de la región Andina ya sea en el Perú, Colombia y Bolivia. Uno de los problemas de los últimos años es el peligro de perder la gran variabilidad genética de estos cultivos, debido a varias causas, tales como el remplazo por otros cultivos y falta de promoción, además del peligro debido a condiciones climáticas y daños físicos como ataques de plagas o enfermedades (Hermann, 1992).

Las condiciones de cultivo, varían de una variedad a otra, pero por lo general prefiere suelos ricos en humus, sueltos y arenosos. Su cultivo es similar al de la papa. Se le cosecha entre los 6 y 8 meses. Los tubérculos se pueden almacenar hasta seis meses en lugares fríos y ventilados.

Es de alta productividad y crece mejor entre los 2,400 y 4,300 m.s.n.m.

A continuación se brindan precisiones sobre las necesidades o requerimientos del cultivo de Mashua (Unesco, 1973).

### 5.1. FOTOPERIODO

Con respecto al fotoperiodo, depende de la subespecie y variedad considerada. Algunas accesiones requieren para desarrollar su área foliar de fotoperiodo largo más de 14 horas de luz y en el proceso de tuberización formación y engrosamiento de los tubérculos, de fotoperiodo corto menor de 14 horas de luz. Bajo condiciones de día corto latitudes cercanas a la línea ecuatorial las plantas de Mashua muestran una tuberización temprana, los estolones son cortos y el follaje permanece reducido (Unesco, 1973).

### 5.2. LUZ

La intercepción de luz por el cultivo depende de la intensidad lumínica, de la arquitectura del follaje planófila o erectófila, de la edad de las hojas y del porcentaje

de suelo cubierto por el follaje. El proceso fotosintético se efectúa cuando los rayos de sol incidan sobre la totalidad de las hojas verdes y no sobre el suelo desnudo. Hojas más viejas fotosintetizan menos que las muy jóvenes. En los cultivos con baja densidad de plantación menos de 35.000 plantas/ha no se produce competencia entre plantas, pero parte de la luz se pierde porque no toda el área de suelo está cubierta de follaje. Ello estimula a una mayor producción por planta y a un mayor tamaño de sus tubérculos (Unesco, 1973).

### **5.3. TEMPERATURA**

El tubérculo de Mashua tiene una latencia, inicia su brotación y emergencia en forma lenta a 5°C y se maximiza a los 14 – 16°C. Esto es importante al considerar la época de plantación ya que esta se debe iniciar cuando la temperatura del suelo haya alcanzado por lo menos 7-8°C. La respuesta fotoquímica a la temperatura tiene estrecha relación con la intensidad lumínica.

El área adecuada para el cultivo de la mashua, es la misma que se requiere para el cultivo de la papa, es decir con una temperatura media anual que fluctúe entre los 6 y 14 °C, con una precipitación lluviosa de alrededor de 700 a 1200 milímetros anuales (7 000 a 12 000 metros cúbicos de agua por ciclo). Durante el desarrollo del cultivo la planta forma su área foliar profusamente a temperaturas de 20 – 25°C. Temperaturas sobre los 37°C afectan el proceso fotosintético al aumentar excesivamente la respiración (Kalliola, 1990).

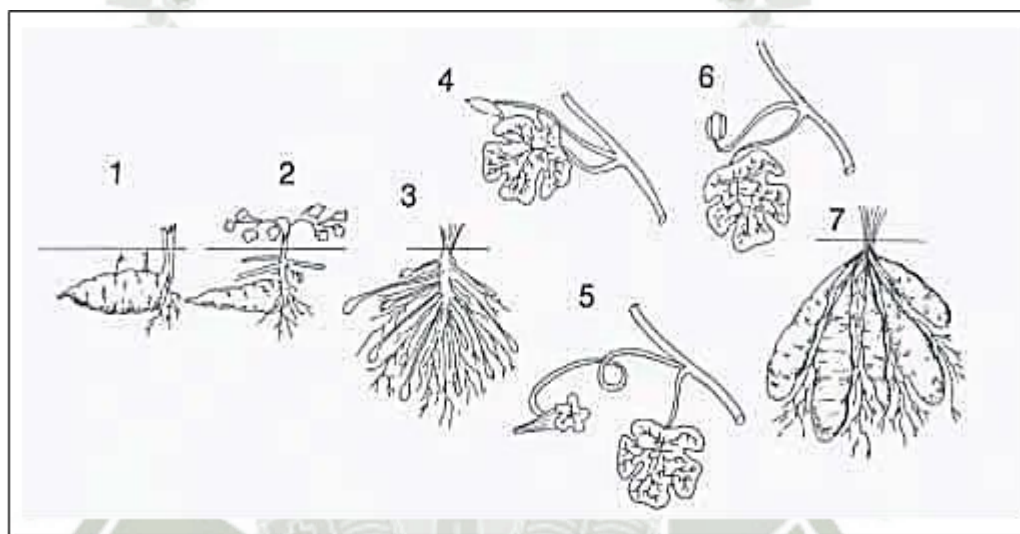
### **5.4. DESARROLLO DEL CULTIVO**

El desarrollo de una planta de Mashua es normal, hasta que el follaje cubre todo el terreno disponible, la fotosíntesis neta conseguida es usada para el crecimiento general de la planta, tanto su parte aérea como radicular y estolonífera. Dicho desarrollo es de alta intensidad en el uso de nutrientes.

Prácticas agronómicas tendientes a lograr una mayor densidad de plantación, suministro adecuado de nutrientes, abastecimiento oportuno de agua, clima con temperaturas de 18 a 25°C y una alta intensidad lumínica, favorecerán un desarrollo óptimo de esta etapa. Después de la emergencia la parte aérea y las raíces se desarrollan

simultáneamente. El crecimiento de los tubérculos puede iniciar lentamente a las 2-4 semanas después de la emergencia y continúa en forma constante a través de un largo periodo (Villarol, 2001).

Una característica importante de la Mashua es que es una planta perenne ya que aunque órganos aéreos pueden morir nuevamente al final de la temporada, la Mashua volverá a crecer, ya que los tubérculos pequeños frecuentemente se quedan en el campo y brotan con facilidad, especialmente bajo las condiciones húmedas como se muestra a continuación.



**Figura 3. Desarrollo de Mashua 1, aparición: 2 formación del Estolón; 3, Tuberización; 4-5, floración; 6, fructificación; 7, tubérculo maduro (Lescano, 1994)**

## **6. PROPAGACIÓN DE LA MASHUA**

La Mashua se produce con fines de producción en la agricultura andina tradicional exclusivamente a través de los tubérculos, los cuales deben ser retirados de la cosecha para ese propósito. Raíces o tubérculos pequeños también se puede utilizar para acelerar el agrupamiento de clones, aunque esta práctica es limitada para fines de investigación.

Como en el caso de tubérculos andinos (papas, oca, ulluco), las semillas de mashua no se utilizan para fines de propagación en las actuales prácticas agrícolas. Las razones

son probablemente las mismas que los demás tubérculos: falla en el verdadero método de propagación sexual, además de la duración de cultivo de plantas propagadas mediante semillas y predominio de la agricultura vegetal en los sistemas tradicionales de los Andes.

La Mashua es parte de poblados tradicionales con sistemas de cultivo de subsistencia del altiplano andino. Como la mayoría de los sistemas de producción agrícola y la mano de obra en la región son muy intensivas en el uso de la tierra (Camino, 1997).

## 7. COMPOSICION QUIMICA Y USOS DE MASHUA

### 7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El contenido de agua de los tubérculos de Mashua es relativamente alto, desde 79 a 94%, el principal aporte nutricional de Mashua son los carbohidratos que poseen en gran cantidad, especialmente el almidón y otros azúcares. El contenido de proteínas del tubérculo de Mashua es elevado en comparación a otros tubérculos. El análisis de aminoácidos presentes en el tubérculo de Mashua muestra una composición nutricional aceptada y recomendada por la OMS. La Mashua posee un alto contenido de ácido ascórbico o vitamina C con valores cercanos a 77,5 mg/100g de materia fresca es también importante desde el punto de vista nutricional (Collazos et al., 1996).

Al igual que otras especies de la familia *Tropaeolaceae*, la *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) contiene isotiocianatos presentes como glucosinolatos (Kjaer et al., 1978). Los isotiocianatos son bien conocidos por sus propiedades como antibióticas, insecticidas, nematocidas y diuréticas, lo que le confiere a la Mashua un amplio uso en la medicina tradicional andina (Johns, 1982).

El sabor picante-amargo característico de la Mashua es producida por p-methoxibencil isotiocianato, este compuesto es encontrado en subespecies *T. tuberosum* ssp. silvestres, también contienen pequeñas cantidades de 2-propil isotiocianato y 2-butil isotiocianato son los principales isotiocianatos presentes en esta subespecie (Johns y torres, 1981).

**Tabla 3. Composición química y nutricional de la mashua (en 100g de porción comestible fresca)**

Componente	Unid.	Rango	Prom.
Humedad	g	79,2	n.d.
Proteína cruda	g	9.38	1,5
Grasa	g	1,1-2,7	0,7
Fibra	g	n.d.	0,9
Minerales Cenizas	g	0,5-1,5	0,8
Azúcares totales	g	0,6-1,1	3,5
Azúcares reductores	g	n.d.	2,9
Almidón	g	n.d.	8,9
Energía	Kcal	7,0-10,5	n.d.
Calcio	mg	35-50	12
Potasio	mg	n.d.	1,5
Fierro	mg	1,3-1,8	1
Fósforo	mg	n.d.	0,7
Vitamina A (eq. $\beta$ -caroteno)	ug	0,6-0,8	10
Tiamina	mg	n.d.	0,1
Riboflavina	mg	n.d.	0,12
Niacina	mg	n.d.	0,67
Acido ascórbico	mg	n.d.	77,5
Lisina	mg/g proteína	35-69	n.d.
Treonina	mg/g proteína	22-46	n.d.
Valina	mg/g proteína	25-88	n.d.
Isoleucina	mg/g proteína	25-44	n.d.
Leucina	mg/g proteína	35-56	n.d.
Tirosina	mg/g proteína	13-62	n.d.
Triptófano	mg/g proteína	5-12	n.d.
Cisteína	mg/g proteína	1,4-29	n.d.

Fuente: (Grau et al., 2003).

\* n.d. = no disponible

## 7.2. USOS ALIMENTARIOS

Gracias a que los tubérculos de Mashua contienen altos niveles de los isotiocianatos le dan un sabor acre y los hacen inadecuados para el consumo crudo excepto en pequeñas cantidades, es por eso necesaria su ebullición para hidrolizar los isotiocianatos, eliminando el cianuro y mejorando el sabor. Los tubérculos de Mashua son normalmente hervidos junto con otros tubérculos y carnes (Cortés, 1981). La Mashua puede utilizarse como componente de numerosos platos, desde sopas y potajes hasta postres.

Una práctica Andina consiste en exponer los tubérculos y raíces a la luz solar directa con el fin de aumentar la dulzura y reducir los niveles de cianuro antes de cocinar (Dolores y Espín, 1997). Otro procedimiento común es hornear la Mashua en un horno de barro, que normalmente es preparado en el momento de la cosecha de Mashuas, el horneado le confiere un sabor y una textura blanda.

Una práctica común en la Paz, Bolivia, es comer la Mashua cocidas y congeladas empapadas con jarabe de caña de azúcar durante el invierno. Esta es una práctica poco común hoy en día (Cárdenas, 1989).

El consumo per cápita de tubérculos Mashua es difícil de evaluar y estimar la producción nacional en cifras tiene poco sentido porque el consumo varía enormemente de un lugar a otro. En las zonas rurales, donde los nativos amerindios predominan, el consumo puede ser considerable, especialmente durante y después de la cosecha, ya que la Mashua es una fuente frecuente de guarnición o ingrediente de platos principales, semanalmente el consumo per cápita puede ser más de 1 kg. Sin embargo, el consumo está limitado por la disponibilidad estacional de los tubérculos.

También las flores y brotes de Mashua pueden ser consumidas frescas en ensaladas con un poco de vinagre (King, 1987).

Se han encontrado al menos 30 genotipos de Mashua con una alta capacidad antioxidante, los valores más altos pertenecen a 3 genotipos de coloración morada-negra o comúnmente llamada Mashua negra, poseen un alto contenido en compuestos fenólicos con valores de 963.31mg ácido clorgénico /100g y 582.69 mg ácido

clorogénico/100g; también se encontraron antocianinas, con valores de 222.83 mg cianidin-3-glucósido/100g y 154.80 mg cianidin-3-glucósido/100g.

El contenido de carotenoides encontrado en los genotipos evaluados no fue significativo, encontrándose valores de 0.08-0.6mg<sup>β</sup> caroteno/100g, con estos estudios se encontró un correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas, lo cual indica que las antocianinas serían las principales responsables de la capacidad antioxidante de la Mashua (Huaccho, 2016).

### **7.3. USOS MEDICINALES**

La Mashua es consumida generalmente por los pobladores andinos, tiene propiedades benéficas sobre el hígado y los riñones (Oblitas, 1969) y también sobre la próstata y trastornos urinarios (Salcedo, 1986; Brack, 1999). En Bolivia la Mashua aún se utiliza en el tratamiento de enfermedades de la próstata y se vende en pequeñas cantidades en las zonas urbanas (Terrazas y Valdivia, 1998).

Otros usos medicinales reportados en el tratamiento de la amigdalitis, el dengue y la malaria. La Mashua también es útil en el tratamiento de enfermedades de la piel o dermatológicas (Pérez, 1947).

En conclusión la Mashua es usada tradicionalmente por la medicina folklórica para tratar a personas con problemas renales y hepáticos, también se emplea bajo aplicación tópica en casos de eczemas y manchas. Los beneficios de esta planta se deben a las propiedades relacionadas con salud en los tubérculos de Mashua podrían estar relacionadas con el contenido en glucosinolatos (Campos et al., 2006).

## **8. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO IN VITRO**

### **8.1. DEFINICIÓN**

El cultivo de tejidos *in vitro*, es un grupo heterogéneo de técnicas, mediante las cuales un explante, cualquier parte separada de una planta, células, tejidos, embriones, etc. con potencial de diferenciación puede ser cultivado bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macronutrientes, micronutrientes,

vitaminas y fitohormonas que se incuban en condiciones controladas. Esta técnica de cultivo aséptico se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad, que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se colocan en condiciones controladas y adecuadas (Luna, 2002).

## 8.2. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es un procedimiento que consiste en el cultivo bajo condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro*. Es también una de las aplicaciones del cultivo de tejidos donde ha habido más avances y es aplicada comercialmente a un mayor número de especies (Barba et al., 2001).

El cultivo *in vitro* se utiliza cada vez más para la propagación de especies amenazadas en peligro de extinción, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo (Pedroza, 2008).

Además, la micropropagación de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos ha sido lograda en varias especies de frutales y forestales cultivadas con el fin de multiplicar genotipos de interés (Pedroza, 2008).

## 8.3. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación incluye cinco fases:

Fase 0) Preparación de la planta madre.

En esta etapa se prepara a la planta madre a ser introducida bajo condiciones asépticas, se realizan estudios con pruebas serológicas debido a que pueden ser portadoras de enfermedades endófitas que pasan desapercibidas y luego se vuelven un problema en la etapa de la multiplicación. También es fundamental el conocimiento de su identidad

genética así como su vigor y sanidad, ya que son requisitos básicos para la obtención de cultivares confiables.

Fase 1) Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

Fase 2) Multiplicación de brotes

Fase 3) Enraizamiento

Fase 4) Aclimatación

Según Murashige (1974) las cuatro fases del cultivo *in vitro* son:

#### **Establecimiento del cultivo *in vitro*:**

El cultivo de tejidos comienza a partir de alguna parte de la planta extraídos de la planta madre. Estos pequeños órganos o trozos de tejido se llaman explantes. Las plantas que crecen en el medio natural están contaminadas por microorganismos ya sean bacterias u hongos. Los explantes antes de ser introducidos en el medio de cultivo han de ser desinfectados. Posteriormente se introducirán en el medio de cultivo estéril y se mantendrán allí en condiciones controladas y asépticas.

#### **Multiplicación:**

Una vez que la primera fase se ha completado con éxito, comienza la multiplicación de los explantes. El explante encuentra en el medio de cultivo todo aquello que necesita para su crecimiento y desarrollo agua, elementos minerales, azúcares, fitohormonas, etc. Tras un período de crecimiento (4-8 semanas) es necesario el subcultivo y paso a un nuevo medio. Es en este paso donde se produce la multiplicación de las plantas.

#### **Enraizamiento:**

Antes de llevar las nuevas plantas al exterior es necesario proporcionarles una raíz con la que sean capaces de realizar sus actividades vitales una vez que se encuentren de nuevo en el medio natural. La inducción de estas raíces se produce modificando ligeramente las características del medio de cultivo adecuándolas para la generación de raíces, generalmente agregando fitohormonas.

**Aclimatación:**

Esta última fase consiste en el paso de las plantas *in vitro* al medio natural. Este es un paso extremadamente importante, ya que si no se realiza cuidadosamente se pueden perder gran número de plantas. Las plantas en condiciones de cultivo *in vitro* están en una atmósfera con alta humedad y baja intensidad luminosa, por tanto el tejido epitelial se caracterizará por tener menos ceras que protejan a las plantas contra la deshidratación. El acondicionamiento de nuevo al medio exterior se efectuará por tanto cuidadosamente, utilizando para ello invernaderos.

#### 8.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

A continuación se mencionan ventajas y desventajas de la micropropagación (Barba et al., 2001).

**Ventajas:**

- Producción de un gran número de plantas a partir de un inóculo.
- La obtención de plantas puede ser en cualquier época del año.
- Las plantas pueden almacenarse *in vitro* ocupando poco espacio.
- Permite la obtención de clones de plantas donadoras de alta calidad.
- En la mayoría de los casos la producción comercial de las especies resulta redituable.

**Desventajas:**

- No todas las especies responden igual al cultivo *in vitro*.
- Cada especie requiere de métodos particulares de cultivo *in vitro*.
- La fase de investigación es costosa.

#### 8.5. MEDIOS DE CULTIVO

La adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito en el cultivo de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un explante. Generalmente, los medios de cultivo

contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable (Perea y Tirado, 2011).

Uno de los medios de cultivo más usados en la actualidad es el medio de cultivo Tabla 4 que fue propuesto por Murashige y Skoog (1962). Este medio se recomendó para ensayos de médula de tabaco con el fin de obtener una alta tasa de crecimiento y un aumento en la respuesta a los factores orgánicos de crecimiento con un mínimo de interferencia con otros nutrimentos orgánicos e inorgánicos. Los extractos foliares del tabaco producían un aumento en el crecimiento de tejido medular aislado o en cultivos de callo de *Nicotiana tabacum*; esto se debía, en parte a constituyentes inorgánicos del extracto, especialmente el N y el K. Este medio se considera como alto en sales y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones (Roca y Mrogrinski, 1991).

**Tabla 4. Medio basal Murashige y Skoog (1962)**

Solución	Reactivo – Fórmula	Concentración (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>	Nitrato de amonio - $\text{NHNO}_3$	1650
	Nitrato de potasio - $\text{KNO}_3$	1900
	Cloruro de calcio dihidratado - $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	Sulfato de magnesio heptahidratado - $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	Fosfato de potasio monobásico - $\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<b>Micronutrientes</b>	Yoduro de potasio – KI	8.3
	Ácido trioxobórico - $\text{H}_3\text{BO}$	62
	Sulfato de manganeso monohidratado - $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	11.8
	Sulfato de zinc heptahidratado - $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	Molibdato de sodio - $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
	Sulfato de cobre pentahidratado - $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Cloruro de cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
<b>Quelatos de Hierro</b>	Sulfato ferroso heptahidratado - $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	Etilen diamino tetra acetato - $\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3
<b>Vitaminas y aminoácidos</b>	My-inositol	100
	Ac. Nicótico	0.5
	Piridoxina	0.5
	Tiamina	0.1
	Glicina	2

**Fuente:** (Murashige y Skoog, 1962).

## 9. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

### 9.1. ELEMENTOS MINERALES

El medio de cultivo requiere una combinación de macro y micro nutrientes para el correcto desarrollo de la planta. Esta combinación de nutrientes va a variar dependiendo de la especie a propagar (Caula, 2011).

Los macronutrientes son requeridos en grandes cantidades en la mayoría de medios. El nitrógeno es usualmente añadido en forma de iones amonio y nitrato aunque también se utilizan formas orgánicas como aminoácidos (Caula, 2011). Las necesidades totales de N, varían entre 12-60 mmol/L, de los cuales al amonio le corresponden 6-20 y al nitrato 6-40 mmol/L. La mayor parte de las plantas prefieren el nitrato al amonio, aunque en algunos casos puede ocurrir lo contrario. Es necesario encontrar la mejor proporción nitrato/amonio para conseguir un crecimiento y desarrollo óptimos *in vitro* (Pierik, 1990).

El nitrógeno es necesario para que la planta fabrique proteínas y también está involucrado en la generación de energía, una planta con hojas amarillas indica deficiencia de este nutriente. El fósforo, es un elemento crítico en la estructura de la planta, da energía y es parte del ADN. La falta de este elemento genera que la planta tenga un color morado. El potasio está involucrado en las enzimas. El magnesio es parte de la clorofila. El calcio, está involucrado en un gran número de procesos y ayuda a la planta a mantenerse verde y florecer. El azufre, también es necesario para la elaboración de proteínas (Dorris, 2010).

El nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, calcio, fósforo y azufre son añadidos al medio de cultivo como diferentes compuestos químicos conocidos como macrosales. Algunos de ellos son:  $MgSO_4 \cdot H_2O$  que provee magnesio y azufre;  $NH_4 H_2PO_4$ ,  $KH_2PO_4$  proveen fósforo;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ó  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  provee calcio y  $KCl$ ,  $KNO_3$  o  $K_2HPO_4$  proveen potasio (Caula, 2011).

Los micronutrientes son requeridos por la planta en menor cantidad, los elementos que forman parte de este grupo son: hierro, manganeso, zinc, cobalto, cobre y molibdeno.

Estos elementos intervienen en procesos químicos de la planta por ello es necesario que estén presentes en el medio de cultivo en las cantidades necesarias, debido a que si son añadidos en grandes cantidades pueden causar daño a la planta (Dorris, 2010). En el caso del hierro se debe añadir conjuntamente con un agente quelante ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) que permite que este elemento esté disponible en un amplio rango de pH (Márgara, 1988).

## 9.2. COMPONENTES ORGÁNICOS

### Carbohidratos

Son compuestos orgánicos como el azúcar y la celulosa (Mejía, 1994). Los carbohidratos no son dados a la planta porque generalmente ellas mismas los generan. Sin embargo, plantas en laboratorio son pequeñas o están incompletas para sintetizar todos los compuestos orgánicos que necesitan (Kyte, 1987).

Sacarosa o glucosa son comúnmente usadas en la preparación de medios de cultivo, de 2-5% (p/v). Otras fuentes de carbohidratos como fructosa o almidón, también pueden ser utilizadas (Smith, 2013).

### Vitaminas

Para alcanzar el mejor crecimiento de tejidos es comúnmente esencial suplementar el medio con una o más vitaminas y aminoácidos. De estos, la tiamina (vitamina B1), generalmente es el ingrediente esencial. Otras vitaminas, especialmente piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3) y pantetonato de calcio (vitamina B5) y myo-inositol, son también conocidos como mejoradores del desarrollo de plántulas *in vitro* (Mejía, 1994).

Myo-inositol es un interesante hexitol involucrado en la biosíntesis de cyclitol, almacenamiento de compuestos polihídricos como reservas, germinación de semillas, transporte de azúcares, nutrición mineral, metabolismo de carbohidratos, estructura de la membrana celular, como la formación de la pared celular, en la homeostasis hormonal y en el estrés fisiológico (Loewus, 1993 citado por Smith, 2013).

### 9.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO O FITOHORMONAS

En algunos casos no se obtienen respuestas deseadas en los cultivos de tejidos *in vitro*, empleo de un medio básico sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio fitohormonas o reguladores de crecimiento, generalmente auxinas y citoquininas (Roca y Mogrinski, 1991).

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente del que han sido producidas y son activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las fitohormonas, se denominan reguladores de crecimiento y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza (Luna, 2002).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores, especialmente auxinas y citoquininas, juegan un papel importante. Estos compuestos controlan y modulan la iniciación y desarrollo de brotes o raíces en explantes y embriones en medios de cultivo semisólidos o líquidos. También estimulan la división y expansión celular (Caula, 2011).

Según Dodds (1985), los reguladores de crecimiento más requeridos por la mayoría de cultivos son las auxinas y citoquininas. Los efectos relativos de las auxinas y citoquininas en la morfogénesis de tejidos cultivados fueron demostrados por Skoog y Miller en 1957 y hasta ahora sirven como base para la manipulación de cultivos de tejidos vegetales (Caula, 2011).

Las auxinas promueven la elongación celular, mientras que las citoquininas promueven la división celular y la aparición de brotes (Kyte, 1987).

## **Auxinas**

En la naturaleza las hormonas de este grupo están identificadas por ocasionar elongación de tallo e internudos, tropismo y dominancia apical, abscisión y enraizamiento, etc. (Mejía, 1994)

Las auxinas son requeridas por la mayoría de las células vegetales para la división celular y el enraizamiento. Sin embargo, en altas concentraciones, las auxinas pueden suprimir la morfogénesis. La auxina 2,4-D es usada para la inducción de callos, mientras que IAA, IBA y NAA son usadas para el enraizamiento (Smith, 2013).

El modo de acción de las auxinas en la promoción del crecimiento está dado por la inducción y liberación de los iones hidrógeno a través de la pared celular, con la consiguiente alteración en la composición lipídica y acidificación de la pared celular, incrementando su extensibilidad. Los iones potasio se incorporan a la célula para contrarrestar la liberación de iones hidrógeno o por una disminución del potencial de agua en la célula, favoreciendo su ingreso y expansión. Su acción en la morfogénesis consiste en la liberación genética del programa fisiológico del tejido, las células responden a las auxinas revirtiendo a un estado de diferenciación para iniciar su posterior división (Luna, 2002).

## **Citoquininas**

Las citoquininas promueven la división celular, ayudan a la germinación, afectan la abscisión de hojas, influyen en el transporte de auxina, permitiendo a las giberelinas trabajar superando la presencia de inhibidores, y retrasan la senescencia, por ejemplo estos reguladores posponen la descomposición de la clorofila, proteínas (Kyte, 1987).

Las citoquininas más usadas comúnmente son zeatina, dihidrozeatina, kinetina, benzyladenina, tidiazurón e isopentil adenina 2iP. En altas concentraciones (1-10uM) este grupo de hormonas induce la aparición de brotes adventicios pero inhibe el enraizamiento (Caula, 2011).

Para preparar stock de citoquininas se debe usar HCl 1N y unas cuantas de gotas para disolver los cristales (Smith, 2013).

## 9.4. AGENTE GELIFICANTE

La mayoría de experimentos en cultivo de tejidos *in vitro* utilizan como soporte un agente gelificante. (Smith, 2013). Básicamente el agar mantiene a las plantas a flote en el medio. El agar es un polisacárido de alto peso molecular derivado de las algas (Caula, 2011) y en el proceso puede absorber gran cantidad de sal lo cual no es bueno para la planta. Este compuesto hace que el medio de cultivo sea medio amarillo y turbio (Dorris, 2010). Es añadido al medio de cultivo en concentraciones que van de 0,5 a 1,0 % (p/v) (Caula, 2011).

Varios sustitutos del agar han sido desarrollados. Uno de ellos, Gelrite, es derivado de la bacteria *Pseudomona sp.* y se puede adquirir en el mercado. Al igual que el agar es un polisacárido refinado, mantiene el medio claro y no se han observado efectos adversos en el medio de cultivo (Kyte, 1987).

## 10. CULTIVO DE SEGMENTOS NODALES

Con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Dada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*, realizándose los repicados cuando son necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo (Pierik, 1988).

## 11. FACTORES QUE AFECTAN LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS

### 11.1. EL EXPLANTE

La edad del explante a utilizar puede ser muy importante, debido a que tejidos jóvenes responden mejor *in vitro*. En muchos casos, tejidos viejos no forman callos que sean capaces de regeneración. Además el tejido joven, como ha sido recién formado generalmente reacciona mejor a los desinfectantes (Smith, 2013). También se ha

encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer, 1983).

Existen otros factores que pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, como la época del año en que se realizan los cultivos, explantes obtenidos de invernadero o campo, los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (Roca y Mrogrinski, 1991).

Pierik (1991), menciona que la posición del explante en la planta madre influye sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* después del aislamiento. Por ejemplo, cuanto más alto es el vástago aislado de un árbol menor es la probabilidad de que se formen raíces adventicias, ya que las proporciones más altas son más adultas que las más bajas.

Smith (2013), señala que dependiendo de la posición del explante en la planta, el contenido de hormonas en el explante variará.

El tamaño del explante también tiene un efecto en la respuesta del tejido. Generalmente, mientras más pequeño el explante, más difícil es de cultivar. Se deben añadir componentes adicionales al medio de cultivo para que el explante pueda desarrollar. Explantes grandes probablemente contengan mayores reservas de nutrientes y reguladores de crecimiento para mantener el cultivo (Smith, 2013).

El efecto de la estación también ha sido observado en varias especies cultivadas *in vitro* (Trigiano, 2011). La época en que se extraiga el explante puede tener efectos en la contaminación y respuesta del mismo. Por ejemplo, yemas o brotes tomadas durante la primavera, cuando estos están en época de crecimiento responden mejor *in vitro* que las yemas en dormancia. Además, las tasas de contaminación aumentan conforme el verano avanza; en otoño e invierno la contaminación de explantes puede alcanzar un cien por ciento (Smith, 2013).

## 11.2. EL GENOTIPO

El crecimiento del cultivo de tejidos, el desarrollo de órganos y la morfogénesis *in vitro* están probablemente más influenciados por el genotipo que por cualquier otro factor. El medio de cultivo y el ambiente necesitan ser variados dependiendo del género o especie incluso, para variedades estrechamente relacionadas, los requerimientos del medio de cultivo pueden ser diferentes. Algunos cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser suficientes para mejorar la respuesta del genotipo (Luna, 2002).

## 11.3. FACTORES FÍSICOS

Los principales factores físicos que influyen durante la incubación del cultivo son: la luz, la temperatura y la concentración de gases como Oxígeno, Dióxido de Carbono y el etileno (Calderón et al., 1995).

Los factores luz y temperatura han sido los más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa ente 24 y 28°C (Roca y Mrogrinski, 1991).

Para acelerar el crecimiento y morfogénesis *in vitro*, los cultivos son mantenidos generalmente a temperaturas medias las cuales son más altas que las temperaturas que experimentarían las mismas plantas si crecieran *in vivo*. Plantas tropicales y subtropicales como el algodón, arroz, tienden a ser cultivadas *in vitro* a temperaturas ligeramente mayores que las especies de regiones templadas desde 24°C-32°C (George et al., 2008).

No existe una temperatura definida para el cultivo de tejidos de ninguna especie y las temperaturas generalmente variarán en los estudios de acuerdo al tipo de experimento a realizar y el tipo de órgano o tejido que se cultivará (George et al., 2008).

El fotoperiodo, la longitud de onda y la intensidad lumínica deben ser tomados en cuenta cuando se realiza el cultivo de tejidos; además de alguna forma parece que existe un reflejo de los requisitos de temperatura de las plantas crecidas en condiciones de campo (Montoya, 1991).

Debido a factores económicos la intensidad de luz en la mayoría de salas de incubación se mantiene en 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  aproximadamente 5000 lux. Este nivel es claramente mucho más bajo que el de la luz del día. Por ello es necesario añadir fuentes de carbohidratos a los medios de cultivo. A pesar que un pequeño flujo de gas dentro y fuera del cultivo será causado por fluctuaciones en la temperatura y en la presión atmosférica de la sala de incubación, el mayor intercambio de oxígeno se da por difusión (George et al., 2008).

El oxígeno disponible será influenciado por: la concentración del gas en la atmósfera del ambiente, la tasa de difusión dentro del recipiente de la planta y la tasa de difusión dentro de las células cultivadas o tejidos (George et al., 2008).

#### **11.4. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO**

La formación de brotes de algunas especies se logra solamente en agua. En otras plantas el medio sólido necesita contener una adecuada concentración de sales minerales y sacarosa. Así mismo, el tipo de cultivo está influenciado por la naturaleza física del medio. Sin embargo, la morfogénesis depende del medio empleado y es esencial un balance correcto entre las sales inorgánicas, orgánicas y reguladores de crecimiento (Luna, 2002).

#### **11.5. ASEPSIA**

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón es porque en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacteria y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial, alcohol a diferentes porcentajes y otros (Roca y Mrogrinski, 1991).

Los explantes deben estar libres de contaminantes cuando van a ser sembrados en el medio de cultivo. Para lograr eso, generalmente se tiene a las plantas donadoras de explante en condiciones que minimizan la contaminación bacteriana y por hongos. Los

contaminantes pueden estar confinados en las superficies de la planta, sin embargo, algunos microbios y virus pueden encontrarse dentro de los tejidos (Casells, 1991).

También deben esterilizarse las herramientas usadas para la disección, como pinzas, bisturí, platos, etc. Y los recipientes en donde los explantes se desarrollarán y crecerán. (George et al., 2008)

### **11.6. AGAR**

El tipo de agar usado para preparar el medio de cultivo puede afectar la respuesta de los experimentos. Si el agar no está puro; generalmente presentará impurezas que perjudican el medio de cultivo. Como el agar es un producto derivado de las algas, puede tener actividad fisiológica en contacto con el tejido vegetal. (Smith, 2013). Ácidos orgánicos, componentes fenólicos y ácidos grasos de cadena larga son algunos contaminantes que pueden estar presentes en el agar (Caula, 2011).

La consistencia del agar puede también influenciar el crecimiento de la planta, si está muy duro, el crecimiento de la planta será reducido. Si está muy suave, las plantas sufrirán de hiperhidricidad (Caula, 2011).

### **11.7. pH**

El pH del medio de cultivo se ajusta generalmente entre 5,5 y 6. Debajo de 5,5 el agar no solidificará correctamente y sobre 6, el gel estará muy firme (Smith, 2013).

El pH del medio va a influenciar en que las sales del medio de cultivo se mantengan en forma soluble, en la toma de nutrientes, reguladores de crecimiento y el efecto gelificante del agar (George et al., 2008).

## **12. PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO *IN VITRO***

### **12.1. CONTAMINACIÓN**

La presencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante las primeras etapas. Esta situación se genera por las

condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo (Debergh y Zimmerman, 1991).

La mayor fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistemáticos de la planta donadora. Para controlar la contaminación superficial se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas. A pesar de esto el material, puede no quedar completamente estéril, ya que es probable que se presenten microorganismos sistemáticos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Casells, 1991).

Adicional al uso de sustancias químicas de desinfección, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo, y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca y Mrogrinski, 1991).

## 12.2. OXIDACIÓN O FENOLIZACIÓN

Durante el cultivo *in vitro* el explante sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo *in vitro* como la composición del medio. Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. La síntesis de fenoles va a producir una serie de reacciones de hipersensibilidad, tales como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. De igual forma, las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas se ven afectadas, incluso aunque esas células no parezcan estarlo, llevando finalmente a una muerte prematura (Debergh y Read, 1991).

En general, los fenoles son sustancias lábiles y fáciles de oxidar. Los productos generados por la oxidación tienen carácter fitotóxico, por lo que son capaces de alterar eventos morfogénicos y/o de crecimiento y desarrollo, potenciando en otras ocasiones otros procesos de oxidación, puesto que se convierten en potentes oxidantes (Dixon y Paiva, 1995).

Por lo dicho, en el cultivo de tejidos se hace necesario controlar el efecto de la oxidación. Una forma mediante la cual se puede realizar esto es evitando el estrés que estimula la biosíntesis de compuestos fenólicos, con el fin de impedir que estas sustancias aparezcan en los cultivos y produzcan efectos tóxicos e inhiban el crecimiento (Debergh y Read, 1991).

Los explantes frecuentemente se tornan marrones o negruzcos poco después del aislamiento y cuando esto ocurre, se inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere, los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros. La síntesis de fenoles se puede evitar como se describe a continuación. (Debergh y Zimmerman, 1991); Thomas y Ravindra, 1997).

### 12.3. PREVENCIÓN

El oscurecimiento de los tejidos, especialmente de los explantes recientemente aislados y el medio puede prevenirse generalmente siguiendo estos pasos

- Removiendo los compuestos fenólicos producidos por dispersión, adsorción o lavado:
  - Adsorción mediante carbón activado (CA).
  - Adsorción por polyvinilpirolidona (PVP).
- Modificando el potencial redox disminuyendo los agentes redox, o la disponibilidad de oxígeno.
  - Agentes reductores: ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína HCL, ditriotreitol, glutatión y mercaptoetanol.
  - Menor disponibilidad de oxígeno: medios líquidos estacionarios.
- Inactivando las enzimas fenolasas empleando quelatantes.
  - Agentes quelantes: NaFeEDTA, EDTA, dietilditiocarbamato, dimetilditiocarbamato.

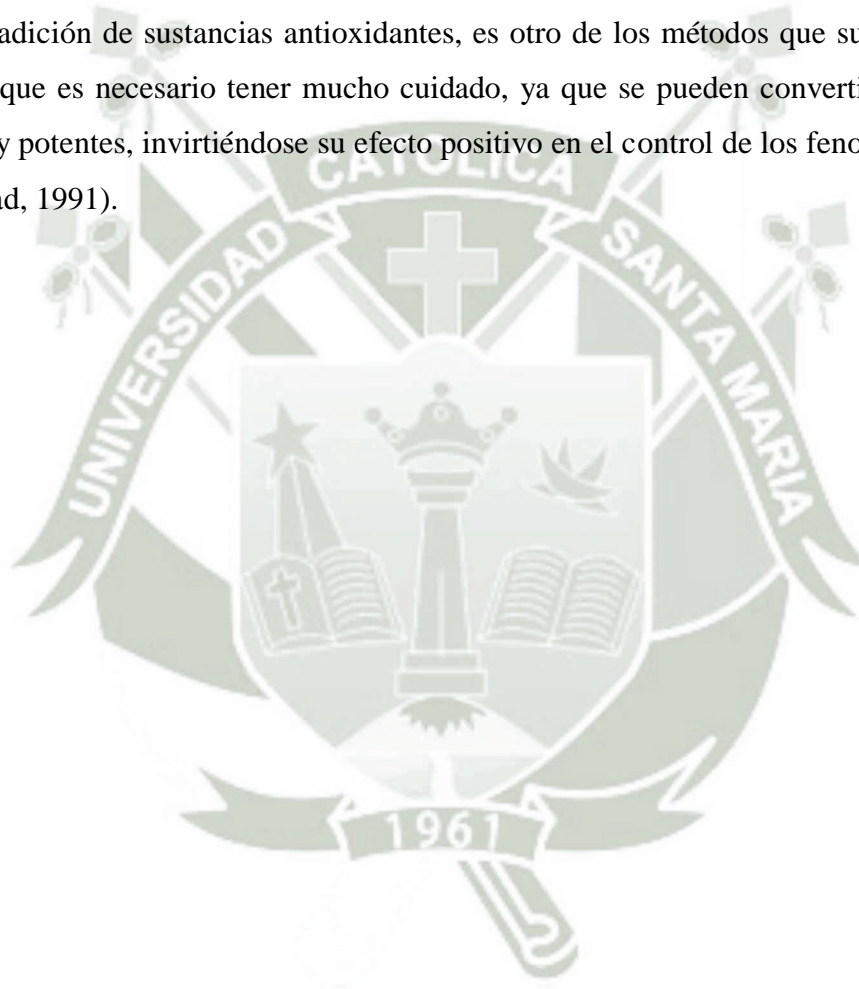
- Reduciendo la actividad fenolasa y la disponibilidad del sustrato.

- Bajo pH

- Oscuridad

La incubación a temperaturas más bajas, entre otros. En general lo que se busca al proporcionar estas condiciones es reducir la actividad fenolasa y la disponibilidad de sustratos para esta enzima (Debergh y Zimmerman, 1991; Thomas y Ravindra, 1997).

La adición de sustancias antioxidantes, es otro de los métodos que suelen aplicarse, aunque es necesario tener mucho cuidado, ya que se pueden convertir en oxidantes muy potentes, invirtiéndose su efecto positivo en el control de los fenoles (Debergh y Read, 1991).



## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se llevó a cabo en los ambientes del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### 2. MATERIALES

##### 2.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado (Figura 5) fueron segmentos nodales de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra) estos fueron colectados de tallos y ramas primarias de plantas de Mashua negra (Figura 4) provenientes de la ciudad de Arequipa; las cuales se obtuvieron mediante el método de tallo brotado en campo.

De acuerdo a las características morfológicas de la planta se determinó como *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra). Debido a que las características morfológicas son similares al ser comparada con el 203040 de los descriptores del Centro Internacional de la papa (Manrique et al., 2013).

Las plantas madre se mantuvieron en un invernadero cubierto con malla antiáfidos. Se les aplicó un fungicida de amplio espectro Benlate a 2 mg/L y Phyton 2 mL/L a nivel foliar. La frecuencia de aplicación fue 1 semana antes de la introducción del material vegetal. Esto se hizo con el fin de disminuir la contaminación de los explantes.



**Figura 4. *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra) en invernadero del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

## **2.2. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO**

### **2.2.1. MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO**

- Baguetas
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Encendedor
- Jeringa de 1 mL.
- Jarra con medida
- Mechero
- Pipeta de 5 mL.
- Placas Petri
- Probeta de 25, 50 y 1000 mL.
- Frascos de vidrio

- Plástico film

### 2.2.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Termo-higrómetro
- Timer (Regulador de fotoperiodo)
- pH-metro

### 2.2.3. OTROS MATERIALES

- Agua destilada
- Alcohol 96°
- Benlate
- Detergente Comercial
- Fluorescentes
- Guantes quirúrgicos
- Hipoclorito de sodio al 2, 4 y 8%
- Hojas Bond
- Guardapolvos
- Mascarillas
- Papel toalla
- Papel Aluminio
- Pinza recta
- Pinza Curva
- Platos metálicos
- Phytton

- Tijera de podar

#### 2.2.4. COMPUESTOS QUÍMICOS

- Medio de cultivo de MS (Murashige y Skoog, 1962).
- Citoquinina
- Auxina
- Tiamina HCL
- Piridoxina
- Ácido Nicotínico
- Glicina
- Myo inositol
- Azúcar
- Agar
- Plant Preservative Mixture (PPM)

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. SELECCIÓN DE EXPLANTES

Se seleccionaron segmentos nodales entre 4 y 6 cm con presencia de yemas (Figura 5), de la parte media y superior de ramas primarias de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra) con las mejores características fenotípicas (hojas más verdes, sanas y vigorosas). Se cortaron los explantes con tijera de podar esterilizada en la estufa a 150°C. Los explantes fueron llevados al laboratorio en un frasco previamente esterilizado.



**Figura 5. Segmentos nodales empleados sin hojas caulinares de rama primaria de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra)**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

### **3.2. DESINFESTACIÓN DE EXPLANTES**

La desinfestación y limpieza de explantes se hizo fuera y dentro de la cámara de flujo laminar.

El tratamiento aplicado fuera de la cámara de flujo laminar consistió en la inmersión de los explantes en detergente comercial a una concentración de 5g/250mL durante 15 minutos. En este periodo de tiempo se realizó la limpieza de las yemas con agitación para quitar polvo, debido a que el tallo de la de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra) es delgado.

Luego se dejó los explantes sumergidos en una solución compuesta por Benlate 0.5 g en 500 mL de agua destilada, el tiempo de inmersión fue de 10 minutos y luego se enjuago con agua destilada estéril y se llevaron a la cámara de siembra en un frasco esterilizado (Figura 6).

Los tratamientos dentro de cámara de flujo utilizados para la desinfestación de los explantes de Mashua negra fueron propuestos y se basaron en trabajos realizados por Torres et al. (1989) y Tapia (1990) en la especie estudiada.

Cada uno de los explantes fueron cortados previamente antes de ser desinfestados dentro de la cámara de flujo laminar. Con ayuda de un bisturí, se redujo el tamaño de los explantes a aproximadamente 1 cm para evitar contaminación. Para la desinfestación probaron tres tratamientos en los cuales se usaron alcohol de 70%, hipoclorito de sodio (NaOCl) en distintas concentraciones y agua destilada estéril. Los tratamientos (Tabla 5) fueron los siguientes:

**T1:** Los explantes se coloraron en un frasco estéril, seguidamente fueron sumergidos en alcohol de 70% por 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se colocaron en un frasco estéril con 250 mL de hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos. A continuación se enjuagaron los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

**T2:** Los explantes se colocaron en un frasco estéril seguidamente fueron sumergidos en alcohol de 70% por 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se coloraron en un frasco estéril con 250 mL de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. A continuación se enjuagaron los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

**T3:** Los explantes se colocaron en un frasco estéril seguidamente fueron sumergidos en alcohol de 70% por 30 segundos, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se coloraron en un frasco estéril con 250 mL de hipoclorito de sodio al 1.5% por 5 minutos. A continuación se enjuagaron los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

**Tabla 5. Tratamientos de desinfestación**

Tratamiento	Alcohol 70%	NaOCl 1%	NaOCl 1,5%
T1	30s	5 min	
T2	30s	10 min.	-
T3	30s	-	5 min

**Fuente:** Elaboración propia.

El número de repeticiones por tratamiento fue 12, se colocó un explante por repetición. Cada explante fue sembrado en un tubo de ensayo (Figura 7) con medio MS (Murashige y Skoog) al cual se le adicionó 2ml/L de Plant Preservative Mixture (PPM), sugerido por el IBT.



Figura 6. Explantes de Mashua negra en frasco antes de ser desinfectados

**Fuente:** Registro de la Investigación.



**Figura 7. Explantes de Mashua negra después del proceso de desinfección en tubos de ensayo**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

### **3.3. ENSAYO ESTABLECIMIENTO *IN VITRO***

Se realizó los ensayos de medios de cultivo basado en el medio basal establecido por Murashige y Skoog (1962) (MS), con tres tratamientos los cuales fueron (Tabla 6): Medio MS,  $\frac{1}{2}$  MS y MS modificado para papa (IBT, 2016); suplementado con Pantotenato de calcio 2ppm, Arginina HCl 4ppm, Sacarosa 30g/L y 7g/L de Agar.

Para el desarrollo de esta prueba, se realizó nuevamente la introducción de segmentos nodales de ramas primarias de Mashua negra utilizando el T2, el cual resultó ser el mejor para la desinfección de explantes.

Por cada tratamiento se trabajó con 10 repeticiones y cada explante se consideró como una repetición. Las repeticiones estuvieron en función al material vegetal disponible después de lo obtenido en la desinfección. Como los resultados que se obtuvieron fueron aceptables ya no fue necesario utilizar una mayor cantidad de explantes.

### 3.3.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Cada uno de los diferentes tratamientos fue preparado en la Sala de medios del laboratorio del Instituto de biotecnología – Área de cultivo de Tejidos Vegetales utilizando macronutrientes y micronutrientes requeridos por cada tratamiento. Cada uno de los macro y micronutrientes fueron pesados y diluidos en agua destilada, al igual que las vitaminas, hormonas y sacarosa.

El pH de los medios fue calibrado en el pHmetro a 5.7. Se utilizaron Hidróxido de potasio (KOH) y Ácido clorhídrico (HCL) para la calibración. Esta se hizo previa a la adición del agar. Luego de haber sido calibrados, se agregó el agar y se calentó en microondas por 10 minutos, después se removió con una bagueta y se volvió a calentar en microondas por 5 minutos hasta que el agar este bien disuelto.

Los medios de cultivo (Tabla 7) fueron vertidos en tubos de vidrio Pirex y se taparon con papel aluminio. Una vez llenos los frascos se llevaron a la sala de autoclavado para la respectiva esterilización, ésta se hizo a 125°C y 15psi por un tiempo de 25 minutos. Posterior a la esterilización se sellaron con papel film y se almacenaron en la sala de medios de cultivo.

Se esperó mínimo 7 días para poder utilizar los medios de cultivo, Se realizó esto para observar si aparecía algún agente patógeno que podría interferir y perjudicar las evaluaciones o al medio de cultivo.

**Tabla 6. Composición de los medios de cultivo para la fase de establecimiento de Mashua negra**

Compuesto	Concentración (mg/L)		
	Murashige y Skoog (1962)	Murashige y Skoog ½	Murashige y Skoog modificado (IBT, 2016)
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	1750
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185	365
KNO <sub>3</sub>	1900	950	2000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	220	300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	175
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	18.65	37.3
<b>Micronutrientes</b>			
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	13.9	27.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.125	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	0.012
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.0125	0.00125
KI	0.83	0.415	1.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.1	3,1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	4.3	10
<b>Vitaminas</b>			
Glicina	2.0	2.0	2.0
Ácido Nicotínico	0.5	0.5	0.5
Piridoxina	0.5	0.5	0.5
Tiamina	0.1	0.1	0.4
myo-Inositol	100	100	100

**Fuente:** Elaboración propia.

**Tabla 7. Codificación para los medios de cultivo para el establecimiento de Mashua negra**

Medio de Cultivo	Código
Murashige y Skoog	M1
Murashige y Skoog ½	M2
Murashige y Skoog modificado	M3

**Fuente:** Elaboración propia.

De acuerdo al desarrollo de los explantes de Mashua negra observado en la realización de las pruebas de medios de cultivo de establecimiento, se procedió a pasar a la etapa de medios de multiplicación. Esta prueba servirá para aumentar el conocimiento y orientar la investigación en el protocolo de propagación masiva *in vitro* de la Mashua negra. Se probaron cuatro diferentes tratamientos. Los medios de cultivo de multiplicación usados fueron los siguientes:

### 3.4. ENSAYO MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

**Tabla 8. Medios de cultivo para multiplicación de Mashua negra**

Código	Tratamiento	Componentes
MM1	Medio de multiplicación 1	MS modificado + 2ml/L de PPM
MM2	Medio de multiplicación 2	MS modificado + 2mg/L de BAP + 2ml/L de PPM
MM3	Medio de multiplicación 3	MS modificado + 1mg/L de Ácido fólico + 4mg/L de Arginina HCl + 2mg/L de Pantotenato de Ca + 2ml/L de PPM
MM4	Medio de multiplicación 4	MS modificado + 4mg/L de Arginina HCl + 2mg/L de Pantotenato de Ca + 0.5mg/L de AG3 + 1mg/L de BAP + 0.01mg/L de ANA

**Fuente:** Elaboración propia.

Los medios de multiplicación (Tabla 8) se propusieron en base a estudios previos realizados en especies de tubérculos, donde también se usaron segmentos nodales para la fase de multiplicación *in vitro* en la micropropagación.

La prueba con los medios de multiplicación se hizo después de aproximadamente dos meses luego se superó la fase de establecimiento *in vitro* de los explantes de Mashua negra. Se seleccionaron las plántulas vigorosas y bien desarrolladas para esta prueba. Es decir, aquellas que medían de 3 cm a más, que presentaban de 4 a más hojas con una coloración verde, y que se observaban vigorosas. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento en tubos de ensayo.

### **3.5. PARÁMETROS EVALUADOS**

#### **3.5.1. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN**

En esta primera parte de la investigación se hicieron las evaluaciones al cabo de 4 semanas después de introducir el material vegetal de Mashua negra y se evaluó lo siguiente:

- Contaminación de explantes de Mashua negra.
- Supervivencia de explantes de Mashua negra.

En la evaluación al cabo de cuatro semanas, se contabilizaron los explantes contaminados, por hongos o bacterias, y también se contabilizaron los explantes vivos y los explantes muertos.

#### **3.5.2. ENSAYOS CON MEDIOS DE CULTIVO**

##### **a. Fase de establecimiento**

Para la fase de establecimiento de Mashua negra se hicieron evaluaciones semanales por un periodo de cuatro semanas en donde se evaluó lo siguiente:

- Altura del explante
- Número de hojas

- Número de brotes

b. Fase de multiplicación

Para la fase de multiplicación se hizo una evaluación a las cuatro semanas de iniciada la prueba y se evaluaron las siguientes variables:

- Número de brotes
- Numero de hojas
- Longitud de vitroplanta
- Presencia de callos
- Presencia de raíz

**Tabla 9. Valores de las variables cualitativas**

Callo	Raíz
No hay presencia de callos	No hay presencia de raíz
Hay presencia de callos	Hay presencia de callos

NC: No hay callos; SC: Hay Callos; NR: No hay Raíz; CR: Hay Raíz

**Fuente:** Elaboración propia.

### 3.6. ANALISIS ESTADISTICOS

En las investigaciones donde se aplican técnicas de cultivo de tejidos, generalmente se emplea el diseño completamente al azar (DCA), puesto que el material experimental empleado es homogéneo (por ejemplo se puede determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemos, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.) (Hurtado, 1994).

La presente investigación fue conducida con un diseño completamente al azar (DCA), a un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . La comparación entre medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Tukey al 95 % de confianza.

### 3.6.1. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACIÓN

En el caso de los resultados de los tratamientos de desinfestación, las evaluaciones se realizaron considerando la contaminación y sobrevivencia porcentual de los explantes de Mashua negra.

### 3.6.2. TRATAMIENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO

En los casos de las fases de establecimiento y multiplicación se realizó el análisis de varianza a un nivel de significancia del 95% y en los resultados donde se encontró diferencia significativa se sometieron a una prueba no paramétrica de Tukey.

Para las variables, número de hojas y número de brotes se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 95%.

Para el caso de presencia de callo y presencia de raíz las evaluaciones fueron en manera porcentual (Tabla 9).

El análisis estadístico del presente trabajo se llevó a cabo con el software estadístico Infostat versión 2016.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. DESINFESTACIÓN DE EXPLANTES

En esta primera parte de la investigación se probaron tres tratamientos para desinfestar los explantes de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua Negra). El establecimiento de los explantes se realizó durante los meses de verano, como menciona Corrales (2017), en el cultivo *in vitro* de explantes en la estación previa y/o posterior al invierno, se reporta una mayor efectividad de los tratamientos de desinfestación.

En esta etapa hay que considerar que las yemas se encuentran en contacto directo con el suelo y ambiente, la misma que favorece que el tejido este más expuesto a agentes contaminantes dificultando de esta manera la total eliminación de los microorganismos. Al respecto Sánchez (2004) mencionan que los tejidos vegetales y su contacto directo con el suelo inducen una alta contaminación de los explantes. Los resultados obtenidos luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 10, 11 y figuras 8, 9 y 10.

##### 1.1. CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES

Se consideró a los explantes de Mashua negra como contaminados cuando estos han sido atacados por hongos o bacterias. Los agentes pueden aparecer en la misma yema, en el tallo o en la superficie del medio, indicando que el tratamiento empleado no fue efectivo para eliminar los contaminantes.

**Tabla 10. Porcentaje de contaminación y desinfestación de explantes de Mashua negra**

Tratamiento	% Contaminación	% Desinfestación
T1	33	67
T2	25	75
T3	8	92

**Fuente:** Elaboración propia.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 10 y la Figura 8, el tratamiento que presenta menor porcentaje de contaminación es el T3, que consistió en el uso de alcohol de 70° por 30 segundos, un enjuague con agua destilada estéril y fueron transferidos a un frasco estéril con 250 mL de Hipoclorito de sodio al 1.5% por 5 minutos. Finalmente se enjuagó los explantes cuatro veces con agua destilada estéril.

Puede observarse también que T1 y T2 tuvieron un menor éxito en la desinfestación de los explantes nodales de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra). El primero presentó 33 % de contaminación y el segundo poco más de 25%, todo parece indicar que el T3 es el mejor; pero como se expondrá a continuación los resultados de sobrevivencia. Nos ayudaran más adelante a elegir cual es el mejor tratamiento en la fase de establecimiento *in vitro* de la Mashua negra.

Los agentes patógenos observados durante las evaluaciones fueron hongos y bacterias. Cabe resaltar que los hongos fueron los que contaminaron con mayor frecuencia los explantes de Mashua negra.



**Figura 8. Tasa de desinfestación de T1, T2 y T3**

**Fuente:** Elaboración propia.

Con estos resultados parciales se observa que la concentración de Hipoclorito de sodio y el tiempo de exposición de los explantes de Mashua negra al mismo, influyen directamente en la disminución de la contaminación. El uso de Hipoclorito de sodio ayuda para controlar la presencia de hongos y bacterias. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los explantes empleados fueron tejidos jóvenes. Aun así hubo contaminación y puede deberse a varios factores como hongos y bacterias innatos a la planta.

En un estudio realizado por Zevallos (2009) se reportó en la desinfección de yemas de Marigold, que el mejor tratamiento resultó ser aquel que consideraba un menor tiempo de desinfección con Hipoclorito de sodio al 3.12 %. Dos de los cinco tratamientos propuestos en ese ensayo, consideraban mayor tiempo de remojo en Hipoclorito al 3.12%; y en ninguno de los dos casos se obtuvo una respuesta de limpieza de explantes favorables sino producía la muerte de los explantes empleados, lo cual es desventajoso en el establecimiento *in vitro*.

Fairlie et al. (1999) utilizó diferentes tratamiento en la introducción de Raíces y Tubérculos Andinos, con tiempos de desinfección (10 y 15 minutos) con Hipoclorito de Calcio al 0.5% en el establecimiento *in vitro* de *Arracacia xaniborbiza*, y muestra hasta un 83% de desinfección y mayor sobrevivencia de explantes.

La concentración de Hipoclorito de sodio del T3 se encuentra dentro del rango propuesto por Roca y Mrogrinski (1991) que mencionan que el Hipoclorito de sodio en concentraciones de 1 % a 3% es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante; y no produce lesiones profundas en los tejidos vegetales debido a su acción blanqueadora en los explantes de muchas especies vegetales.

Como se puede observar en la Tabla 6 y la Figura 9 el porcentaje de contaminación en el T1 es relativamente alto, al ser de 33%. Lo ideal sería llegar a tener un protocolo con el que se pueda obtener menos del 5% de contaminación o si es posible 0%. Como mencionan Ramírez et al. (2011) la contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro*. Fairlie et al. (1999) también mencionan que el cultivo *in vitro* de Raíces y Tubérculos Andinos empleando yemas axilares, apicales o segmentos nodales, presentan un alto grado de contaminación afectando la

micropropagación durante la fase de establecimiento, pero superada esta fase se logra obtener un protocolo de desinfestación para las diversas Raíces y Tubérculos Andinos.



**Figura 9. Explantes de Mashua negra, A: explante contaminado con bacteria, B: explante vivo, C: explante muerto; a la 2 semana de ser introducidas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

## 1.2. SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES

Como se explicó en el punto 1.1. no solo reducir el porcentaje de contaminación es importante, hay que tener en cuenta la sobrevivencia de los explantes de Mashua negra, ya que se puede tener un elevado porcentaje de desinfestación como los obtenidos con

el T3 pero como se reporta los resultados a continuación fue el tratamiento que tuvo mayor número de explantes muertos.

En la Tabla 11 y Figura 10 se pueden observar los resultados obtenidos para la sobrevivencia de explantes en la introducción de Mashua negra al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos de los tratamientos, son aquellos que han sido desinfectados y mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse en el medio de cultivo.

**Tabla 11. Porcentaje de Sobrevivencia de explantes de Mashua negra**

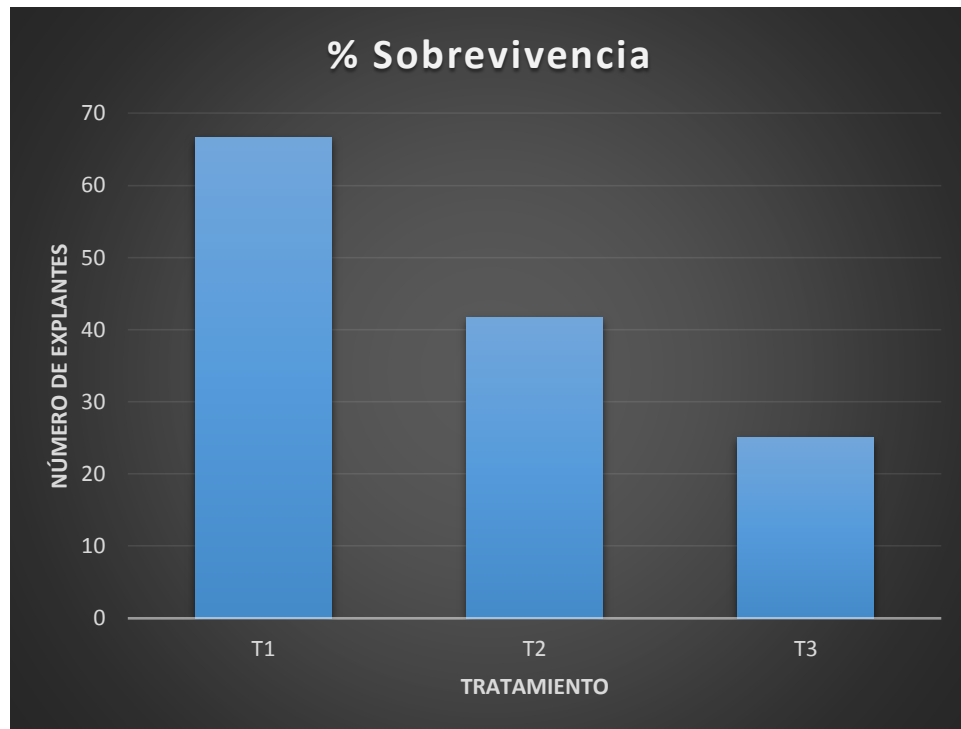
Tratamiento	N° Explantes vivos no contaminados (sobrevivientes)	% Sobrevivencia
T1	8	67
T2	5	42
T3	3	25

**Fuente:** Elaboración propia.

Como se observa en la Tabla 11 y Figura 10, el T1 fue el que presentó mayor sobrevivencia de explantes, al presentar un mayor número de explantes vivos. Este tratamiento consistía en la exposición de los explantes a alcohol de 70° durante 30 segundos e Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos. Finalmente se enjuagó los explantes de Mashua negra cuatro veces con agua destilada estéril.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la necrosis de los tejidos vegetales de Mashua negra ocasionados por el hipoclorito de sodio, además de la contaminación por hongos y bacterias.

La exposición a Hipoclorito de sodio (NaOCl) afecta el desarrollo del explante, causando la necrosis y su muerte. Esto se debe a la capacidad de toxicidad causada por el producto desinfectante a nivel de la célula vegetal (Zevallos, 2009).



**Figura 10. Porcentaje de Supervivencia de explantes de Mashua negra por tratamiento**

**Fuente:** Elaboración propia.

También se puede mencionar que la Mashua negra ha obtenido un resultado de supervivencia aceptable en T1 y T2, a pesar de que los explantes han estado expuestos a 5 y 10 minutos con la misma concentración de Hipoclorito de sodio. Es decir que se podría seguir experimentando con concentraciones más bajas como 0.5% por ejemplo para disminuir la muerte de los Explantes de Mashua negra, ya que con los resultados obtenidos al aumentar la concentración estos se necrosan al ser tejidos blandos y jóvenes.

Los resultados obtenidos en supervivencia de explantes, difieren en los tratamientos y resultados presentados por Fairlie et al. (1999), en donde se usó Hipoclorito de calcio al 0.5% y Tween 20 por 10 minutos, los resultados del presente trabajo se asemejan ya que al emplear un desinfectante a baja concentración se logra una mayor supervivencia de explantes de Mashua negra.

Otro factor que puede influenciar en la sobrevivencia de explantes de Mashua negra es la edad del explante. Marulanda et al. (2005) evaluaron la edad fisiológica de las yemas y obtuvieron que las yemas más jóvenes mostraron menos porcentaje de brotación que las yemas del tercio medio y basal. Por esa razón, en este trabajo se usaron yemas de la parte media de ramas primarias de Mashua negra, con la intención de que la sobrevivencia y desinfestación fuera mayor en los tres tratamientos. Sin embargo sólo se logró una sobrevivencia mayor y aceptable con T1.

Luego de este análisis y los resultados obtenidos, con T1 se obtuvo una mayor cantidad de Explantes de Mashua negra limpios y vivos, por eso se escogió este tratamiento como el mejor para introducir los segmentos nodales de Mashua negra.

## **2. ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE MASHUA NEGRA**

Los nutrientes y minerales son los componentes básicos del cultivo de tejidos vegetales. Determinan cuán rápido crecerá el tejido vegetal utilizado y la respuesta morfológica de este, se verán fuertemente influenciados por la concentración de los nutrientes que se les suministren al medio de cultivo. Además, la elección de un medio de cultivo depende principalmente de la especie a ser trabajada, del tipo de tejido vegetal u órgano vegetal a ser cultivado y del propósito del experimento (Dodds y Roberts, 1995).

Al no existir estudios recientes del cultivo *in vitro* en esta especie, es importante probar con medios de cultivo relacionados a otros tubérculos para determinar su eficiencia con los explantes de Mashua negra.

Durante cuatro semanas se evaluó el comportamiento de los explantes de Mashua negra de segmentos nodales en los tres diferentes tratamientos: M1, M2 y M3. Aplicando el tratamiento de desinfestación T1 se prepararon explantes de Mashua negra para el ensayo de medio de cultivo, obteniéndose un mejor resultado que en los anteriores ensayos de desinfestación

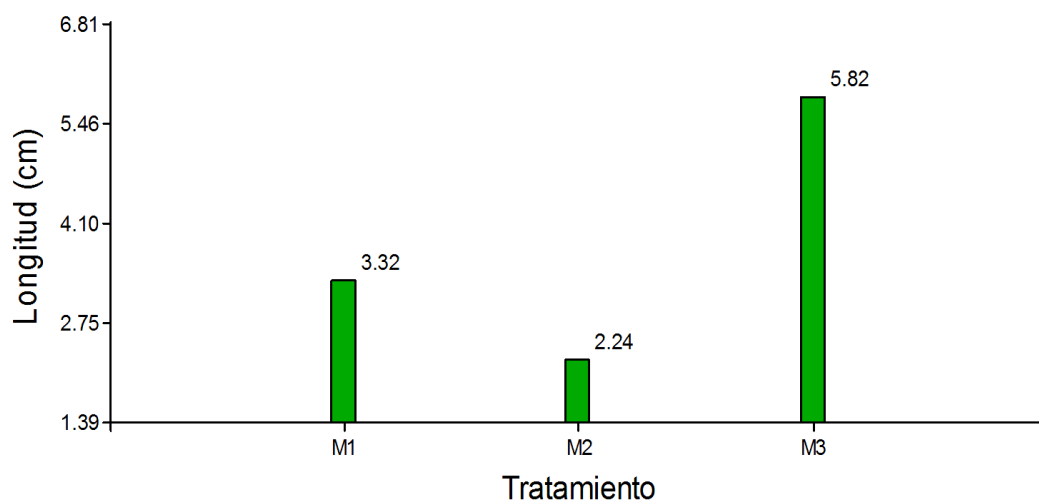
Para cada uno de los análisis estadísticos de las variables evaluadas se utilizaron los datos de la última evaluación realizada. Los resultados (Anexo 1, Anexo 2, Anexo 3)

para longitud del explante, número de hojas y número de brotes se muestran a continuación.

## 2.1. LONGITUD DEL EXPLANTE

Los resultados obtenidos respecto a la longitud de los explantes de Mashua negra, como se observa en la Figura 11, el medio basal de Murashige y Skoog modificado (M3), fue el medio de cultivo en el que se obtuvo la mayor altura de explantes de Mashua negra. Seguido del tratamiento M1, que consistió en probar las sales completas y sin modificaciones del medio MS. Por último, el medio MS  $\frac{1}{2}$  (M2) presentó el promedio más bajo de elongación de explantes de Mashua negra. Los resultados obtenidos y presentados en esta investigación presentan promedios de longitud de vástagos que van desde 2.24 cm y 5.82 cm.

**Longitud Promedio de Explantes de Mashua negra por Tratamiento**



**Figura 11. Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes de Mashua negra por tratamiento M1, M2 y M3**

**Fuente:** InfoStat.

En la Tabla 12 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los explantes de Mashua negra. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que sí hay una diferencia

significativa entre los tres tratamientos probados en esta fase de la investigación. Entonces por lo menos uno de los medios de cultivo es diferente al resto.

**Tabla 12. ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III)**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud	30	0.94	0.93	10.85

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	67.44	2	33.72	198.97	<0.0001
Columnal	67.44	2	33.72	198.97	<0.0001
Error	4.58	27	0.17		
Total	72.02	29			

**Fuente:** InfoStat.

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados:

**Tabla 13. Prueba de Tukey para longitud de explantes de Mashua negra**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna2	30	0.94	0.93	10.85

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.45648**

Error: 0.1695 gl: 27

Columnal	Medias	n	E.E.	
M2	2.24	10	0.13	A
M1	3.32	10	0.13	B
M3	5.82	10	0.13	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)*

**Fuente:** InfoStat.

Con estos resultados obtenidos, los tratamientos M1, M2 y M3 son diferentes. Viendo las medias, el tratamiento M3 sí difiere de los otros tratamientos al ser mayor que el tratamiento M1 y M2. Esto sugiere que la composición de los medios MS y MS/2 no

son óptimas para un buen crecimiento de los explantes de Mashua negra en comparación a medio M3 que si presenta un buen crecimiento de los explantes de Mashua negra al cabo de 4 semanas (Figura 12).

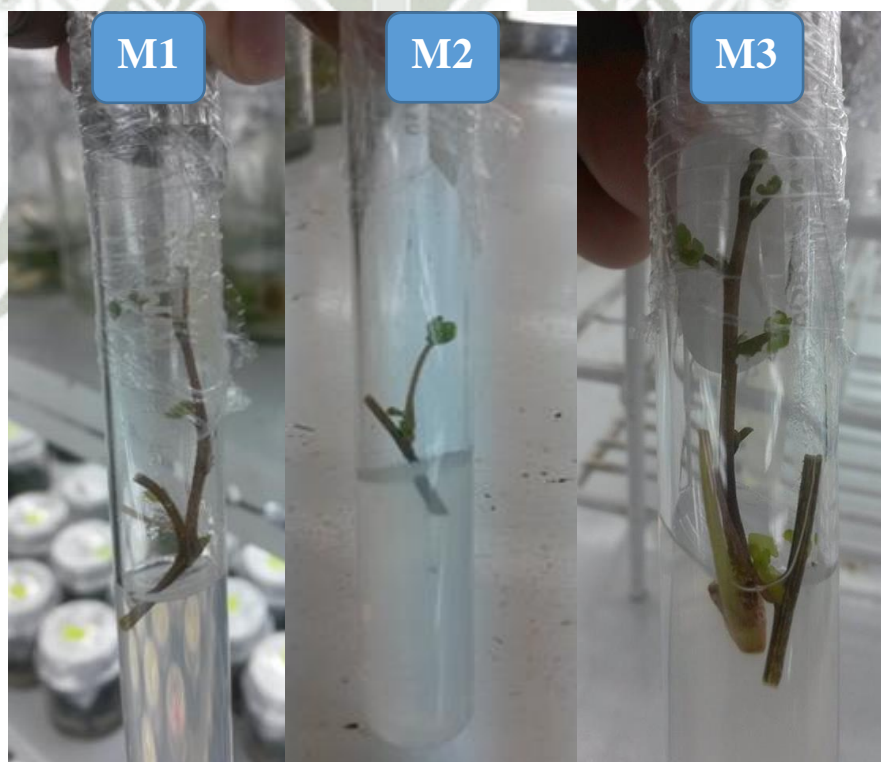
Los resultados obtenidos en este trabajo, son diferentes a los obtenidos por Fairlie et al. (2006). quienes al evaluar en diferentes medios basales (MS y Gamborg B5) para la especie *Arracacia xanthorrhiza* los explantes no lograron superar los 1.31 cm en comparación a los obtenidos en esta investigación con el medio M3 esta variable longitud de explantes fue muy superior aproximadamente 4 veces.

Por otro lado, Tapia (1990) quien trabajó con esta especie evaluando la conservación en distintos medios de cultivo basales sí encontró una diferencia estadística entre las alturas promedios de los explantes regenerados luego del periodo de conservación. En sus resultados, los explantes nodales de *Tropaeolum tuberosum* alcanzaron alturas promedio de 22.67mm, siendo superado este tamaño por los obtenidos en la presente investigación.

La longitud promedio de los explantes de Mashua negra obtenida en medio M3, nos indica que aparentemente esta especie no requiere necesariamente de reguladores de crecimiento para la elongación, ya que los brotes empiezan a elongar al cabo de 4 días después de su introducción. Asimismo, parece que al aumentar la cantidad de nitrógeno y potasio, como en el caso del M1, o disminuirla, como en el caso del M2, se perjudica la elongación de la yema. En la investigación realizada por Tapia (1990), los explantes de *Tropaeolum tuberosum* sembrados, en algunos tratamiento no llegaron a longitudes superiores a 0.5cm. Estos resultados complementan la idea de que para la Mashua negra, la modificación de los componentes en el medio de cultivo favorece el crecimiento de los explantes de Mashua negra.

Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), condujeron experimentos donde se omitían ciertos nutrientes de los medios de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales y encontraron que al omitir nitrógeno, potasio, fósforo, hierro y cloro el crecimiento del explante se redujo enormemente.

El medio M1 y el medio M3, presentan una alta proporción de amonio y la cantidad de nitrógeno total es mucho más alta que en otros medios de cultivo. Para algunos cultivos, la cantidad total de nitrógeno es perjudicial y el balance entre las dos formas de nitrógeno (nitrato y amonio) no es el óptimo (George et al., 2008). En consecuencia, la disminución de nitrógeno en el medio M2 podría haber inhibido ciertas rutas metabólicas perjudicando la elongación del explante de Mashua negra. Por el contrario, el nitrógeno en el medio M3, parece afectar de manera positiva y en mejor proporción el crecimiento del explante de Mashua negra. Respecto al medio M2, al tener la mitad de nitrógeno total que el medio MS completo, los explantes crecieron en promedio dos centímetros menos en la misma cantidad de tiempo que lo hicieron aquellos que se sembraron en el medio M1 y M3, sin embargo esto no indica que el M2 sea un mal medio basal para Mashua negra, simplemente los explantes crecerán más lento que en el medio M1 y M3.



**Figura 12. Diferencia de Longitud de tallo de plantas de Mashua negra en medio M1, M2 y M3 a las cuatro semanas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

## 2.2. NÚMERO DE HOJAS

Para esta variable se empleó la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis para analizar los resultados respectivos al número de hojas por tratamiento probado.

**Tabla 14. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas**

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Columnal	N	Medias D.E.	Medianas	H	p
Número hojas M1		10	2.60 0.52	3.00	20.60	<0.0001
Número hojas M2		10	2.10 0.57	2.00		
Número hojas M3		10	5.20 0.63	5.00		

Trat.	Medias	Ranks	
M2	2.10	8.30	A
M1	2.60	12.70	A
M3	5.20	25.50	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Fuente:** InfoStat.

De acuerdo a la Tabla 14 y Figura 13, los tratamientos muestran diferencia estadística significativa debido a que el valor de p resultó ser menor que 0,05. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula que dice que todos los tratamientos son iguales.

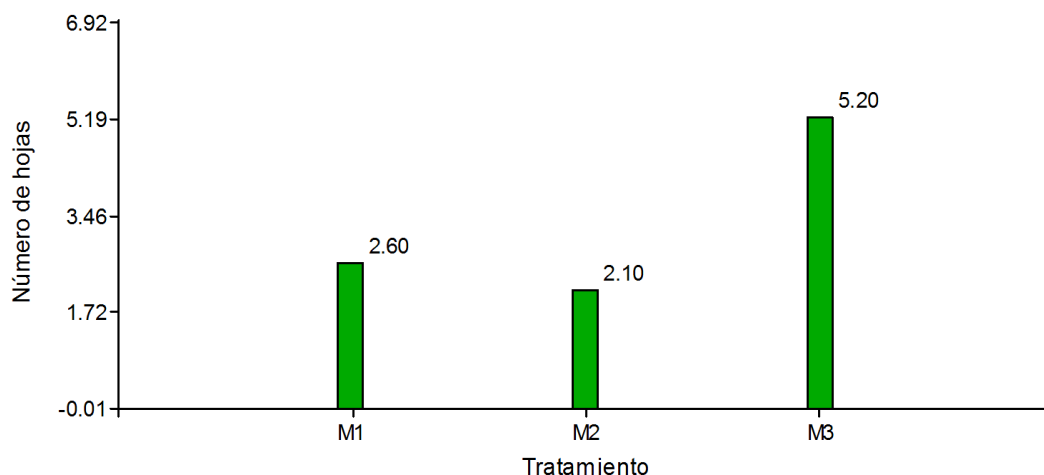
Al realizar la comparación con las medias el tratamiento M3 es el único diferente ya que el M1 y M2 son similares

**Tabla 15. Resultados de promedio de hojas de Mashua negra por tratamiento**

Tratamiento	Numero de vitroplantas	Promedio número de hojas
T1	10	2.6
T2	10	2.1
T3	10	5.2

**Fuente:** Elaboración propia.

### Promedio Número de Hojas por Tratamiento



**Figura 13.** Gráfico de barras de promedio de hojas de explantes de Mashua negra por tratamiento M1, M2 y M3

**Fuente:** InfoStat.

El número de hojas puede haberse visto afectado por la falta de reguladores de crecimiento en los tres medios de cultivo. Como se sabe, las hormonas contribuyen a la formación de nuevas hojas y desarrollo de la planta. Es posible que por no haber complementado los medios de cultivo con hormonas, se haya encontrado diferencia significativa entre los tratamientos.

Según Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), el número de hojas producido por el explante se ve afectado por la falta de ciertos minerales. La modificación de los elementos como nitrógeno, fósforo y potasio en la composición de los medios basales reduce el número de hojas.

Se observó también que el desarrollo foliar por explante de Mashua negra fue relativamente rápido. El número de hojas máximo que se observó por explante de Mashua negra durante las evaluaciones fue de 6 y fue en el medio MS modificado (M3).

Tapia (1990) y Torres (1989) no obtuvieron resultados similares en relación al número de hojas producidas por las plántulas de Mashua negra cultivadas *in vitro*. Cabe

recaltar que en ese estudio no se emplearon reguladores de crecimiento en los medios propuestos en comparación a los estudios realizados por estos investigadores.

De acuerdo a la Tabla 15, el mejor promedio en cuanto a cantidad de hojas se refiere, se obtuvieron con el medio el M3, con un promedio de 5.2 hojas por explante. La composición del medio de cultivo M3 favorece el desarrollo de hojas en plántulas *in vitro* de Mashua negra, ya que su concentración en macrosales es mayor a comparación del medio M2.

### 2.3. NÚMERO DE BROTES

De la misma forma que para la variable número de hojas. Para esta variable también se empleó la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis para analizar los resultados respectivos al número de brotes por tratamiento probado.

**Tabla 16. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de brotes de Mashua negra**

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Columnal	N	Medias D.E.	Medianas	H	p
Número brotesM1		10	2.90 0.57	3.00	21.68	<0.0001
Número brotesM2		10	2.20 0.42	2.00		
Número brotesM3		10	5.30 0.67	5.00		

Trat.	Ranks	
M2	7.40	A
M1	13.65	A
M3	25.45	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Fuente:** InfoStat.

Al cabo de cuatro semanas y las evaluaciones realizadas. El análisis estadístico respecto a número de brotes de cada vitroplanta de Mashua negra Tabla 16 y Figura 14, determina que hay diferencia significativa entre al menos un tratamiento lo que indica que entre los resultados obtenidos, el valor p es mayor que 0.05.

Así mismo en el Tabla 17 se muestran las medias de número de brotes de vitroplanta de Mashua negra. Según esta prueba estadística con el nivel de significancia de 0.05 las medias que presentan la misma letra no son significativamente diferentes, como se

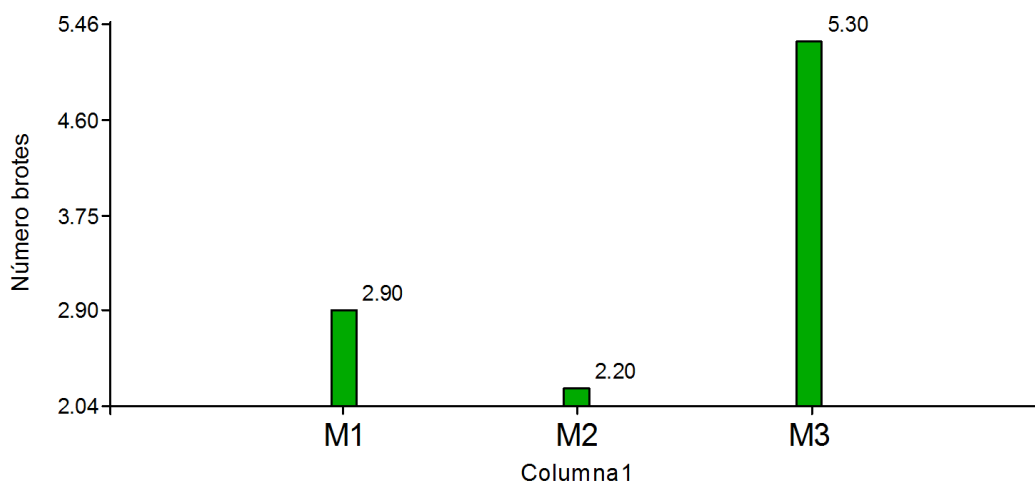
aprecia el tratamiento M3 difiere del resto ya que el tratamiento M1 y M2 son similares.

**Tabla 17. Resultados de promedio de brotes de Mashua negra por tratamiento**

Tratamiento	Numero de vitroplantas	Promedio número de brotes
T1	10	2.9
T2	10	2.2
T3	10	5.3

**Fuente:** Elaboración propia.

**Promedio Número de brotes por Tratamiento**



**Figura 14. Gráfico de barras de promedio de brotes de explantes de Mashua negra por tratamiento en el establecimiento**

**Fuente:** InfoStat.

Sin embargo (Figura 15), el desarrollo de los brotes en una vitroplanta de Mashua negra fue diferente por el M3 (MS modificado + pantotenato de calcio 2ppm + Arginina HCl 4ppm + AG3 1ppm + PPM 2ppm + sacarosa 30g/L + 7g/L de agar) es el único que obtuvo mejores resultados respecto al número de brotes por vitroplanta (5.3) frente al resto de los tratamientos evaluadas después de 30 días de cultivo. Mientras que M2 y M1 presentaron vitroplantas de Mashua negra con menor cantidad

de brotes por vitroplanta (2.2 y 2.9 respectivamente), mostrando que la formulación no es el adecuada para el establecimiento *in vitro* de Mashua negra.



**Figura 15. Explante de Mashua negra obtenida por el tratamiento M3 después de cuatro semanas en incubación**

**Fuente:** Elaboración propia.

#### **2.4. ELECCIÓN DEL MEDIO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE MASHUA NEGRA**

Por los resultados y el análisis de los mismos en el presente trabajo, los explantes de Mashua negra se comportaron mejor y obtuvieron mejores resultados organolépticamente y cuantitativamente; apoyados en el análisis estadístico empleado, para las variables longitud de explantes, número de hojas y número de brotes, el medio M3, propuesto en la presente investigación obtuvo mejores resultados que los medios M1 y M2.

Durante el tiempo de evaluación del crecimiento de explantes de Mashua negra en la fase de Establecimiento, se observó que de las microplántulas demoran un poco más en brotar en los medios de cultivo M1 y M2. Pero, en el medio M3; por el contrario, la respuesta de los explantes de Mashua negra fue más rápida. Por de ello, los explantes de Mashua negra en el medio M3 llegaron a obtener de más de 6 cm de tamaño, con un promedio de 5.2 hojas por plántula y con un promedio de 5.3 brotes de Mashua negra. Por estas razones y los resultados de la estadística aplicada en la investigación, se eligió al medio M3 compuesto por (MS modificado + Pantotenato de calcio 2ppm + Arginina HCl 4ppm + AG3 1ppm + PPM 2ppm + Sacarosa 30g/L + 7g/L de Agar) para la fase de establecimiento de explantes nodales de Mashua negra.

### **3. MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE MASHUA NEGRA**

Luego del establecimiento *in vitro* de Mashua negra, la siguiente fase en la micropropagación de los explantes, es la fase de multiplicación. Esta es una de las fases más importantes para la propagación *in vitro* porque es en esta donde se le da más importancia al número de nuevos brotes; ya que al obtener una mayor número de los mismos se podrán obtener una mayor cantidad de las nuevas plántulas *in vitro* de Mashua negra.

En esta prueba del trabajo de investigación de medios de multiplicación para la especie Mashua Negra, también se evaluaron el número de brotes, número de hojas, longitud del explante, presencia de callo y presencia de raíz. En esta prueba si se usó fitohormonas, para observar cómo influyen los distintos reguladores de crecimiento en el desarrollo y crecimiento de los explantes de Mashua negra. Como se mencionó anteriormente el parámetro más importante en esta prueba es el número de brotes que crecen por explante, pero no solo es importante el mayor número sino también la morfología de la planta, no sirve tener varios brotes si la planta presenta una morfología anormal; en la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados (Anexo 4, Anexo 5, Anexo 6, Anexo 7) en la multiplicación *in vitro* de Mashua negra.

### 3.1. NÚMERO DE BROTES

Para esta variable se probó cuatro tratamientos, el MM1 fue considerado como testigo, para poder evidenciar la diferencia respecto a el establecimiento de Mashua negra, cabe resaltar que presenta la composición del tratamiento 3 en el establecimiento *in vitro* de Mashua negra. Los resultados obtenidos en esta prueba fueron analizados estadísticamente con la Prueba de Kruskal Wallis, al igual que en el establecimiento *in vitro*; los resultados mostraron, que existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, en la Tabla 18 y Figura 16 se puede ver, que MM2 y MM3 no son significativamente diferentes, sin embargo el medio MM1 y MM4 si presentan una diferencia significativa ya que el valor de  $p$  es menor al 0.05. Además durante el mes de permanencia de los explantes en los medios de cultivo de multiplicación, se pudo observar que el MM2 (MS modificado + BAP 2mg/L + PPM 2mg/L) y MM3 (MS modificado + 1mg/L de Ácido fólico + 4mg/L de Arginina HCl + 2mg/L de Pantotenato de Ca + 2ml/L de PPM), tuvieron un mayor efecto en el rendimiento de nuevos brotes y buena morfología de plantas. Generando hasta 9 brotes por explante, a pesar que el medio MM4 presenta mucho mayor cantidad de brotes hasta 15, las vitroplantas de Mashua negra presentan tallos muy delgados y hojas pequeñas, lo cual representa un gran desventaja, ya que al multiplicar este tipo de vitroplantas, complica el trabajo en cámara y además las vitroplantas nuevas crecen con tallos muy débiles lo cual representa una gran desventaja en la propagación *in vitro* de Mashua negra.

**Tabla 18. Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes de Mashua negra en medios de multiplicación**

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número brote	MM1	10	5.60	0.52	6.00	32.95	<0.0001
Número brote	MM2	10	7.70	0.82	7.50		
Número brote	MM3	10	7.80	0.79	8.00		
Número brote	MM4	10	13.70	1.06	13.50		

Trat.	Ranks	
MM1	5.50	A
MM2	20.10	B
MM3	20.90	B
MM4	35.50	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Fuente:** InfoStat.

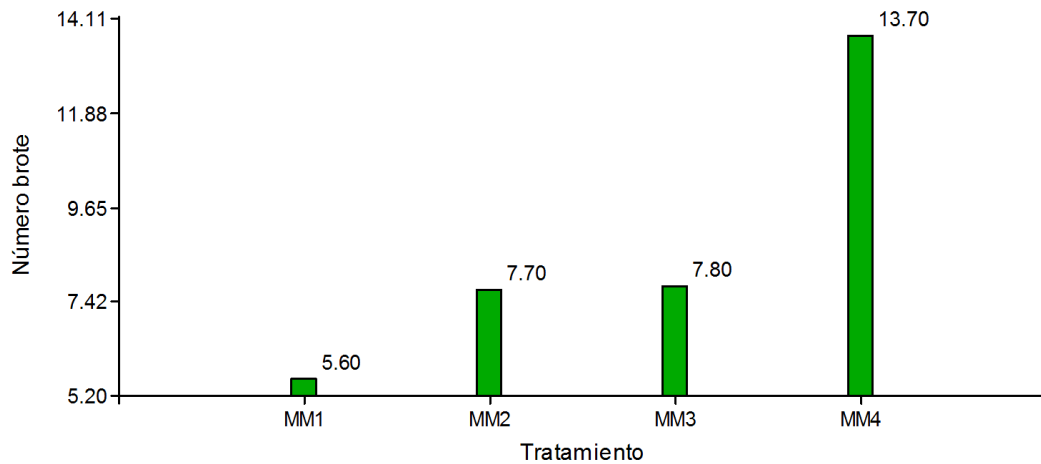
Fairlie et al. (1999), trabajando con la especie *Arracacia xanthorrhiza* con cuatro distintas concentraciones de BAP (0.7, 1.4, 2.8 y 5.6 mg/L), encontraron que el efecto de la concentración de la citoquinina BAP a 5.6 mg/L con 10 semanas de evaluación, fue la mejor para la formación de nuevos brotes con promedios de 2.4 y 2.6 por explante tiene una correlación positiva. Altas concentraciones de esta fitohormona inducen al desarrollo de nuevos brotes laterales, esto se comprueba con los resultados obtenidos con la Mashua negra a concentración de 2ppm se logra obtener un buen desarrollo de brotes, pero en el caso del MM4 al agregar ANA no conduce a buenos resultados si bien se tiene un mayor número de brotes, las características fenotípicas no son adecuadas además inducen a formar callos, que no comparten una relación con los objetivos de la presente investigación.

**Tabla 19. Promedio de brotes por explante de Mashua negra por tratamiento**

Tratamiento	Numero de repeticiones	Número de brotes promedio por repetición.
MM1	10	5.6
MM2	10	7.7
MM3	10	7.8
MM4	10	13.7

**Fuente:** Elaboración propia

**Número promedio de brotes por Tratamiento**



**Figura 16. Gráfico de barras de promedio de brotes de explantes de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación**

**Fuente:** Infostat.

Como se puede apreciar en la Tabla 19, el medio MM2 y MM3 son similares, ya que resultaron ser los más adecuados para la multiplicación de los explantes de Mashua negra, obteniendo un promedio de 7.7 y 7.8 brotes por repetición. Pero si embargo en la presente investigación se observó que la morfología en el medio MM3 no fue adecuada los tallos crecieron de manera muy delgada y débil a comparación de MM2 que fueron más turgentes; por consiguiente este medio conformado por sales de MS modificadas y 2 mg/l de BAP fue el mejor para la multiplicación de Mashua negra ver Figura 17 y Figura 18 para notar las diferencias fenotípicas de los tratamientos MM2 y MM3.



**Figura 17. Explante de Mashua negra obtenida por el tratamiento MM2 después de cuatro semanas en incubación**

Fuente: Registro de la Investigación.



**Figura 18. Explantes de Mashua negra obtenidas por el tratamiento MM3 después de cuatro semanas en incubación**

Fuente: Registro de la Investigación.

En otro estudio para la especie *Tropaeolum tuberosum* hecho por Tapia (1990), se obtuvo que el mejor resultado para el número de brotes fue de 5.17 brotes por explante, similares a los obtenidos por el tratamiento MM1 y claramente superados por los demás tratamientos estudiados en la presente investigación.

En el medio MM2 se utilizó la siguiente concentración de la fitohormona: 2mg/L de BAP. A pesar que el tratamiento MM4 presenta en su composición BAP, este medio superó en los resultados obtenidos al MM2 respecto a número de brotes de explantes de Mashua negra. También como se reportó anteriormente su morfología no es la adecuada para realizar micropropagación. Se ve que la interacción entre las hormonas BAP, ANA y los nutrientes del medio fueron favorables para del explante, como se explicara a continuación se evidencio la formación de callos, la cual sería una causa del crecimiento no turgente y débil de los explantes de Mashua negra.

Mudoj et al. (2013) mencionan que de las citoquininas, 6-benzylaminopurina (BAP), ha sido efectiva para inducir la producción de brotes en varias especies, lo cual indica que guarda estrecha relación con los resultado obtenidos en la presente investigación al emplear la fitohormona BAP induce a formar brotes y al aumentar su concentración el número de brotes aumenta.

### **3.2. NÚMERO DE HOJAS**

Para esta variable se empleó la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis para analizar los resultados respectivos al número de hojas por tratamiento probado en la fase de multiplicación *in vitro*.

**Tabla 20. Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas en la multiplicación de Mashua negra**

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Número hojas	MM1	10	5.40	0.52	5.00	26.24	<0.0001
Número hojas	MM2	10	7.50	0.71	7.00		
Número hojas	MM3	10	7.40	0.70	7.00		
Número hojas	MM4	10	5.80	0.79	6.00		

Trat.	Ranks	
MM1	9.10	A
MM4	13.20	A
MM3	29.35	B
MM2	30.35	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Fuente:** InfoStat.

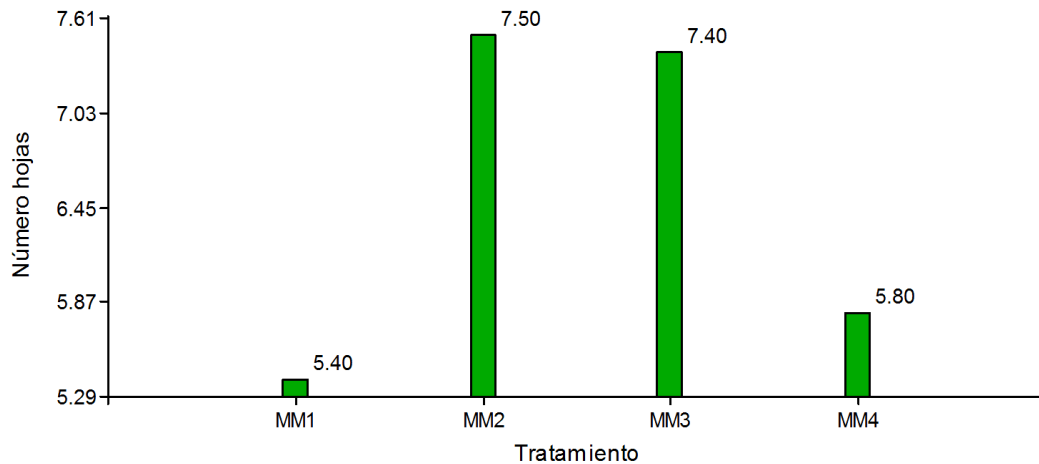
De acuerdo a la Tabla 20 y Figura 19, los tratamientos MM1 y MM4 no muestran diferencia estadística significativa (Anexo 9) debido a que el valor de p resultó ser mayor que 0.05. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula que dice que todos los tratamientos son iguales. De la misma manera al realizar la comparación con las medias el tratamiento MM2 y MM3 muestran un valor p mayor a 0.05 (Anexo 8); pero al realizar un análisis de los cuatro tratamiento el valor p si es menor a 0.05 por lo tanto al menos algún tratamiento es diferente ya que el MM1 y MM4 son similares y difieren a los tratamiento MM2 y MM3 (Anexo 10).

**Tabla 21. Resultados de promedio de hojas de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación *in vitro***

Tratamiento	Numero de vitroplantas	Promedio número de hojas
MM1	10	5.4
MM2	10	7.5
MM3	10	7.4
MM4	10	5.8

**Fuente:** Elaboración propia.

**Promedio de Número de hojas por Tratamiento**



**Figura 19. Gráfico de barras de promedio de hojas de explantes de Mashua negra por tratamiento en la multiplicación *in vitro***

**Fuente:** InfoStat.

El número de hojas en MM1 puede haberse visto afectado por la falta de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Como se sabe, las hormonas contribuyen a la formación de nuevas hojas y desarrollo de la planta. Es posible que por no haber complementado los medios de cultivo con hormonas, se haya encontrado diferencia significativa entre los tratamientos.

Según Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), el número de hojas producido por el explante se ve afectado por la falta de ciertos minerales. La modificación de los elementos como nitrógeno, fósforo y potasio en la composición de los medios basales reduce el número de hojas.

Se observó también que el desarrollo foliar por explante de Mashua negra fue relativamente rápido. El número de hojas máximo que se observó por explante de Mashua negra durante las evaluaciones fue de 9 y fue en el tratamiento MM4 donde la morfología de las hojas se vio afectada.

Tapia (1990) y Torres (1989) no obtuvieron resultados similares en relación al número de hojas producidas por las plántulas de Mashua negra cultivadas *in vitro*.

De acuerdo a la Tabla 21, el mejor promedio en cuanto a cantidad de hojas se refiere, se obtuvieron en los medios MM2 y MM3, con un promedio de 7.5 y 7.4 hojas por explante. Además la Figura 20 muestra que la composición del medio de cultivo MM2 favorece el desarrollo de hojas en plántulas *in vitro* de Mashua negra, ya que su concentración en macrosales es mayor a comparación con el tratamiento MM1 y MM4.



**Figura 20. Explantes de Mashua negra obtenidas por el tratamiento MM2 después de cuatro semanas en incubación**

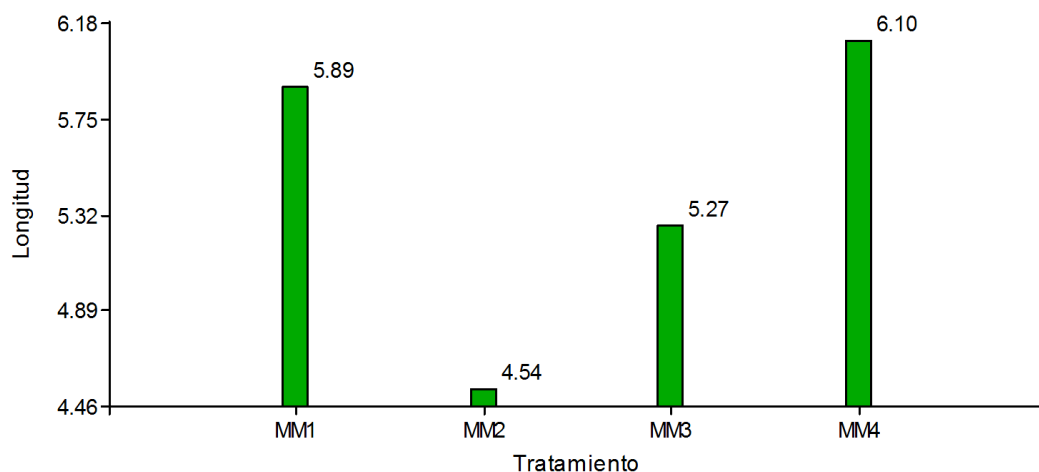
**Fuente:** Registro de la Investigación.

### **3.3. LONGITUD DE EXPLANTES**

En la Tabla 22 se puede ver que para la variable longitud hay una diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. Los resultados obtenidos respecto a la longitud de los explantes de Mashua negra en la fase de multiplicación, fueron analizados con un Análisis de Varianza como se observa en la Figura 21, los promedios de los tratamientos (MM1 y MM4) al ser analizados con la Prueba Tukey 95% muestran similitud, fue el tratamiento MM4 en el que se obtuvo la mayor altura de explantes de Mashua negra con promedio de 6.1cm. Seguido del tratamiento MM1 con

5.89, que consistió en probar un tratamiento libre de fitohormonas. Por último, el tratamiento MM2 presentó el promedio más bajo de elongación de explantes de Mashua negra con 4.54cm. Los resultados obtenidos en la multiplicación *in vitro* de Mashua negra presentados en esta investigación presentan de longitudes que van hasta 6.7 cm. Cabe mencionar que si bien el medio MM2 presento una longitud menor fue el que presento explantes con características fenotípicas buenas y turgentes al momento de ser propagados, si bien el medio MM4 presenta una mayor longitud, también presenta callos, lo cual es desventajoso en esta etapa de la micropropagación donde se requiere que exista un mayor número de brotes para ser multiplicados y de esta forma aumentar de manera exponencial el número de plantas de Mashua negra.

### **Longitud Promedio de Explantes de Mashua negra por Tratamiento**



**Figura 21.** Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes de Mashua negra por tratamiento (MM1, MM2, MM3 Y MM4) en la multiplicación *in vitro*

**Fuente:** InfoStat.

En la Tabla 22 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 30 días de sembrados los explantes de Mashua negra en la etapa de multiplicación *in vitro*. Como el valor de p fue menor a 0.05; esto nos indica que sí hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos probados en esta fase de la investigación. Entonces por lo menos uno de los medios de cultivo es diferente al resto.

**Tabla 22. ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III)**

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Longitud	40	0.71	0.68	7.60

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14.77	3	4.92	28.70	<0.0001
Tratamiento	14.77	3	4.92	28.70	<0.0001
Error	6.17	36	0.17		
Total	20.94	39			

**Fuente:** InfoStat.

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó estadística no paramétrica, empleando la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados (Tabla 23).

**Tabla 23. Prueba de Tukey para longitud de explantes de Mashua negra**

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.49879**

*Error: 0.1715 gl: 36*

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
MM2	4.54	10	0.13	A
MM3	5.27	10	0.13	B
MM1	5.89	10	0.13	C
MM4	6.10	10	0.13	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

**Fuente:** InfoStat.

Con estos resultados obtenidos, los tratamientos MM2, MM3 son diferentes a comparación de los tratamientos MM1 y MM4; que también difieren a los anteriormente mencionados. Viendo las medias el tratamiento MM2 y MM3 sí difieren de los otros tratamientos al presentar letras diferentes en comparación a los tratamientos MM1 y MM4, que poseen letras similares. Esto sugiere que la composición de los tratamiento MM1 y MM4 son óptimas para un buen crecimiento de los explantes de Mashua negra en comparación a medio MM2 y MM3 que presentan

una menor longitud de los explantes de Mashua negra al cabo de 4 semanas, de la misma manera que los resultados obtenidos en los anteriores puntos se observó que los tallos fueron más turgentes en el medio MM2, en comparación al resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son diferentes a los obtenidos por Fairlie et al. (2006). quienes al evaluar en diferentes medios basales (MS y Gamborg B5) suplementados con distintas cantidades de BAP para la especie *Arracacia xanthorrhiza* no lograron superar los 1.31 cm en comparación a los obtenidos en esta investigación con el tratamiento MM2 esta variable longitud de explantes fue muy superior aproximadamente 3 veces.

Por otro lado, Tapia (1990) quien trabajó con esta especie evaluando la conservación en distintos medios de cultivo basales sí encontró una diferencia estadística entre las alturas promedios de los explantes regenerados luego del periodo de conservación. En sus resultados, los explantes nodales de *Tropaeolum tuberosum* alcanzaron alturas promedio de 22.67mm, siendo superado este tamaño por los obtenidos en la presente investigación en la fase de multiplicación *in vitro*.

La longitud promedio de los explantes de Mashua negra obtenida en medio MM2, nos indica que aparentemente esta especie requiere de reguladores de crecimiento para la elongación, ya que los brotes empiezan a elongar al cabo de 4 días después de ser multiplicadas. Asimismo, parece que al aumentar la fitohormona ANA conduce a una formación de callos. En la investigación realizada por Torres (1989), los explantes de *Tropaeolum tuberosum* sembrados, en algunos tratamiento llegaron a formar calllos. Estos resultados complementan la idea de que para la Mashua negra, no necesita de esta fitohormona para la etapa de multiplicación solo necesita BAP en el medio de cultivo para favorecer el crecimiento de los explantes de Mashua negra.

Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), condujeron experimentos donde se omitían ciertos nutrientes de los medios *in vitro* de segmentos nodales y encontraron que al omitir nitrógeno, potasio, fósforo, hierro y cloro el crecimiento del explante se redujo enormemente, con los resultados obtenidos efectivamente las macrosales influyen directamente en el desarrollo vegetativo.

El tratamiento MM1 y MM3, presentan una similitud en los promedios obtenidos pero como se explicara se explicó anteriormente no sirve de nada tener una gran tamaño como en el tratamiento MM4 si la características fenotípicas de los explantes de Mashua negra se ven afectados, se necesita de plantas turgentes para poder multiplicarlas de manera más sencilla de igual forma al ser aclimatadas presentan enormes ventajas a si la planta crece demasiado dificulta su manejo en el invernadero al ser sembradas en sustrato.



**Figura 22. Planta de Mashua negra en medio MM1 a las cuatro semanas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.



**Figura 23. Planta de Mashua negra en medio MM2 a las cuatro semanas**  
**Fuente:** Registro de la Investigación.



**Figura 24. Planta de Mashua negra en medio MM3 a las cuatro semanas**  
**Fuente:** Registro de la Investigación.



**Figura 25. Planta de Mashua negra en medio MM4 a las cuatro semanas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

### **3.4. PRESENCIA DE CALLO**

Como se explicó en el punto 3 en la etapa de multiplicación se evaluó la presencia de callos en los explantes de Mashua negra ya que es importante, con estos se está comprobando los efectos de las fitohormonas empleadas, no es un objetivo de este trabajo generar callos pero se explicara a continuación los resultados obtenidos con los 4 tratamientos empleados.

En la Tabla 24 se pueden observar los resultados obtenidos para la presencia de callos en los explantes en la multiplicación de Mashua negra al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados con presencia de callo, o ausencia de callo generados por los efectos de los tratamientos en el medio de cultivo.

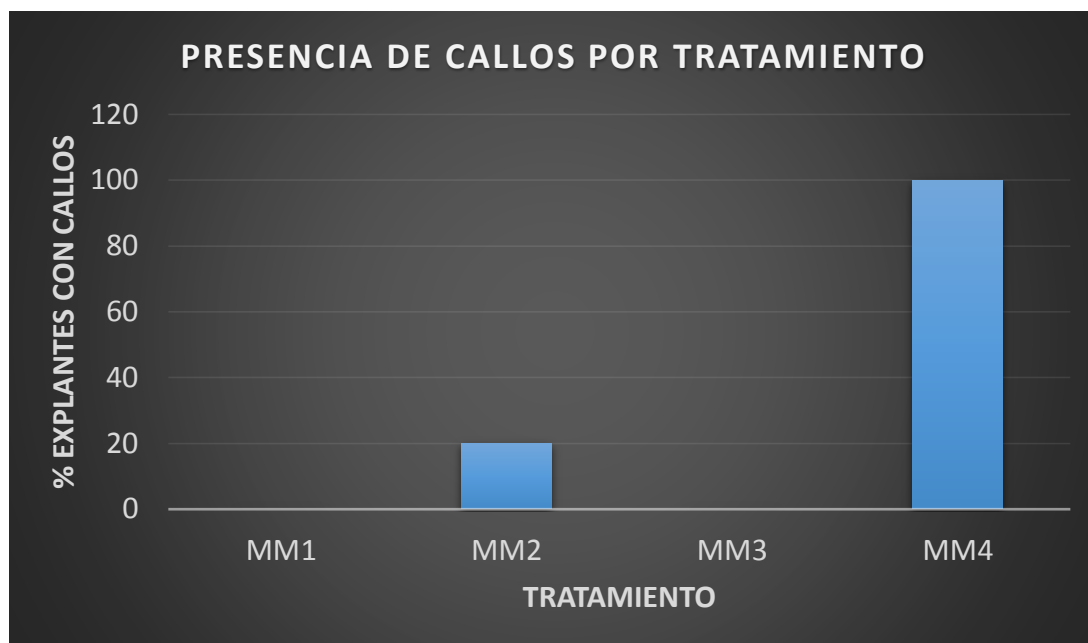
**Tabla 24. Presencia de callos en los explantes de Mashua negra**

Tratamiento	N° Explantes	N° Explantes con presencia de callo	N° Explantes sin presencia de callo
T1	10	0	10
T2	10	2	8
T3	10	0	10
T4	10	10	0

**Fuente:** Elaboración propia.

Como se observa en la figura 26 el tratamiento 4 es el que presenta callos en todas las repeticiones. (Anexo 11), nuestra la predominancia de la no presencia de callos (NC) fue de los tratamientos T1, T2, T3 y mientras que la T4 presentó callos (CC), también con un 100% de presencia de callos respectivamente. En T2 se presentó la presencia de 20% y finalmente en T1 y T3 se presentó un 0% de callos en todas las repeticiones de explante de Mashua negra.

La principal causa de la presencia de callos en explantes de Mashua negra se debe a la fitohormona ANA (Ácido Naftalenacético), como reporta Torres (1989) al agregar al medio concentraciones de 0.5 y 2ppm logro obtener callos de *Tropaeolum tuberosum* lo cual se comprueba en esta investigación ya que en medio MM4 es el único que presenta ANA en su composición.



**Figura 26. Porcentaje de presencia de callos en explantes de Mashua negra por tratamiento**

**Fuente:** Elaboración propia.

También se puede mencionar que la Mashua negra ha obtenido un resultado de presencia de callos Figura 27 con tratamiento 4 se obtuvieron callos al cabo de las 4 semanas que permanecieron en incubación, además la morfología de estos explantes de Mashua negra no es aceptable para la micropropagación ya que presenta tallos débiles lo cual dificulta su multiplicación.



**Figura 27. Callo de Mashua negra en el tratamiento 4 a las cuatro semanas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

Los resultados obtenidos en presencia de callos de explantes de Mashua negra, difieren en los tratamientos y resultados presentados por Torres (1989), en donde se otras hormonas como mejores inductoras a formar callo en *Tropaeolum tuberosum*, en el presente trabajo solo se evidencio presencia de callos en el medio que presenta la fitohormona ANA.

Luego de este análisis y los resultados obtenidos, con el tratamiento 4 se obtuvo una mayor cantidad de callos en los explantes de Mashua, por eso no se recomienda este medio para la fase de multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de Mashua negra.

### 3.5. PRESENCIA DE RAÍZ

Como se explicó en el punto 3 en la etapa de multiplicación se evaluó la presencia de raíz en los explantes de Mashua negra ya que es importante en el cultivo de tejidos sobretodo en la etapa de enraizamiento, con esto se está comprobando los efectos de las fitohormonas empleadas, no es un objetivo de este trabajo generar raíces pero se explicara a continuación los resultados obtenidos con los 4 tratamientos empleados en la fase multiplicación *in vitro*.

En la Tabla 25 se pueden observar los resultados obtenidos para la presencia de raíz en los explantes en la multiplicación *in vitro* de Mashua negra al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados con presencia de raíz, o ausencia de raíz generados por los efectos de los tratamientos en el medio de cultivo.

**Tabla 25. Presencia de raíz en los explantes de Mashua negra**

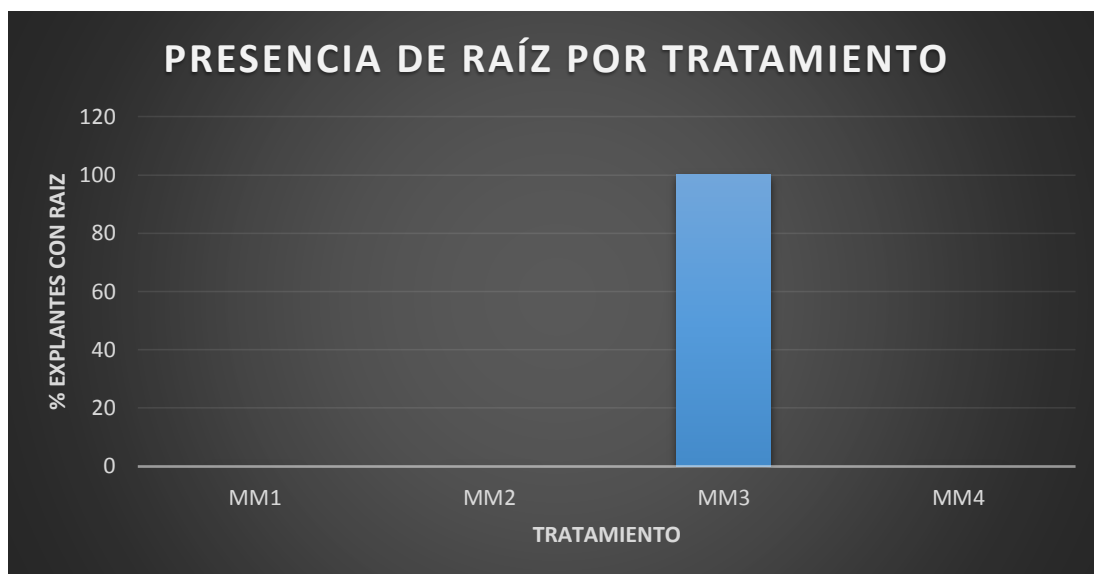
Tratamiento	N° Explantes	N° Explantes con presencia de raíz	N° Explantes sin presencia de raíz
T1	10	0	10
T2	10	0	10
T3	10	10	0
T4	10	0	10

**Fuente:** Elaboración propia.

Como se observa en la Figura 28 el MM3 es el que presenta la raíz en todas las repeticiones. (Anexo 12), nuestra la predominancia de la no presencia de raíz (NR) fue de los tratamientos T1, T2, T4 y mientras que la T3 presentó raíz (CR), también con un 100% de presencia de raíz respectivamente, y finalmente en T1, T2 y T4 se presentó un 0% de raíces en todas las repeticiones de explante de Mashua negra.

La principal causa de la presencia de raíces en explantes de Mashua negra se debe a la temperatura que es un factor importante ya que recordemos que la Mashua negra es un tubérculo y al disminuir la temperatura se empieza a formar raíz para poder formar tubérculos, como reporta Torres (1989) al trabajar a un temperatura de 18°C se formaron raíces de *Tropaeolum tuberosum*, lo cual comprueba que el MM3 donde no

existe la presencia de fitohormonas como raíces en esta investigación a causa de la temperatura.



**Figura 28. Porcentaje de presencia de raíz en explantes de Mashua negra por tratamiento**

**Fuente:** Elaboración propia.

También se puede mencionar que la Mashua negra ha obtenido un resultado de presencia de raíz. Figura 29 con MM3 se obtuvieron raíces en todas las repeticiones a al cabo de las 4 semanas que permanecieron en incubación, además la morfología de estos explantes de Mashua negra es aceptable para la micropropagación *in vitro*.



**Figura 29. Raíz de Mashua negra en el tratamiento MM3 a las cuatro semanas**

**Fuente:** Registro de la Investigación.

Los resultados obtenidos en presencia de raíz de explantes de Mashua negra, difieren en los tratamientos y resultados presentados por Torres (1989), en donde si emplea fitohormonas para inducir a la formación de raíz en *Tropaeolum tuberosum*, en el presente trabajo solo se evidencio presencia de raíz en el medio que presenta una composición diferente y sin presencia de fitohormonas, como se explicó anteriormente en los resultados reportados por el mismo autor la temperatura induce la formación de raíces.

Luego de este análisis y los resultados obtenidos, con MM3 se obtuvo una presencia total en los explantes de Mashua negra, por eso no se recomienda este medio para la fase de multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de Mashua negra, pero si es adecuado para la fase de enraizamiento, que no es un objetivo de la presente investigación.

## CONCLUSIONES

- 1) En la presente investigación se logró obtener un protocolo rápido de establecimiento y multiplicación en micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra) a partir de segmentos nodales.
- 2) Se determinó que el mejor protocolo de desinfestación para el establecimiento *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua negra) se obtuvo sumergiendo los segmentos nodales en alcohol de 70% por 30 segundos y empleando Hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos y finalmente enjuagándolos cuatro veces con agua destilada estéril.
- 3) El mejor medio de cultivo *in vitro* para la etapa de establecimiento fue el medio compuesto por sales de MS modificadas + 2mL/L de ppm + 7.2g/L de agar; que permitió una mayor elongación de la vitroplanta, desarrollándose una diferencia significativa, con una longitud promedio de 5.82cm, un promedio de 5.3 brotes y un promedio de 5.2 hojas además de presentar explantes vigorosos.
- 4) El mejor medio de cultivo *in vitro* para la etapa de multiplicación fue el medio compuesto por sales de MS modificado + 2mg/L de BAP + 2ml/L de ppm + 7.2g/L de agar; que formo plántulas *in vitro* de Mashua negra con características fenotípicas mejores a las obtenidas por el tratamiento MM4 que desarrolla un mayor número de brotes pero el tallo pierde turgencia, además de formar callos; el medio propuesto permitió obtener brotes con un promedio de 7.7 en la vitroplanta, desarrollándose con una longitud promedio de 4.54 cm y un promedio de 7.5 hojas, cabe acotar que el tratamiento MM3 no presenta una diferencia estadística significativa con el MM2, además el medio MM3 indujo la formación de raíz en los explantes, al no ser deseadas en la etapa de multiplicación no fue seleccionado.

## RECOMENDACIONES

- 1- Utilizar PPM (Plant preservative mixture) en los medios de cultivo de establecimiento ayuda a disminuir la contaminación de los explantes.
- 2- Realizar un ajuste de balance en el uso de las fitohormonas, como la aplicación de otras citoquininas así como auxinas en la etapa de multiplicación *in vitro* de esta especie para aumentar la tasa de multiplicación y comprobar si producen mejores resultados que los obtenidos en la presente investigación.
- 3- Desarrollar las siguientes etapas del cultivo de Tejidos vegetales la etapa de enraizamiento y la aclimatación de explantes de Mashua negra; puede tomar como referencia los resultados obtenidos en la investigación ya que se obtuvo raíces.
- 4- Continuar la investigación con otro tipo de explante para su establecimiento *in vitro* de esta forma poder obtener plántulas de mejor calidad para su conservación y producción.
- 5- Realizar pruebas cambiando las condiciones físicas como modificar la temperatura para ver la respuesta de los explantes sobretodo bajar la temperatura para evaluar el comportamiento del explante por ejemplo; ya que es una especie muy susceptible al cambio de temperatura.
- 6- Continuar la investigación con la obtención de microtubérculos, después de superar la fase de enraizamiento, los resultados de la presente investigación se pueden tomar como referencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barba, A; Luna, B y Romero, J. (2001). Micropropagación de plantas. Trillas. Distrito Federal de México. 107.
- Brack, A. (1999). Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos “Bartolomé de las Casas”.
- Camino, A. (1997). Monocultivo y policultivo en las montañas tropicales. Un estudio preliminar en el distrito de Cuyo-Cuyo. Sandía, Puno. 44–50.
- Campos, D; Noratto, G; Chirinos, R; Arbizu, C; Roca, W; Cisneros-Zevallos, L. (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of andean tuber crops: Native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ullucu (*Ullucus tuberosum*), *Journal of the Science of Food and Agricultural*. 86, 1481-1488.
- Calderón, A; Cabrera, R.; Dolorier, T.; Zolla, G. (1995). Métodos asépticos de propagación in vitro. Lab. de fisiología vegetal. UNALM Lima, Perú. 47.
- Cárdenas, M. (1989). Manual de plantas económicas de Bolivia. Editorial Los Amigos del libro. La Paz, Bolivia.
- Casells. (1991). Problems in tissue culture contamination. Micropropagation Technology and Application. Debergh, p.c y r.h. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. USA. 479.
- Caula, A. (2011). Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique and laboratory equipment. In Trigiano. Plant tissue culture, development and biotechnology. 583.
- Collazos, C., Alvistur, E., Vásquez, J., Quiroz, A., Herrera, N., Robles, N. (1996). Tablas peruanas de composición de alimentos. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, Peru.

Corrales, D. (2017). Establecimiento In vitro de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) mediante segmentos nodales de ramas primarias. Tesis Lic. Ing. For. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60.

Cortés, H. (1981). Avances de la investigación en tres tubérculos andinos. Curso sobre manejo de la producción agraria en Laderas. Huaraz. Serie Ponencias, Resultados, Recomendaciones de Eventos Técnicos. Bogotá, Colombia.

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York.

Debergh, P.; Read, P. (1991). Micropropagación. En: Micropropagation Technology and Application. USA. 479.

Debergh, P.; Zimmerman, R. (1991). Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishing. USA. 479.

Dolores, L., S. Espín. (1997). Compuestos cianogénicos en mashuas ecuatorianas. Resúmenes IX congreso de cultivos andinos. Cusco, Perú.

Dorris, M. (2010). What is plant tissue culture. Journal of the Bromeliad Society. 60 (4): 172- 179.

Doods, J. Roberts, L. (1995). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Estados Unidos. 248.

Espinosa, P., Vaca, R., Abad, J. y Crissman, C. (1997). Raíces y tubérculos andinos cultivos marginados en el Ecuador. Situación actual y limitaciones para la producción. Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador.

Fairlie, T., Morales Bermúdez, M., y Holle M. Túpac Yupanqui, A. (1999). Raíces y tubérculos andinos.- Avances en investigación Reducción de pérdidas por almacenamiento para consumo de oca (*Oxalis tuberosa*, ulluco(*Ullucus tuberosus*) y mashua (*Tropaeolum tuberosum*). Lima.

Fairlie, T., Morales Bermúdez, M., Holle, M., Duque, L., y Landuzuri, R. (1999). Raíces y tubérculos andinos.- Avancez en investigación, introducción, micropropagación, conservación in vitro y aclimatación a invernadero de Arracacia Xantharriza. Lima: CIP.

Fairlie, T., Morales Bermúdez, M., Holle, M., Duque, L., y Landuzuri, R. (1999). Raíces y tubérculos andinos.- Avancez en investigación, introducción, micropropagación, conservación in vitro y aclimatación a invernadero de Canna Edilis. Lima: CIP.

George, E.; Hall, M.; De Klerk, G. (2008). Plant propagation by tissue culture. The background. Springer. Dordrecht, Holanda. 504.

Grau, A.; Ortega, D.; Nieto, C.; Hermann, M. (2003). Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma, Italia.

Hawkes, J. (1989). The domestication of roots and tubers in the American tropics. In Foraging and farming (D.R. Harris and B.C. Hillman, eds). Unwin Hyman. London, UK. 481–503.

Hermann, M. y Cruz, P. (1991). Una taxonomía campesina de los años en el Departamento de Cusco. Unpublished.

Hermann, M. (1992). Andean roots and tubers: research priorities for a neglected food resource. International Potato Center. Lima, Peru.

Herrera, F. (1941). Sinopsis de la flora del Cuzco. Vol I. Parte Sistemática. Lima, Peru.

Huaccho, C. (2016). Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón). Lima, Perú.

Instituto de Biotecnología (IBT) (2016). Protocolos de diferentes medios. Lima, Perú.

Johns, T., Towers, G. (1981). Isothiocyanates and thioureas in enzyme hydrolysates of *Tropaeolum tuberosum*. *Phytochemistry*. 20:2687–2689.

- Johns, T. (1982). Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 5:149–161.
- Kalliola, R. (1990). Influencia de fotoperíodo en el crecimiento y formación de tubérculos de ulluco (*Ullucus tuberosus*), oca (*Oxalis tuberosa*) y ñu (*Tropaeolum tuberosum*). Turrialba. 96-105.
- King, S. (1987). Four endemic Andean tuber crops: Promising food resources for agricultural diversification. *Mountain Research and Development*. 7(1):43–52.
- Kjær, A., Ogaard M. y Maeda, Y. (1978). Seed volatiles within the family Tropaeolaceae. *Phytochemistry*. 17:1285–1287.
- Kyte, L. (1987). Plants from test tubes an introduction to micropropagation. Tumber press. Oregon, Estados Unidos. 160.
- Lescano, J. (1994). Genética y mejoramiento de cultivos andinos: quinoa, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. Programa Interinstitucional de Waru Waru. Puno, Peru.
- Luna, R. (2002). Micropropagación de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis. Tesis Lic. Biol. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 87.
- Manrique, I.; Arbizu, C.; Vivanco, F.; Gonzales, R.; Ramírez, C.; Chávez, O.; Tay, D.; Ellis, D. (2013). *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 122.
- Margara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro Madrid, España. 231.
- Marulanda, M.; Gutiérrez, L.; Márquez, M. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*. 27 (82).
- Mejía, R. (1994). Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones: Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo in vitro. Lima, Perú.

- Montoya, L. (1991). Cultivo de tejidos vegetales. Departamento de Agronomía. Medellín, Colombia.
- Mudoi, K.; Saikia, S.; Goswami, A.; Gogoi, A.; Bora, D.; Borthakur, M. (2013). Micropropagation of important bamboos. *African Journal of Biotechnology*. 12 (20): 2770-2785.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 25: 135–166.
- Murashige, T.; Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Oblitas, E. (1969). Plantas medicinales de Bolivia. Editorial los Amigos del Libro. Cochabamba, Bolivia.
- Patiño, V. (1964). Plantas cultivadas y animales domesticados de América. Imprenta Departamental. Cali, Colombia. 40–41.
- Pearsall, D. (1992). The origins of plant cultivation in South America. The origins of agriculture. An international perspective (C.Wesley and P.J. Watson (eds.)), Smithsonian Institution. Washington D.C., USA. 173–205.
- Pedroza, J. (2008). Aplicaciones de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia. 348.
- Perea, M; Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 160.
- Pérez, E. (1947). Plantas útiles de Colombia. Ensayo de botánica colombiana aplicada. Imprenta Nacional. Bogotá, Colombia.
- Pierik, R. (1988). Cultivo in vitro de plantas superiores. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326.
- Ramage, C.; Williams, R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro cellular and development biology*. 38 (2) 116-124.

Ramírez, Y; Freire, M y Hurtado, O. (2011). Propagación in vitro de bambúes. *Biotecnología vegetal*. 11 (3) : 131-142.

Roca, W.; Mrogrinski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 970.

Rodríguez, A., Gómez, D., Fernández, E., Chang, M. (2001). Effects of N, P and K nutrition on growth, yield and nutrient uptake of Mashua plants grown in sand. *Acta Hort.* 131-138.

Ruiz, H. y Pavón, J. (1794). *Flora Peruviana, et Chilensis Prodrromus*. Madrid, España.

Ruiz, H. y Pavón, J. (1802). *Flora peruviana*. 76–77.

Salcedo, M. (1986). *Un herbolario de Ch'ajaya revela sus secretos*. Ediciones Sempa. La Paz, Bolivia.

Sánchez, M. 2004. Control de la oxidación y contaminación en el cultivo in vitro de fresa. UDO Agrícola. Smith, R. (2013). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Elsevier. Waltham, Estados Unidos. 166.

Sparre, B. y Andersson, L. (1991). *A taxonomic revision of the Tropaeolaceae*. Opera Botanica. Copenhagen, Denmark.

Styer, D.; Chin, C. (1983). Meristem and shoot tip culture for propagation pathogen elimination, and germplasm conservation. *Horticultural reviews* 5:221-277.

Tapia, C. (1990). Tesis: Conservación in vitro de Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) y Mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. y P.). Quito, Colombia.

Tapia, C., Castillo R. y Mazón. N. (1996). *Catálogo de recursos genéticos de raíces y tubérculos andinos en Ecuador*. INIAP, DENAREF. Ecuador.

Terrazas, F., Valdivia, F. (1998). Spatial dynamics of in situ conservation: handling the genetic diversity of Andean tubers in mosaic systems. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 114:9–15.

Thomas, P.; Rhavindra, M. (1997). Shoot tip culture in mango: Influence of médium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments. *Journal of Horticulture Science*. 72 (5): 713- 722.

Torres, O. (1989). Aspectos anatómicos y fisiológicos de cultivos in vitro de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón). *Acta Biológica Colombiana*.

Trigiano, R. (2011). *Plant tissue culture, deveolpment and biotechnology*. Estados Unidos. CRC Press. 583.

Unesco. 1973. *Clasificación Internacional mapeo de vegetales*. Organización Científica y Cultural.

Yacovleff, E. and F.L. Herrera. (1935). El mundo vegetal de los antiguos peruanos. *Revista del Museo Nacional*, Lima 4:31–102.

Zevallos, R. (2009). Algunos ensayos relacionados con la micropropagación de marigold (*Tagetes erecta* L). Tesis Lic. Ing. Agr. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 102.

## ANEXOS



**Anexo 1. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M1**

M1	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.5	0	1	1.7	1	1	3	1	2	3.2	2	2
2	2	1	1	2.4	2	2	3.1	2	3	3.3	2	3
3	1	0	1	1.9	1	2	3.4	2	2	2.2	2	3
4	2.3	1	1	2.7	2	3	3	3	3	3	3	3
5	1.5	1	1	2.2	3	2	4	2	3	4.2	3	4
6	2	1	1	2.1	2	3	3.1	3	3	3.5	3	3
7	1.5	1	1	1.3	2	2	2	2	2	3	3	3
8	2	1	1	2.7	2	2	3.9	3	3	4.2	3	3
9	1	0	1	1.8	2	2	3	2	2	3.5	2	2
10	1.7	1	1	2.1	2	2	2.9	3	3	3.1	3	3

**Anexo 2. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M2**

M2	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.2	0	1	1.4	0	1	2	1	1	2.5	2	2
2	1.7	1	1	2	2	1	2.2	2	2	2.5	3	2
3	1	0	1	1.3	1	1	1.5	2	1	2	2	2
4	1.5	0	1	1.7	0	1	1.8	1	2	2.2	2	3
5	1.1	0	1	1.7	1	1	1.9	2	1	2.3	2	2
6	1	0	1	1.2	0	1	1.5	1	1	2	1	2
7	1.4	0	1	1.5	0	1	1.7	1	1	2.2	2	2
8	2	1	1	2.2	1	1	2.2	2	2	2.3	3	3
9	1.8	1	1	2	2	1	2.2	2	2	2.5	2	2
10	1.2	0	1	1.5	0	1	1.7	1	1	1.9	2	2

**Anexo 3. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio M3**

M3	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.7	1	1	2	2	2	2.5	3	3	5.2	5	5
2	1.8	1	2	2.5	3	3	3	3	4	5.4	5	5
3	1.3	1	1	2	2	2	2.7	3	4	5.5	5	5
4	1.5	1	2	3	2	3	4.7	3	4	6.2	6	6
5	2.5	1	2	3.7	3	2	4.3	3	5	6	6	6
6	2.7	1	1	5	2	2	5.3	3	2	6	5	6
7	2.2	1	2	3.5	2	3	4	3	3	5.9	6	6
8	1.5	1	1	2.7	2	2	3.2	2	3	5.9	5	5
9	1.3	1	1	1.9	2	2	3.5	2	3	6.1	4	4
10	1.7	1	2	2.5	2	2	4	3	2	6	5	5

**Anexo 4. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM1**

M3	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.6	0	1	2.1	2	2	2.6	3	3	5.4	6	6
2	1.9	0	1	2.4	3	3	3	3	3	5.4	5	5
3	1.4	0	1	2	2	2	2.8	4	4	5.3	6	6
4	1.7	0	2	2.3	3	3	4	3	3	6	6	6
5	2	1	2	2.7	3	3	4.2	4	4	5.9	6	6
6	2.2	1	1	4.4	3	3	5.1	5	5	6.3	5	5
7	1.9	1	2	3.3	3	3	4	3	3	6	6	6
8	1.8	1	1	2.5	2	2	4.3	4	4	6	5	5
9	1.5	0	1	1.9	2	2	3.5	3	3	6.3	6	6
10	1.9	1	2	2.4	3	3	4.1	4	4	6.3	5	5

**Anexo 5. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM2**

M3	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.7	0	1	2	4	4	4	6	6	5.3	8	8
2	1.8	1	2	2.2	3	3	4.2	5	5	5	7	7
3	1.5	1	2	2	3	3	3.5	5	5	4.9	7	7
4	2	0	2	2.3	4	4	3.2	6	6	4	7	7
5	2	1	2	2.4	4	4	4	7	7	5	8	9
6	2.3	0	2	2.5	4	4	4	7	7	5	9	9
7	1.9	0	2	2.2	3	3	3.8	6	6	5	7	8
8	2.1	1	2	2.3	3	3	3	6	6	5.2	8	8
9	2.2	0	1	2.4	4	4	3.5	5	5	4	7	7
10	2	0	2	2.0	3	3	3.7	6	6	4.2	7	7

**Anexo 6. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM3**

M3	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	2	3	3	2.5	4	4	4.3	5	5	6	7	7
2	2.5	2	2	2.8	4	4	4.3	5	5	5.2	7	7
3	2.5	2	3	2.9	3	3	4	5	5	4.9	7	7
4	2.7	3	3	3	5	5	4.1	6	6	5.4	7	8
5	3.5	2	3	4	5	5	3.9	5	5	5.4	7	8
6	2.3	3	3	4	4	4	4.1	6	6	5.3	9	9
7	2.5	2	3	3.8	5	5	4	6	6	5.3	7	9
8	2.2	3	3	2.7	4	4	4	6	6	5	8	8
9	2.1	2	3	3	5	5	4.5	6	6	5.2	7	7
10	2	2	2	3.9	5	5	4.2	7	7	5	8	8

**Anexo 7. Evaluaciones de los Explantes de Mashua negra en el medio MM4**

M3	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3			EVALUACIÓN 4		
	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes	Longitud (cm)	número de hojas	Número de brotes
Explante												
1	1.5	1	1	2	2	6	2.7	4	10	5.3	5	13
2	1.8	2	2	2.5	3	5	3.2	5	11	6	6	15
3	2	2	3	2.4	3	6	3	4	12	5.5	5	13
4	2.1	2	3	2.6	3	6	3.5	4	10	6.2	5	13
5	1.9	2	3	2.4	3	6	4	4	9	5.8	6	12
6	2.2	1	2	2.5	3	6	4.8	5	11	6	5	13
7	1.8	2	3	2.5	3	7	4.5	5	12	6.4	6	15
8	2	2	3	2.4	3	6	4.1	5	12	6.5	6	15
9	1.8	2	3	2.9	3	5	5	5	11	6.6	7	14
10	2.1	1	3	2.7	3	6	5.2	5	10	6.7	7	14

### Anexo 8. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM2 y MM3

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Columnal	N	Medias D.E.	Medianas	H	p
Número hojas MM2		10	7.50 0.71	7.00	0.12	0.6865
Número hojas MM3		10	7.40 0.70	7.00		

### Anexo 9. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM1 y MM4

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Columnal	N	Medias D.E.	Medianas	H	p
Número hojas MM1		10	5.40 0.52	5.00	1.12	0.2402
Número hojas MM4		10	5.80 0.79	6.00		

### Anexo 10. Prueba Kruskal Wallis para número de hojas entre tratamiento MM1, MM2, MM3 y MM4

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tratamiento	N	Medias D.E.	Medianas	H	p
Número hojas MM1		10	5.40 0.52	5.00	26.24	<0.0001
Número hojas MM2		10	7.50 0.71	7.00		
Número hojas MM3		10	7.40 0.70	7.00		
Número hojas MM4		10	5.80 0.79	6.00		

### Anexo 11. Presencia de callos en los explantes de Mashua negra

Mashua negra										
TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
M1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
M2	NC	CC	NC	NC	NC	CC	NC	NC	NC	NC
M3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
M4	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC

R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10: Repeticiones; NC: No hay callos; CC: Si hay Callos.

**Anexo 12. Presencia de raíz en los explantes de Mashua negra**

TRAT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
M1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M3	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
M4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10: Repeticiones; NR: No hay raíz; SR: Si hay raíz.

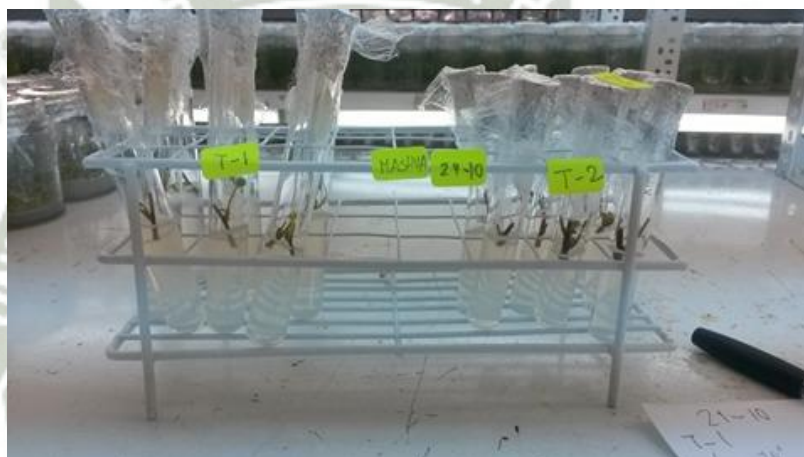
**Anexo 13. Figuras complementarias del proyecto de la Mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*)**



**Figura 30. Plantas madre de Mashua negra empleadas en la investigación**



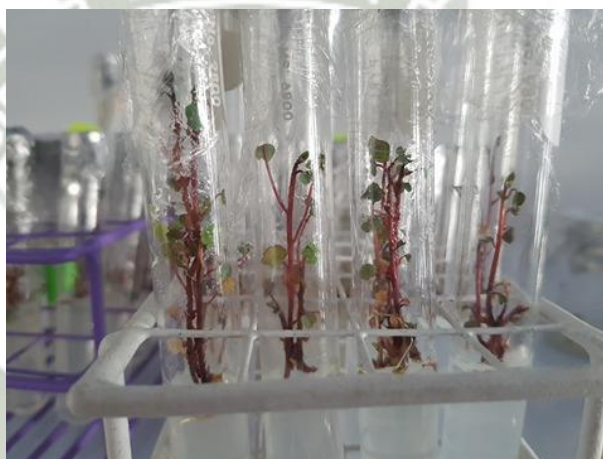
**Figura 31. Segmentos Nodales de Mashua negra luego del protocolo de desinfestación con T1**



**Figura 32. Gradilla con tubos de ensayo con explantes de Mashua negra en medios de establecimiento T1 y T2 a la segunda semana de evaluación**



**Figura 33. Explante de Mashua negra en cámara de flujo laminar obtenido con M3 lista para ser propagada**



**Figura 34. Explantes de Mashua negra en cámara de flujo laminar obtenidos en la etapa de multiplicación *in vitro* con MM2**



**Figura 35. Explantes de Mashua negra con presencia de raíz obtenidos a las cuatro semanas en la etapa de multiplicación *in vitro* con MM3**



**Figura 36. Explantes de Mashua negra con presencia de callo obtenidos a las cuatro semanas en la etapa de multiplicación *in vitro* con MM4**



**Figura 37. Explantes de Mashua negra en frasco de multiplicación *in vitro* masiva obtenidos con MM3**



**Figura 38. Explantes de Mashua negra aclimatadas en bandeja después de una semana**



**Figura 39. Explantos de Mashua negra aclimatadas en bandeja después de dos semanas**



**Figura 40. Plantas de Mashua negra aclimatadas en bolsa después de cuatro semanas**