



Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum*

L.) variedad Superchola a partir de brotes etiolados

Vanegas Paredes, Alejandro Ismael

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Ing. Taipe Bolaños, Marco Vinicio

21 de febrero de 2022



Tesis Superchola_Alejandro_Vanegas.docx

Scanned on: 4:41 February 18, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	449
Words with Minor Changes	70
Paraphrased Words	158
Omitted Words	0

Firma:



Firmado electrónicamente por:
MARCO VINICIO
TAIPE BOLAÑOS

Taipe Bolaños, Marco Vinicio
Director



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Implementación de un protocolo de cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola a partir de brotes etiolados”** fue realizado por el señor **Vanegas Paredes, Alejandro Ismael**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 21 de febrero del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**MARCO VINICIO
TAIPE BOLAÑOS**

Taipe Bolaños, Marco Vinicio
C. C. 1712485091



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Vanegas Paredes, Alejandro Ismael**, con C.C. **172271477-9**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Implementación de un protocolo de cultivo in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola a partir de brotes etiolados"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 21 de febrero del 2022

Firma:



Vanegas Paredes, Alejandro Ismael

C.C. 172271477-9



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Vanegas Paredes, Alejandro Ismael**, con C.C. **172271477-9**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Implementación de un protocolo de cultivo in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola a partir de brotes etiolados" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 21 de febrero del 2022

Firma:

Vanegas

Vanegas Paredes, Alejandro Ismael

C.C. 172271477-9

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi Familia, por su amor incondicional y por siempre guiar mi camino y corregirlo cuando es necesario. Mis sueños y logros serán para ustedes.

Alejandro Ismael Vanegas Paredes

Agradecimientos

Agradezco a la empresa Conectiflor Andino S.A. por abrirme las puertas y darme una oportunidad cuando más lo necesitaba, siempre estaré agradecido por lo que aprendí y el tiempo que compartí con cada uno de los pasantes y amigos que hacían sus proyectos, cada papita aclimatada es también suya.

A mi tutor el Ingeniero Marco Taipe por su dedicación en guiarme en este trabajo y por la paciencia y el tiempo que supo darme para poder terminarlo, mostro una gran dedicación y es sin dudas un gran profesor de quien aprendí mucho en mi carrera.

A mis profesores la Dra. Jadan, Dr. Noceda, y la Dra Proaño, que me inculcaron el amor por el mundo vegetal desde que entre a sus clases.

A mi madre Isabel, por todo el trabajo suyo que me ha llevado hasta este punto de mi vida, a mis hermanas porque son quienes me motivan a ser alguien mejor, les debo mucho por la persona que ahora soy.

A Ramiro que ha sido un ángel guardián en mi vida, le estoy infinitamente agradecido a Dios por ponerte en mi camino y por saberme guiar y corregir cuando era necesario.

A mi tío por ser la parte divertida de mi vida, que incluso cuando nadie más puede es capaz de sacarme una sonrisa.

A mis amigos Alexis, Fabricio, Renato y César por todas esas risas en las noches de pandemia y el camino recorrido en la universidad, ustedes las hicieron geniales, que nunca nos falta una partida (GOGOGO).

A mis amigos Michelle, Dany, Dennis por haberlos conocido y compartir con ustedes muchas aventuras, espero seguir compartiendo muchas más.

Índice de Contenido

Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido	8
Listado de tablas	10
Listado de figuras	12
Listado de abreviaturas	13
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema	17
Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Capítulo II: Marco teórico	19
Aspectos generales de la planta de Papa	19
Distribución botánica y taxonomía	19
Morfología de la Papa	20
Cultivar Superchola	22
Formas de propagación vegetativa	22
Brotos etiolados	23
Importancia del cultivo de papa en Ecuador	24
Cultivo de tejidos Vegetales	25
Composición del medio de cultivo	28
Macronutrientes	29
Micronutrientes	29
Vitaminas	30
Fuente de Carbono	30
Reguladores de crecimiento	31
6-Bencil amino purina	31
Medio Murashige y Skoog	31
Agente gelificante	32

	9
Hipótesis	32
Capítulo III: Materiales y métodos	33
Localización del proyecto	33
Obtención del Material Vegetal	33
Medios de Cultivo	34
Condiciones de cultivo del explante	34
Descripción de los Ensayos	34
Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	34
Etapa II: Multiplicación	36
Capítulo IV: Resultados	38
Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	38
Contaminación Bacteriana	38
Contaminación Fúngica	40
Contaminación Total (Bacterias y Hongos)	43
Oxidación	46
Viabilidad	48
Análisis en conjunto de las variables viabilidad, contaminación y oxidación, consideradas en el ensayo	51
Etapa II: Multiplicación	52
Longitud de los Brotes	52
Índice de Multiplicación	54
Vigorosidad	56
Capítulo V: Discusión	57
Etapa de Establecimiento	57
Multiplicación	60
Capítulo VI: Conclusiones	62
Capítulo VII: Recomendaciones	63
Referencias	64

Listado de tablas

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de la papa.....	20
Tabla 2.	Tratamientos para las etapas de desinfección e introducción de explantes.....	35
Tabla 3.	Tratamientos formados con regulador de crecimiento (6-BAP) en el medio MS de cultivo para multiplicación de brotes nodales.....	37
Tabla 4.	Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación bacteriana significativo al 5%. 38	
Tabla 5.	Promedio del porcentaje de contaminación bacteriana para cada uno de los tratamientos analizados.....	39
Tabla 6.	Análisis de Contingencia para los factores concentración y tiempo de inmersión para la variable contaminación Bacteriana.....	40
Tabla 7.	Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación fúngica significativo al 5%..	41
Tabla 8.	Comparación de a pares del ensayo de desinfección para contaminación fúngica.	41
Tabla 9.	Promedios del porcentaje de contaminación fúngica para cada uno de los tratamientos analizados.....	42
Tabla 10.	Análisis de Contingencia para los factores concentración y tiempo de inmersión al analizar la variable contaminación fúngica.	43
Tabla 11.	Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación total (bacteria y hongo) significativo al 5%.	44
Tabla 12.	Comparación de a pares del ensayo de desinfección para contaminación total. .	44
Tabla 13.	Promedios del porcentaje de contaminación total para cada uno de los tratamientos analizados.	45
Tabla 14.	Análisis de varianza para la variable oxidación respecto a los factores tiempo y concentración, significativo al 5%.....	46
Tabla 15.	Prueba de Tukey para la concentración significativa al 5%.	46
Tabla 16.	Prueba de Tukey para el tiempo de inmersión significativa al 5%.	47
Tabla 17.	Promedio del porcentaje de oxidación de los explantes para cada uno de los tratamientos.	47
Tabla 18.	Análisis de varianza para la viabilidad respecto a las variables tiempo y concentración significativo al 5%.....	48
Tabla 19.	Prueba de Tukey para el factor concentración de hipoclorito significativa al 5%. .	49
Tabla 20.	Prueba de Tukey para el factor tiempo de inmersión significativa al 5%.	49
Tabla 21.	Promedio de los porcentajes de viabilidad de los explantes para cada uno de los tratamientos.	50
Tabla 22.	Análisis de la varianza para la variable longitud de los brotes en la etapa de multiplicación.....	52
Tabla 23.	Prueba de Tukey para longitud de los brotes en la etapa de multiplicación significativa al 5%.	52
Tabla 24.	Promedio de Longitud en mm de brotes por explante para cada tratamiento de 6-	

BAP analizado.	53
Tabla 25. Análisis inferencial Kruskal Wallis para el índice de multiplicación significativo al 5%.	54
Tabla 26. Comparación de a pares del ensayo para índice de multiplicación.	55
Tabla 27. Promedios del índice de multiplicación para cada uno de los tratamientos analizados.	55

Listado de figuras

Figura 1. <i>Ilustración morfológica de Solanum tuberosum L.</i>	21
Figura 2. <i>Brotos etiolados de papa Solanum tuberosum L.</i>	24
Figura 3. Porcentaje de contaminación bacteriana en cada uno de los tratamientos analizados. 39	
Figura 4. Porcentaje de contaminación fúngica en cada uno de los tratamientos.	42
Figura 5. Porcentaje de contaminación total en cada uno de los tratamientos.....	45
Figura 6. Porcentaje de oxidación en cada uno de los tratamientos.....	48
Figura 7. Porcentaje de viabilidad promedio para cada en cada uno de los tratamientos analizados. 50	
Figura 8. Porcentaje de viabilidad, oxidación y contaminación de los explantes en cada uno de los tratamientos.....	51
Figura 9. Gráfico de longitud promedio (mm) de brotes de papa para cada tratamiento de multiplicación.....	53
Figura 10. Brotos de papa a las 2 semanas del cultivo en la etapa de multiplicación y concentraciones de 6-BAP: (a) control, (b) 0.1 mg/L, (c) 0.5 mg/L, (d) 1mg/L.	54
Figura 11. Índice de multiplicación de papa para cada uno de los tratamientos de 6-BAP. ..	56
Figura 12. Brotos de papa a las 3 semanas del cultivo en la etapa de multiplicación y concentraciones de 6-BAP: (a) control, (b) 0.1 mg/L, (c) 0.5 mg/L, (d) 1mg/L.	56
.....	56

Listado de abreviaturas

AG₃= ácido giberélico

ANA= ácido 1-naftalenacético

ANOVA= análisis de varianza

6-BAP= 6-bencilaminopurina

CIP= centro internacional de la papa

Cv= variedad de cultivo

DE= desviación estándar

MAG= Ministerio de agricultura y ganadería

MS= Murashige y Skoog

NaClO= hipoclorito de sodio

pH= potencial de hidrógeno

PLRV= virus del enrollado de la hoja de la papa

Resumen

La papa se sitúa en el escalón más alto de alimentos consumidos a nivel mundial, si bien su propagación vegetativa tradicional es la manera que los agricultores prefieren al momento de multiplicar esta planta, esto la vuelve un blanco de organismos patógenos y no permite conseguir tubérculos sanos y libres de enfermedades. Lo que repercute en semillas y tubérculos de baja calidad. En este contexto se generó este proyecto con el objetivo de implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de papa *Solanum tuberosum* L. variedad Superchola a partir de brotes etiolados. Primero se estableció un protocolo de establecimiento de brotes etiolados donde no se encontró influencias significativas entre las variables tiempos de inmersión y concentración de hipoclorito de sodio, no obstante, el mejor tratamiento con el que se obtuvo una viabilidad del 73.33% fue el compuesto por hipoclorito de 0.5 %v/v y 5 minutos de tiempo de inmersión. A continuación, se encontró que el 6-BAP tiene un efecto significativo en la elongación y el índice de multiplicación de los explantes, se encontró que a bajas concentraciones como es el caso del tratamiento M1 (0.1 mg/L de 6-BAP), mostró una elongación promedio mayor de 50.53 mm frente a los otros tratamientos y un índice de multiplicación de 7.09, sin embargo, para este caso el tratamiento control fue el que presentó el mejor índice con 7.40.

Palabras Clave: Papa, Cultivo *In vitro*, Superchola, Propagación.

Abstract

Although traditional vegetative propagation is the way farmers prefer to multiply this plant, this makes it a target for pathogenic organisms and does not allow them to obtain healthy and disease-free tubers. This results in low quality seeds and tubers. In this context, this project was generated with the objective of implementing a protocol for *in vitro* cultivation of potato *Solanum tuberosum* L. variety Superchola from etiolated sprouts. First, a protocol for the establishment of etiolated sprouts was established where no significant influences were found between the variables immersion time and sodium hypochlorite concentration; however, the best treatment with which a viability of 73.33% was obtained was the one composed of 0.5 %v/v hypochlorite and 5 minutes of immersion time. Next, it was found that 6-BAP has a significant effect on the elongation and multiplication index of the explants, it was found that at low concentrations as is the case of treatment M1 (0.1 mg/L of 6-BAP), showed a higher average elongation of 50.53 mm compared to the other treatments and a multiplication index of 7.09, however, in this case the control treatment was the one that presented the best index with 7.40.

Key words: Potato, In vitro culture, Superchola, Propagation.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La papa se encuentra en el tercer lugar de importancia como cultivo alimenticio humano después del arroz y el trigo, es consumida por más de mil millones de personas en todo el mundo (CIP, 2021). En Ecuador la papa es una de los cultivos más importantes de producción del Altiplano Andino, su diversidad genética en la región lo hace un cultivo de importancia agroeconómica, su cultivo por parte de los campesinos aporta con el 60% aproximadamente a Nivel Nacional de la demanda de alimentos (Basantes *et al.*, 2020). En el mundo más del 50% de la producción de papas se procesa en productos alimenticios, balanceado de engorde de ganado o es transformado en almidón para la industria, solo el 40% se consume fresca (CIP, 2021).

En 1994 un estudio realizado por el INIAP, encontró más de 500 diferentes tipos de papas entre especies de *phureja* y *andígena* cultivadas en Ecuador, de todas estas solo 30 son cultivables, y de estas el 50% del área sembrada la ocupan Superchola y Gabriela ((Pumisacho & Sherwood, 2005).

Desde el año 2012 la exportación de papa en el país ha descendido frente a la importación, esto se debe a la falta de competitividad con los países vecinos que mantienen buenos costos en la producción y en consecuencia hace rentable la exportación del producto, también se debe a las demandas de cadenas de comida rápida que no consideran al producto interno con las características específicas para la industria (Cobos, 2019). El cultivo de papa se propaga tradicionalmente por tubérculos-semillas, este proceso está sujeto a un alto riesgo de contaminación por virus, hongos y plagas debido a su reproducción asexual durante el periodo de cultivo y almacenamiento (Igarza *et al.*, 2012).

En este sentido la producción de plantas de papa, semilla de papa o micro tubérculo

mediante técnicas de cultivo *in vitro* se ha convertido en una vía para una producción libre de patógenos, este proceso garantiza calidad genética y sanitaria en la semilla y uniformidad en la producción (Jayawardana, 2015).

Justificación del problema

Si bien a escala comercial la papa tiene una propagación vegetativa tradicional, con este método tiene el riesgo de acumular varias infecciones sistémicas como bacterias, hongos y virus que a la larga producen pérdidas de rendimiento y vigor. En este ámbito, el cultivo de tejidos vegetales puede aplicarse a la cadena de producción de la papa para propagar material de interés eficientemente, mantener bancos de germoplasma, proporcionar el estudio de esta especie y de sus interacciones con factores bióticos y abióticos, y producir plantas modificadas genéticamente y libres de todo tipo de patógenos (Basantes *et al.*, 2020).

El tubérculo de papa se propaga vegetativamente utilizando papas de siembra libres de virus que son fundamentales para alcanzar altos rendimientos. Las papas de siembra libres de virus se obtienen mediante técnicas de cultivo de tejidos, que representan entre el 17 y el 21% del coste total del cultivo (Agriannual, 2013).

En Ecuador la demanda de semilla de papa en el mercado indica que un 59% de los productores utilizan semilla propia, un 30% semilla seleccionada, mientras que la semilla certificada y registrada alcanzan sólo un 8 y 3% respectivamente, este análisis revela que los productores utilizan semilla de baja calidad mayoritariamente (Taramuel, 2017).

El principal problema del cultivo de papas en todo el mundo son las pérdidas económicas debidas al tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans*, que puede destruir las plantas de patata en dos semanas en condiciones húmedas. El tizón puede sobrevivir incluso en condiciones adversas. Con el asentamiento progresivo de este tipo de enfermedades en los stocks de semillas, la disponibilidad de semillas libres de patógenos es muy difícil actualmente

(Badoni & Chauhan, 2010).

En la actualidad las técnicas de cultivo de tejidos se utilizan en todo el mundo para producir papas de siembra pre básicas y libres de virus, conocidas como micro tubérculos (Gudeva *et al.*, 2012). Los microtubérculos se siembran en un entorno protegido para producir minitubérculos (semilla básica), la semilla básica entra en la cadena de producción de semillas para producir la semilla certificada que se vende a los agricultores (Rafique *et al.*, 2014). La escasez de semillas de buena calidad ha sido reconocida como el factor más importante que limita la productividad de la patata en los países en desarrollo. La disponibilidad de la tecnología de cultivo de tejidos para la multiplicación rápida de material de siembra libre de enfermedades ha facilitado en gran medida la producción de semillas de patata (Chuntale, 2018).

Bajo este contexto, el proyecto tiene el propósito de implementar un protocolo de cultivo *in vitro* a partir de brotes etiolados de la variedad Superchola (*Solanum tuberosum* L.) con el objetivo de producir semillas de papa de alta calidad, para competir y satisfacer las demandas del mercado.

Objetivos

Objetivo General

- Implementar un protocolo de cultivo *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola a partir de brotes etiolados.

Objetivos Específicos

- Obtener brotes etiolados de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola para su establecimiento *in vitro*.
- Determinar un óptimo protocolo de desinfección para la introducción *in vitro* de brotes etiolados de la variedad Superchola (*Solanum tuberosum* L.).

- Establecer un medio de cultivo *in vitro*, así como las concentraciones de reguladores de crecimiento adecuadas para la multiplicación de *Solanum tuberosum* L. variedad Superchola.

Capítulo II: Marco teórico

Aspectos generales de la planta de Papa

Distribución botánica y taxonomía

Solanum tuberosum L. pertenece a la familia de las *Solanáceas*. Esta familia incluye, entre otras 2000 especies. El género *Solanum* es un género polimorfo y en gran medida tropical y subtropical que contiene más de 1000 especies (Fernald, 1970; Spooner & Knapp, 2013). *Solanum tuberosum* se ha clasificado en la sección Petota, que incluye todas las patatas silvestres y cultivadas que producen tubérculos. *Solanum tuberosum* L. se divide en dos subespecies: *tuberosum* y *andigena*. El centro primario de distribución y domesticación de *Solanum tuberosum* L. se reportó en Sudamérica, específicamente la zona Andina, debido a que se puede cultivar en una alta variedad de altitudes se encuentra distribuida en todo el continente americano y gran parte del mundo; esto da origen a una gran variabilidad morfológica del tubérculo (CONABIO, 2016).

Según CFIA (2015), la clasificación Taxonómica de *Solanum tuberosum* L. se presenta adaptada en la Tabla 1:

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de la papa.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i> L. (Linnaeus)
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Linnaeus)

La variedad con la que se va a trabajar es Superchola que proviene del cruce entre las variedades (*Curipamba negra x Solanum demissum*) (CIP, 2021).

Morfología de la Papa

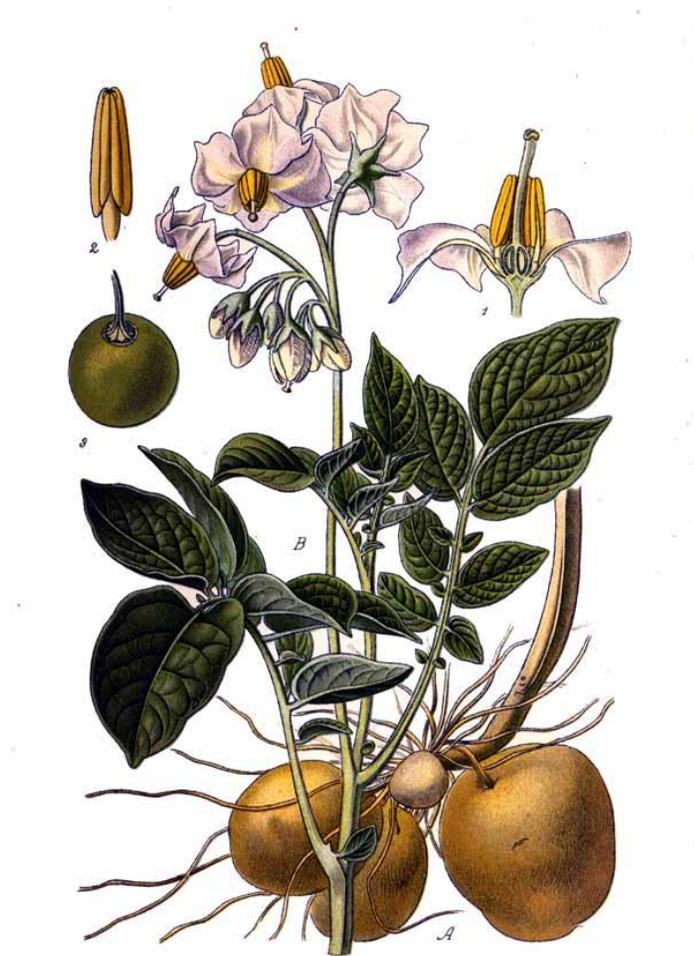
Solanum tuberosum L. es una planta herbácea que crece hasta 0,4-1,4 m (metros) de altura y puede ir de erecta a totalmente postrada (Spooner & Knapp, 2013). Los tallos varían desde casi sin pelos hasta densamente peludos y pueden ser verdes, púrpuras o con manchas verdes y púrpuras, estos cuentan con una porción aérea y otra que puede ser subterránea y miden entre 30-60 cm, es grueso y pubescente (Martínez, 2009). Las hojas son pinnadas con un único folíolo terminal y tres o cuatro pares de folíolos grandes y ovoides con otros más pequeños entre ellos (Spooner & Knapp, 2013; Struik, 2007). Las hojas tienen un tamaño de 8-22 x 5-13 cm (centímetros) y los pecíolos de 2-6 cm. Son de color verde medio a oscuro y, al igual que los tallos, pueden variar en cuanto a su pilosidad, desde casi sin pelo hasta densamente peludo en ambos lados (González, 2015).

Los tubérculos, de forma esférica a ovoide, son hinchazones del rizoma. El color de la carne y la piel de los tubérculos varía según la variedad, en este caso (Spooner & Salas, 2006).

Las inflorescencias terminales son cimas que miden 5-11 cm (centímetros) de largo y se encuentran generalmente en la mitad distal de la planta. Las inflorescencias suelen estar ramificadas y pueden contener hasta 25 flores. Las flores pentámeras, de 3-4 cm de diámetro, son todas aparentemente perfectas (Spooner & Knapp, 2013; Struik, 2007). La morfología completa se puede apreciar en la figura 1.

Figura 1.

Ilustración morfológica de Solanum tuberosum L.



Nota: En esta imagen podemos ver la morfología general de una planta de papa (*Solanum tuberosum L.*) (Masclef, 1891).

Cultivar Superchola

Según Piedra (2014), en el año 1983 fue desarrollado el cultivo de Superchola por parte del señor Germán Bastidas, él fue el agricultor responsable de mejorar y liberar el cultivar en ese año y lo entregó a otros agricultores del Carchi, al final se extendió al resto del país.

Este cultivar tiene las siguientes características, son plantas erectas y pertenecen a la subespecie *andigena*. Esta variedad tiene muchos tallos verdes con ligeras pigmentaciones purpuras, su estructura es fuerte, robusta y presente pubescencias con alas rectas y onduladas, y nudos prominentes; las hojas son de tipo abierto y de color verde oscuro, se tienen tres pares de folíolos primarios y un folíolo terminal, con excepción de tres pares de folíolos secundarios entre los folíolos y cinco pares de folíolos terciarios o folíolos en el pecíolo, las hojas son frondosas de rápido desarrollo y cubren gran parte del suelo; las flores son moradas; las ramas son medianas, ovaladas, de color rojo púrpura, las yemas terminales son pequeñas, las yemas laterales semilargas; los tubérculos son medianos, ovalados con piel lisa y rosada, pulpa amarillenta sin pigmentación y ojos superficiales (INIAP, 2011).

Formas de propagación vegetativa

El tubérculo de papa se propaga tanto por vía sexual (utilizando semillas de papas verdaderas) como por vía asexual (vegetativa). La propagación convencional de la papa se realiza de forma vegetativa utilizando tubérculos de siembra, lo que garantiza la uniformidad del cultivo en términos de crecimiento y rendimiento (Biniam & Tadesse, 2008).

El cultivo comercial se propaga vegetativamente mediante trozos de tubérculos o pequeños tubérculos enteros que se denominan comúnmente semillas o papas de siembra o mediante esquejes de plantas o plántulas. La papa también puede reproducirse mediante semillas botánicas, que se denominan comúnmente semillas de patata verdadera (Figura 2). La producción de semillas verdaderas de papa se practica en los programas de cultivo en

condiciones de invernadero o de cámara de crecimiento (Bamberg *et al.*, 2016). Algunos programas también han utilizado la polinización abierta realizada al aire libre. La producción de semilla de papa verdadera en el entorno natural varía según el cultivar y las condiciones meteorológicas. El grado en que se produce la floración, la duración de la misma y la respuesta del comportamiento de la floración a las condiciones ambientales están muy influenciados por el cultivar. Las condiciones ambientales que influyen en el inicio y desarrollo de la floración incluyen la intensidad, calidad y duración de la luz (duración del día), la temperatura, el suministro de agua y los nutrientes disponibles en el suelo (Badoni & Chauhan, 2010).

Brotos etiolados

La brotación es uno de los retos más importantes en el almacenamiento postcosecha de los tubérculos de papa y en toda la cadena de suministro, ya que reduce la calidad y la cantidad del producto comercializable, lo que provoca pérdidas económicas (Santos *et al.*, 2019). La brotación y el crecimiento de los brotes de los tubérculos de patata provocan graves pérdidas, ya que causan alteraciones en las propiedades físicas de los tubérculos, como la reducción de la turgencia, el encogimiento inducido y favorecen la pérdida de peso (Visse-Mansiaux *et al.*, 2021).

El desarrollo de las plantas en la oscuridad (skotomorfogénesis) se caracteriza por la palidez de los tejidos etiolados, la excesiva elongación de los brotes, el escaso desarrollo de las hojas y el gancho apical, como adaptación para penetrar en el suelo y la hojarasca para llegar a la luz. Este estado de desarrollo en las plántulas se debe a una represión por defecto de la fotomorfogénesis. La iluminación con bajas intensidades de luz elimina esta inhibición y desencadena un cambio en la expresión génica hacia el desarrollo en la luz y la fotosíntesis. Esto implica una apertura del gancho apical, una reducción del crecimiento por elongación, la expansión de las hojas y el desarrollo de los cloroplastos (Dong *et al.* 2015).

Figura 2.

Brotos etiolados de papa Solanum tuberosum L.



Foto tomada por: Vanegas Alejandro (2021).

Importancia del cultivo de papa en Ecuador

La papa es uno de los productos más consumidos por la gente de bajos recursos en la región, se podría decir que es parte de la seguridad alimentaria, con alrededor de 500 mil toneladas anuales de producción y un consumo per cápita de 22 kg en la Sierra ecuatoriana (MAG, 2021).

La agricultura en nuestro país es uno de los procesos que más aporta al producto interno bruto de la región, alcanzando hasta un 10 %, la papa es uno de los cultivares más importantes en la región andina (CIP, 2021). En nuestro país provincias como el Carchi e Imbabura son los principales productores, si bien su producción y rendimiento no son un problema, las plantas que se obtiene de manera vegetativa están bajo una constante amenaza enfermedades nuevas como

la punta morada y el psílido que se presentan con bastante frecuencia en la región, debido a un escaso uso de semilla de calidad (Castillo *et al.*, 2020).

Los principales virus que afectan a la papa dentro del país son el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), que puede ocasionar pérdidas del rendimiento del 90%, virus Y y A de la papa que junto con sus mosaicos pueden llegar a pérdidas de rendimiento del 80%, y el virus moteado de la papa andina que produce necrosis apical y enanismo de los tubérculos (Noroña & Tipanquiza, 2011).

Si el stock de semillas no se mantiene bien o se sustituye con frecuencia por otras nuevas, la infiltración del virus puede alcanzar hasta el 100% en 3-4 temporadas de cultivo sucesivas, lo que resulta en casi la mitad o un tercio de los rendimientos (Chuntale, 2018). Este es el principal problema al que se enfrentan los productos de semilla junto a las escasas políticas de control en la producción y dispersión de semilla de papa de baja calidad.

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos en el año 2017, las plagas con un 27% y enfermedades de otro tipo con el 9% son los principales motivos de pérdida de superficie de cultivos transitorios como la papa (Mejía, 2017).

Cultivo de tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos es un componente esencial de la biotecnología vegetal, es una herramienta que utiliza una parte de la planta que se denomina en esta técnica “explante” y medios de cultivo con todos los nutrientes necesarios para multiplicar y regenerar nuevas plantas a partir de células modificadas genéticamente, de esta manera la planta de estudio puede ser fácilmente clonada en cultivos bajo condiciones asépticas y controladas (Castillo, 2014).

El cultivo de tejidos se utiliza ampliamente para la obtención de plantas libres de enfermedades, la dispersión rápida de plantas difíciles de propagar, hibridación somática, además de modernas aplicaciones en la mejora genética de plantas comerciales y obtención de

plantas haploides para programas de mejora (Sharma *et al.*, 2015).

El cultivo de tejidos se está convirtiendo en un medio alternativo a la propagación vegetativa de las plantas, ya que al ser cultivadas *in vitro* suelen estar libres de enfermedades bacterianas y fúngicas. La erradicación y mantenimiento de plantas libres de virus también se puede lograr rápidamente con esta técnica. Los tres métodos principales que se utilizan generalmente en el cultivo de tejidos son micropropagación mediante la multiplicación mejorada de la yema axilar, organogénesis y embriogénesis somática (Castillo, 2014).

En la actualidad, el método más exitoso y comúnmente utilizado es la multiplicación de brotes a partir de yemas axilares, utilizando una combinación de citoquinina y auxina, se puede romper la latencia de las yemas axilares que luego se convertirán en brotes. Utilizando medios que contengan concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento, se puede lograr tasas de multiplicación muy altas y rápidas. El cultivo moderno de tejidos vegetales se realiza en condiciones asépticas y con aire filtrado (Alcántara *et al.*, 2019).

El cultivo de brotes es la técnica básica de la biotecnología de la papa. Permite el establecimiento rápido y eficiente de cultivos *in vitro* utilizando puntas de brotes como material de partida. Una vez establecidos, los brotes axénicos pueden proporcionar los explantes necesarios para otras técnicas, como los cultivos de células, tejidos y órganos, el cultivo de protoplastos, la embriogénesis somática y la transformación (Vinterhalter *et al.*, 2008). Pueden utilizarse para la producción de plantas (micropropagación), de tubérculos (microtubérculos) o de ambos. El almacenamiento de genotipos (bancos de genes) es otra aplicación importante que se consigue mediante el crecimiento sostenido (mínimo y lento) de los cultivos de brotes. En la criopreservación, el crecimiento se detiene completamente a la temperatura del nitrógeno líquido. El cultivo de puntas de meristemas es un componente importante en la erradicación de virus, utilizado solo o en combinación con la termoterapia (Niino & Valle, 2015).

Establecimiento y Desinfección

Los materiales vegetales vivos del medio ambiente están naturalmente contaminados en su superficie (y a veces en su interior) con microorganismos, por lo que es necesario esterilizar la superficie de los explantes en soluciones químicas, por lo general se utiliza hipoclorito de sodio o alcohol (Alcántara *et al.*, 2019).

Los contaminantes más comunes son bacterias y hongos que habitan de forma natural en el ambiente, una vez desinfectado el material deben mantenerse condiciones de asepsia y de preferencia el trabajo se realizará en cámaras de flujo laminar (Castillo, 2014).

El etanol es un agente esterilizante tan potente como fitotóxico. Generalmente se utiliza a una concentración del 70% (v/v) (Abbasi *et al.*, 2016), durante solo unos segundos o minutos, seguido de un tratamiento con otros desinfectantes. El etanol penetra en su pared celular. Naturalmente, el etanol a concentración del 70 % que contiene un 30 % de agua penetrará mejor a través de la pared celular que el etanol solo, ya que es más polar y útil para una mejor ósmosis.

La propensión al pardeamiento es específica del antioxidante y la presencia de un antioxidante minimiza en gran medida la tasa de pardeamiento. La estandarización de la esterilización de la superficie es necesaria para la prevención del oscurecimiento fenólico y la contaminación microbiana de los explantes.

Multiplicación

En esta etapa, el número de unidades de cultivo se incrementa en el número deseado. Una vez más, la etapa de propagación requiere una técnica y unos protocolos particulares en función de las especies o los genotipos de una planta. Por ejemplo, los brotes axilares de la batata se propagan por propagación organogénica, mientras que el café requiere la embriogénesis somática para una propagación eficaz. Para conseguir una respuesta morfogénica óptima hay que introducir una dosis perfecta de reguladores del crecimiento vegetal (Twaij *et al.*, 2020).

Esta es la etapa más importante y la tasa o índice de multiplicación determina en gran medida el éxito del sistema de micropropagación, usualmente la multiplicación ocurre a través de la embriogénesis somática, propagación clonal y formación de brotes adventicios (Boeri, 2016).

Organogénesis

La organogénesis es un proceso de formación de órganos vegetales a partir de un explante con su naturaleza tisular determinada. Esto significa básicamente que un solo órgano tisular se convierte en una planta completamente nueva (Twaij *et al.*, 2020). Es de dos tipos el primero es un método directo si los brotes se obtienen a partir de los explantes directamente, y en el segundo método de organogénesis indirecta se produce a partir de callo formado de explantes. En éste, cualquier órgano como raíces, brotes u hojas se desarrolla directa o indirectamente a partir del meristemo o de masas celulares indiferenciadas (callo). Este método implica la producción de callo, la diferenciación del meristemo adventicio en órganos (Indacochea *et al.*, 2019).

Enraizamiento

Los brotes cultivados *in vitro* por lo general carecen de sistema radicular. Para inducir el enraizamiento se utiliza un medio de media concentración suplementado con auxina, algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces durante la fase de multiplicación en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas (Castillo, 2014).

Composición del medio de cultivo

Uno de los factores más importantes que rigen el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos vegetales en cultivo es la composición del medio de cultivo. Los requisitos básicos de nutrientes de las células vegetales cultivadas son muy similares a los de las plantas enteras. Los requisitos básicos de los elementos minerales requeridos para el crecimiento de los tejidos

vegetales se cumplen proporcionando sus sales comunes en el medio (Abobkar & Ahmed, 2012). Los medios de cultivo de tejidos vegetales proporcionan no solo estos nutrientes inorgánicos, pero generalmente un carbohidrato (la sacarosa es la más común) para reemplazar el carbono que la planta normalmente fija de la atmósfera mediante la fotosíntesis. Para mejorar el crecimiento, muchos medios también incluyen pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos, en particular vitaminas y reguladores del crecimiento de las plantas (Sharry *et al.*, 2015).

Macronutrientes

Los macronutrientes son los componentes que las plantas necesitan en mayor o mayor cantidad. Proporcionan los seis elementos principales; nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre además de oxígeno, carbono e hidrógeno. La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar las máximas tasas de crecimiento varía considerablemente entre las especies. Entre los elementos más importantes tenemos al nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), deben controlarse las concentraciones de cada uno, de lo contrario puede ocasionar desordenes fisiológicos, el nitrógeno es el principal elemento para el desarrollo de las plantas, si es mal administrado puede producir la vitrificación de los tejidos, es recomendable reducir las dosis para ciertas especies (Rodríguez & Flórez, 2004).

Micronutrientes

Los micronutrientes son elementos requeridos por las plantas en pequeñas cantidades, que no suelen superar los pocos miligramos. Los micronutrientes esenciales para el crecimiento de células y tejidos vegetales incluyen hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno. Conocidos como oligoelementos se proporcionan en bajas concentraciones, la mayor parte de estos elementos son parte de grupos catalíticos y sistemas enzimáticos que se activan durante el desarrollo de la planta (Sillanpaa, 1972).

Vitaminas

Las vitaminas son compuestos requeridos para las células vegetales como intermediarios esenciales o catalizadores metabólicos. Sin embargo, las células y los tejidos vegetales cultivados pueden ser deficientes en algunos factores; el crecimiento y la supervivencia se mejoran entonces mediante su adición al medio de cultivo. En los primeros trabajos, las necesidades de los cultivos de tejidos en cuanto a trazas de determinadas sustancias orgánicas se satisfacían con suplementos "no definidos", como zumos de frutas, leche de coco, extractos de levadura o malta y caseína hidrolizada. Estos suplementos pueden aportar vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento a un medio de cultivo. El uso de suplementos no definidos ha disminuido al definirse la necesidad de compuestos orgánicos específicos, que han pasado a figurar en los catálogos como productos químicos puros (Perea, 2009).

Fuente de Carbono

Los carbohidratos desempeñan un papel importante en los cultivos *in vitro* como fuente de energía y de carbono, así como de agente osmótico. Además, se conoce la expresión génica modulada por los carbohidratos en las plantas (Koch, 1996). Las respuestas de los genes de las plantas a los cambios en el estado de los carbohidratos pueden variar notablemente. Algunos genes se inducen, otros se reprimen y otros se ven mínimamente afectados. Sin embargo, para el cultivo normal de células, tejidos u órganos, es necesario incorporar una fuente de carbono al medio. La sacarosa se utiliza casi universalmente para los fines de micropropagación, ya que es generalmente utilizable por los cultivos de tejidos. El azúcar blanco doméstico refinado es suficientemente puro para la mayoría de los fines prácticos. La presencia de sacarosa en los medios de cultivo de tejidos inhibe específicamente la formación de clorofila y la fotosíntesis, haciendo que el crecimiento autotrófico sea menos factible (Pérez, 2017).

Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento pueden ser sintetizados por la planta o producidas en laboratorio, regulan el crecimiento, desarrollo y metabolismo vegetal, podemos encontrar 4 grandes grupos principales: auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno (Villanueva *et al.*, 2013).

Las auxinas esencialmente promueven la elongación celular y expansión de los tejidos, las citoquininas estimulan el crecimiento, desarrollo y la división celular; también inhiben la dominancia apical y retardan el envejecimiento, se debe controlar la concentración de estos componentes por el bien del objetivo de investigación (Arroyo *et al.*, 2014).

Un exceso de auxina suele dar lugar a una proliferación de raíces, mientras que un exceso de citoquinina puede producir brotes, un equilibrio entre la auxina y la citoquinina suele producir un crecimiento desordenado de células o callo, independientemente la morfología del brote dependerá de la especie de la planta y de la composición del medio (Villanueva *et al.*, 2013). Okazawa *et al.* (1967) investigaron el efecto del AIA (ácido indol-3-acético), IBA (ácido indol-3-butírico) y la kinetina (KIN) en un amplio rango de concentraciones.

6-Bencil amino purina

La 6-bencilaminopurina es una citoquinina que funciona como promotor de crecimiento, se la conoce como la primera citoquinina sintética aplicada, de alto peso molecular es aplicada como un regulador de crecimiento para una gran variedad de plantas y se caracteriza por acelerar el crecimiento celular. La 6-bencilaminopurina estimula los siguientes efectos: división celular; aparición de yemas laterales; formación de brotes basales y floración (Plantigen, 2017).

Medio Murashige y Skoog

El medio Murashige y Skoog (MS) fue formulado originalmente por Murashige y Skoog en 1962 para optimizar el sistema de bioensayo de callos. Desde entonces, se utiliza

ampliamente para la micropropagación, el cultivo de órganos, el cultivo de callos y el cultivo en suspensión. La formulación es una mezcla de nutrientes de sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos. El medio Murashige y Skoog (MS) proporciona todos los macroelementos y microelementos esenciales. Los microelementos desempeñan un papel vital en el metabolismo de las plantas. La tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y el inositol actúan como cofactores enzimáticos (Plantigen, 2017).

Agente gelificante

En la multiplicación *in vitro*, el uso de un medio de cultivo apropiado para cada etapa del cultivo es un requisito esencial; estos medios proporcionan los nutrientes necesarios para el metabolismo de las células vegetales en cultivo para el crecimiento y la diferenciación de los tejidos (Kozai *et al.*, 1997). La mayoría de los estudios de micropropagación de papa *in vitro* utilizan el medio de cultivo en estado semisólido, ya que proporcionan tasas de multiplicación satisfactorias de los clones seleccionados (Dutra *et al.*, 2010). Sin embargo, los datos encontrados en la literatura difieren en cuanto a la consistencia adecuada para la papa. El uso del medio de cultivo líquido ha proporcionado una eficiencia igual o incluso mayor para la tasa de multiplicación del material vegetal (Veitía *et al.*, 2012).

Hipótesis

Los brotes etiolados representan una fuente de regeneración de plantas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. variedad Superchola.

Capítulo III: Materiales y métodos

Localización del proyecto

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la empresa Conectiflor Andino Cía. Ltda. ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Cayambe, sector Guachalá a una latitud de 0°00'07.1"S y longitud de 78°28'00.3"W.

Obtención del Material Vegetal

Para la ejecución del proyecto el material vegetal se adquirió en el mercado de San Blas, el material solicitado era papas variedad Superchola para todo el ensayo, el día de recogida del material se verificaba que este pertenezca a variedad Superchola. Los tubérculos eran entregados personalmente por el distribuidor, una vez verificada la variedad por observación se transportaron al sitio del ensayo para realizar los pretratamientos de desinfección y brotación de los tubérculos.

El material vegetal principalmente fueron brotes frescos etiolados de la variedad de papa *Solanum tuberosum* L., las primeras semanas se prepararon los tubérculos para brotación, para ello se seleccionaron los tubérculos medianos y vigorosos y que no presenten brotes, primero se limpiaron con agua destilada el exceso de tierra y se sometieron a un lavado con Tween 20, finalmente se expusieron a un tratamiento de ácido giberélico (0.5 g/L) para promover la brotación.

En bandejas con buena aireación se colocaron los tubérculos, las muestras estaban secas, estas se ubicaron en un cuarto de crecimiento dentro de cajas para tener condiciones de oscuridad y la temperatura de 24 °C, después se aplicó rigurosamente la solución de brotación de ácido giberélico (0.5 g/L), esto se realizó 2 veces por semanas los primeros 15 días de este ensayo de brotación.

Medios de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para las etapas de introducción y multiplicación fue Murashige & Skoog (1962) (Anexo1). En su composición se añadieron durante todas las fases sacarosa (30 g/L), agar (6 g/L), vitaminas (1mL/L) y reguladores de crecimiento del tipo citoquininas (6-BAP) y auxinas (ANA), de acuerdo a la fase en la que nos encontremos se aplicaran cada una de las concentraciones por tratamiento señalados. El pH se ajustó antes de colocar el agar a 5.7-5.8 con KOH o H₂SO₄ (1 N). En tubos de ensayo (150 mm x 25 mm) se dispensó 10 mL del medio de cultivo con sus componentes disueltos y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 1.06 kg/cm² durante 15 minutos.

Condiciones de cultivo del explante

Los explantes en el cuarto de crecimiento se incubaron a una temperatura media de 20 ± 2 °C y densidad lumínica de 28 ± 5 μmol/m²/s de luz blanca de lámparas LED, con un fotoperiodo de 16 h (Rafique *et al.*, 2014). Durante las etapas de establecimiento y multiplicación se mantuvieron estas condiciones de crecimiento.

Descripción de los Ensayos

Etapas I: Establecimiento *in vitro*

Selección y tratamiento de los explantes

El material vegetal se tomó de los tubérculos que presentaron brote etiolados vigorosos y visualmente no exhibían contaminación, se recolectaron brotes de 1 a 2 cm aproximadamente cortando desde la base de unión al tubérculo y se colocaron en un frasco con agua destilada estéril para las siguientes técnicas de desinfección.

Desinfección e introducción de explantes

Primero se desechó el agua de los frascos y se realizó un lavado con Tween 20 (1% v/v) por 5 min para la limpieza superficial de los explantes, a continuación, se retiró el agua de lavado y se realizaron 3 lavados con agua estéril con un minuto de duración en cada lavado, después se colocó etanol al 70% y se realizó un lavado por 30 segundos, y finalmente se realizó 3 lavados más con agua estéril por un minuto. Se colocó el agua destilada para transportar los explantes para su tratamiento dentro de cámara. Ahí se evaluaron 3 concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.25, 0.5 y 1% v/v con Tween 20 (0.1% v/v) bajo 2 tiempos de inmersión (5 y 10 minutos) (Araque et al., 2018). Después se realizó un último lavado con agua destilada con 3 repeticiones por un minuto. Para finalizar dentro de cámara se eliminaron todas las partes oxidadas producto de la desinfección y se inocularon en un medio de cultivo (MS completo) con 0.02mg/L de ANA para la estimulación de brotación (Rafique *et al.*, 2014). En la Tabla 2 podemos ver cada uno de los 6 tratamientos que se desarrollaron.

Tabla 2.

Tratamientos para las etapas de desinfección e introducción de explantes.

Tratamiento	Concentración hipoclorito de sodio (%v/v)	Tiempo inmersión (min)
T1	0.25	5
T2	0.5	5
T3	1	5
T4	0.25	10
T5	0.5	10
T6	1	10

Los tratamientos para este ensayo se dispusieron en un diseño factorial de 3x2 con 10

explantes colocados en tubos independientes para cada tratamiento, la unidad experimental para el análisis estadístico se formó con 10 tubos de ensayo. Cada tratamiento se realizó por triplicado para un total de 30 tubos.

Las variables consideradas para este ensayo son la contaminación (hongo y bacteria), oxidación y viabilidad de los explantes y esto se evaluó desde la segunda semana hasta la cuarta semana del ensayo de inoculación. Las variables se evaluaron por observación, bajo propio criterio en base al protocolo que la empresa utiliza. Dependiendo de la presencia de contaminación bacteriana o fúngica los tubos eran desechados y se tomaba el dato. Las variables oxidación de igual forma se tomaban bajo observación, si existía un pardeamiento del tejido era desechado. Al final el dato de viabilidad se tomó de los explantes que sobrevivieron a todo el proceso antes señalado.

Etapa II: Multiplicación

Para esta etapa se analizó el regulador de crecimiento 6 - bencil amino purina (BAP), en la fase de multiplicación como un componente básico para el medio MS como indicaron diversos estudios *in vitro* de papa, para ello se evaluó la concentración de BAP a 0.1, 0.5 y 1 mg/L (Rafique *et al.*, 2014; Araque *et al.*, 2018; Cárdenas & Espinoza, 2014).

Para este análisis se efectuó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 4 tratamientos con un testigo y 3 concentraciones de regulador de crecimiento, se usaron 15 explantes por cada tratamiento que se distribuyeron uniformemente en cada tubo de ensayo. Cada tratamiento se realizó por triplicado. La variable índice de multiplicación, longitud de los brotes y vigorosidad del explante, fueron observadas hasta la tercera semana del cultivo. En la Tabla 3 se puede evidenciar los tratamientos que se aplicaron para esta etapa.

Tabla 3.

Tratamientos formados con regulador de crecimiento (6-BAP) en el medio MS de cultivo para multiplicación de brotes nodales.

Tratamiento	Concentración de BAP (mg/L)
Control	0
T1	0.1
T2	0.5
T3	1

Teniendo en cuenta la cantidad de brotes que se obtuvo de cada subcultivo, se evaluó:

1) Tasa de multiplicación que es el número de explantes total final que se utilizaran dividido por la cantidad inicial de explantes obtenidos por cada tubo de ensayo con plantas, esto se evaluó al final de la multiplicación de cada brote;

2) La longitud de los brotes, esto se realizó con una regla previamente desinfectada dentro de cámara y el dato se tomó en milímetros;

3) La vigorosidad de los explantes multiplicados, esta variable solo se evaluó con una observación final de los explantes multiplicados.

Capítulo IV: Resultados

Etapa I: Establecimiento *in vitro*

En esta fase se evaluaron los 6 tratamientos propuestos y los resultados se presentan a continuación.

Contaminación Bacteriana

Para la contaminación bacteriana dado que los datos no siguen una distribución normal, se realizó un análisis con Kruskal Wallis, donde se encontró que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) para cada uno de los tratamientos empleados en desinfección para este tipo de contaminación (Tabla 4).

Tabla 4.

Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación bacteriana significativo al 5%.

Tratamiento	N	Medias(%)	D.E.	H	P
T1	3	23.33	5.77	6.43	0.2075
T2	3	6.67	11.55		
T3	3	10	10		
T4	3	13.33	11.55		
T5	3	3.33	5.77		
T6	3	6.67	5.77		

En el análisis para los promedios de contaminación bacteriana, se puede observar que el tratamiento 1 (NaClO 0.25% v/v y 5 minutos de tiempo inmersión) es el tratamiento que presenta mayor porcentaje de contaminación (23.33 ± 5.8), mientras que el tratamiento 5 (NaClO 0.5% v/v y 10 minutos de tiempo de inmersión) presenta el menor porcentaje de contaminación ($3.33 \pm$

5.8) (Tabla 5 y Figura 3).

Tabla 5.

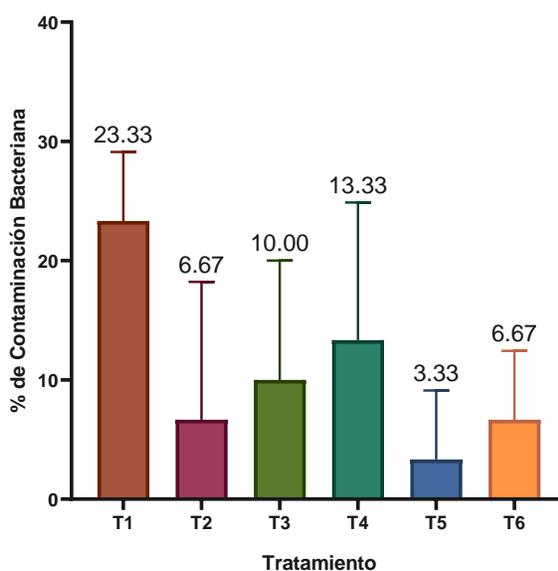
Promedio del porcentaje de contaminación bacteriana para cada uno de los tratamientos analizados.

Tratamiento	NaClO (%v/v)	Tiempo (min)	Promedio
T1	0.25	5m	23.33 ± 5.77
T2	0.5	5m	6.67 ± 11.5
T3	1	5m	10.00 ± 10
T4	0.25	10m	13.33 ± 11.5
T5	0.5	10m	3.33 ± 5.8
T6	1	10m	6.67 ± 5.8

Nota. Cada valor es el promedio en porcentaje ± DE para cada tratamiento.

Figura 3.

Porcentaje de contaminación bacteriana en cada uno de los tratamientos analizados.



En el análisis de contingencia para los factores, se encontró que no existe dependencia entre los factores tiempo de inmersión y concentración de NaClO para la variable contaminación bacteriana (Tabla 6).

Tabla 6.

Análisis de Contingencia para los factores concentración y tiempo de inmersión para la variable contaminación Bacteriana.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.04	2	0.9810
Chi Cuadrado MV-G2	0.04	2	0.9810
Coef.Contig.Cramer	0.03		
Coef.Contig.Pearson	0.04		

Contaminación Fúngica

Para la contaminación fúngica dado que los datos de la variable no siguen una distribución normal, se realizó un análisis Kruskal Wallis, donde se encontró que existen diferencias significativas en al menos uno de los tratamientos empleados en desinfección para este tipo de contaminación (Tabla 7). Se observa también dos rangos de significación donde los tratamientos 5,2,6 y 3 se encuentran en el primer rango y los tratamientos 1,4,3 y 6, en el segundo rango, existen tratamientos solapados (Tabla 8).

Tabla 7.

Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación fúngica significativo al 5%.

Tratamiento	N	Medias(%)	D.E.	H	P
T1	3	46.67	15.28	13.01	0.0160
T2	3	6.67	5.77		
T3	3	13.33	5.77		
T4	3	30.00	10.00		
T5	3	3.33	5.77		
T6	3	13.33	5.77		

Tabla 8.

Comparación de a pares del ensayo de desinfección para contaminación fúngica.

Tratamiento	Medias (%)	Ranks	
T5	3.33	3.67	A
T2	6.67	5.33	A
T6	13.33	8.67	A B
T3	13.33	8.67	A B
T4	30.00	14.17	B
T1	46.67	16.50	B

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

En el análisis para los promedios de contaminación fúngica, se puede observar que el tratamiento 1 (NaClO 0.25% v/v y 5 minutos de tiempo de inmersión) es el tratamiento que presenta mayor porcentaje de contaminación (46.67 ± 15.3), mientras que el tratamiento 5 (NaClO 0.5% v/v y 10 minutos de tiempo de inmersión) presenta el menor porcentaje de

contaminación (3.33 ± 5.8) (Tabla 9 y Figura 4).

Tabla 9.

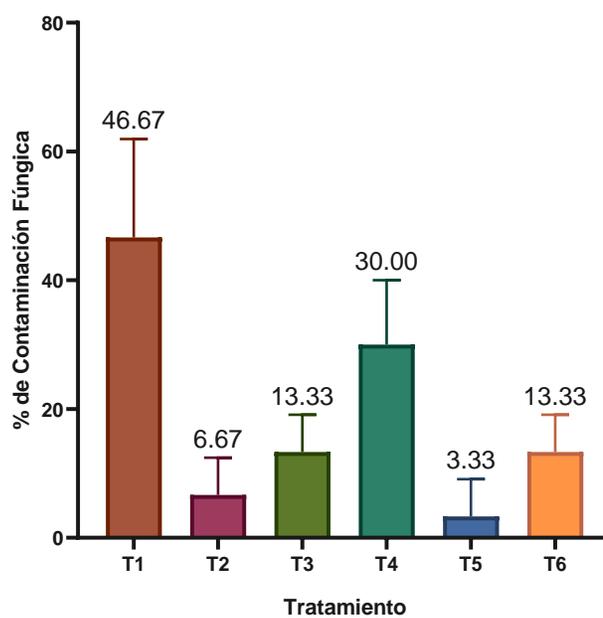
Promedios del porcentaje de contaminación fúngica para cada uno de los tratamientos analizados.

Tratamiento	NaClO (%v/v)	Tiempo (min)	Promedio
T1	0.25	5m	46.67 ± 15.3
T2	0.5	5m	6.67 ± 5.8
T3	1	5m	13.33 ± 5.8
T4	0.25	10m	30.00 ± 10
T5	0.5	10m	3.33 ± 5.8
T6	1	10m	13.33 ± 5.8

Nota. Cada valor es el promedio en porcentaje ± DE para cada tratamiento.

Figura 4.

Porcentaje de contaminación fúngica en cada uno de los tratamientos.



En el análisis de contingencia para los factores analizados, se encontró que no existe dependencia entre el tiempo de inmersión y concentración de NaClO para la variable contaminación fúngica (Tabla 10).

Tabla 10.

Análisis de Contingencia para los factores concentración y tiempo de inmersión al analizar la variable contaminación fúngica.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0.37	2	0.8298
Chi Cuadrado MV-G2	0.37	2	0.8307
Coef.Contig.Cramer	0.07		
Coef.Contig.Pearson	0.10		

Contaminación Total (Bacterias y Hongos)

Respecto a la contaminación total, los datos de esta variable no siguen una distribución normal, se realizó un análisis con Kruskal Wallis. El resultado de esto nos indica que existen diferencias significativas para al menos uno de los tratamientos empleado en desinfección (Tabla 11). Se observa también dos rangos de significación donde los tratamientos 5,2,6 y 3 se encuentran en el primer rango y los tratamientos 1,4,3 y 6 en el segundo rango, existen tratamientos solapados (Tabla 12).

Tabla 11.

Análisis inferencial Kruskal Wallis para contaminación total (bacteria y hongo) significativo al 5%.

Tratamiento	N	Medias (%)	D.E.	H	P
T1	3	70.00	17.32	14.95	0.0077
T2	3	13.33	5.77		
T3	3	23.33	5.77		
T4	3	43.33	5.77		
T5	3	6.67	5.77		
T6	3	20	0.00		

Tabla 12.

Comparación de a pares del ensayo de desinfección para contaminación total.

Tratamiento	Medias (%)	Ranks		
T5	6.67	2.67	A	
T2	13.33	5.17	A	
T6	20.00	8.50	A	B
T3	23.33	9.67	A	B
T4	43.33	14.17		B
T1	70.00	16.83		B

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

En el análisis para los promedios de contaminación total, se puede observar que el tratamiento 1 (NaClO 0.25% v/v y 5 minutos de tiempo de inmersión) es el tratamiento presenta mayor porcentaje de contaminación (70 ± 17.3), mientras que el tratamiento 5 (NaClO 0.5% v/v

y 10 minutos de tiempo de inmersión) presenta el menor porcentaje de contaminación (6.67 ± 5.8) (Tabla 13 y Figura 5).

Tabla 13.

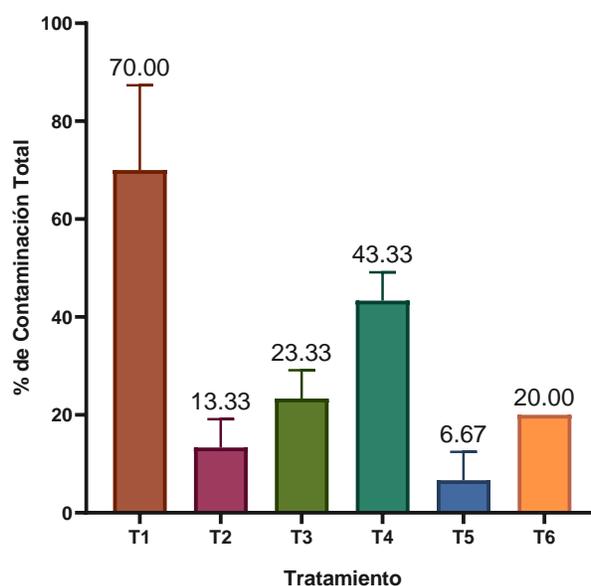
Promedios del porcentaje de contaminación total para cada uno de los tratamientos analizados.

Tratamiento	NaClO (%v/v)	Tiempo (min)	Promedio
T1	0.25	5m	70 ± 17.3
T2	0.5	5m	13.33 ± 5.8
T3	1	5m	23.33 ± 5.8
T4	0.25	10m	43.33 ± 5.8
T5	0.5	10m	6.67 ± 5.8
T6	1	10m	20 ± 0

Nota. Cada valor es el promedio en porcentaje \pm DE para cada tratamiento.

Figura 5.

Porcentaje de contaminación total en cada uno de los tratamientos.



Oxidación

Para el caso de la variable oxidación, los datos siguen una distribución normal y se aplicó un ANOVA para su análisis. Como resultado se observa que para los factores tiempo y concentración existen diferencias significativas, mientras que para la interacción entre estos dos factores no existen diferencias estadísticas (Tabla 14).

Tabla 14.

Análisis de varianza para la variable oxidación respecto a los factores tiempo y concentración, significativo al 5%.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7711.11	5	1542.22	30.84	<0.0001
Tiempo	5677.78	2	2838.89	56.78	<0.0001
Concentración	1800.00	1	1800.00	36.00	0.0001
Tiempo*concentración	233.33	2	116.67	2.33	0.1393
Error	600.0	12	50.00		
Total	8311.11	17			

Respecto a la variable oxidación, para los niveles del factor concentración se observa que existen diferencias significativas, el nivel de NaClO 1% v/v (56.67%) está en el primer rango como el peor respecto a los otros dos niveles del factor 0.5 y 0.25% v/v que están en segundo rango (25 y 15% respectivamente). Por otro lado, para el tiempo existen diferencias significativas entre ambos niveles del factor tiempo siendo el peor tratamiento el nivel con el tiempo a los 10 minutos (42.22%) (Tabla 15 y 16).

Tabla 15.

Prueba de Tukey para la concentración significativa al 5%.

Concentración	Medias (%)	n	E.E	
1	56.67	6	2.89	A
0.5	25.00	6	2.89	B
0.25	15.00	6	2.89	B

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

Tabla 16.

Prueba de Tukey para el tiempo de inmersión significativa al 5%.

Tiempo	Medias (%)	n	E.E	
10 min	42.22	9	2.36	A
5 min	22.22	9	2.36	B

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

En el análisis de los promedios de oxidación, se puede observar que el tratamiento 1 (NaClO de 0.25% v/v y 5 min de tiempo de inmersión) presentó el menor porcentaje de explantes oxidados (63.33 ± 5.8), mientras que el tratamiento 6 (NaClO 1% v/v y 10 min de tiempo de inmersión) presentó el mayor porcentaje de explantes oxidados (6.67 ± 5.8) (Tabla 17 y Figura 6).

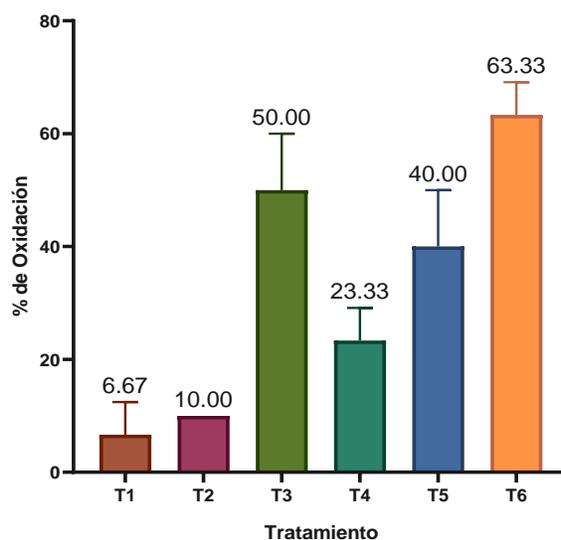
Tabla 17.

Promedio del porcentaje de oxidación de los explantes para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	NaClO (%v/v)	Tiempo (min)	Promedio
T1	0.25	5m	6.67 ± 5.8
T2	0.5	5m	10.00 ± 0
T3	1	5m	50.00 ± 10
T4	0.25	10m	23.33 ± 5.8
T5	0.5	10m	40.00 ± 10
T6	1	10m	63.33 ± 5.8

Figura 6.

Porcentaje de oxidación en cada uno de los tratamientos.



Viabilidad

Para el caso de la variable viabilidad del explante, datos siguen una distribución normal y se aplicó un ANOVA para su análisis. Como resultado se observa que para el factor tiempo hay significación estadística y para el factor concentración alta significación estadística, para la interacción entre estos dos factores no hay diferencias estadísticas (Tabla 18).

Tabla 18.

Análisis de varianza para la viabilidad respecto a las variables tiempo y concentración significativo al 5%.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8177.78	5	1635.56	14.02	0.0001
Concentración	6677.78	2	3338.89	28.62	<0.0001
Tiempo de inmersión	800.00	1	800.00	6.86	0.0224
Tiempo*concentración	700.00	2	350.00	3.00	0.0878
Error	1400.00	12	116.67		
Total	9577.78	17			

El análisis de los niveles de los factores tiempo y concentración para la variable viabilidad de explantes nos indica que, para el factor concentración existen diferencias entre sus niveles, el nivel de NaClO 0.5% v/v (58.33%) está en el primer rango como el mejor respecto a los otros niveles de este factor. Por otro lado, para el factor tiempo de inmersión existen diferencias significativas entre ambos niveles del factor tiempo siendo el mejor el nivel con el tiempo de 5 min (37.78%) (Tabla 19 y 20).

Tabla 19.

Prueba de Tukey para el factor concentración de hipoclorito significativa al 5%.

Concentración	Medias (%)	n	E.E	
0.5	58.33	6	4.41	A
1	18.33	6	4.41	B
0.25	16.67	6	4.41	B

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

Tabla 20.

Prueba de Tukey para el factor tiempo de inmersión significativa al 5%.

Tiempo	Medias (%)	n	E.E	
5 min	37.78	9	3.60	A
10 min	24.44	9	3.60	B

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

En el análisis de los promedios de la variable viabilidad del explante, se puede observar que el tratamiento 2 (NaClO de 0.5% v/v y 5 minutos de tiempo de inmersión) presentó el mayor porcentaje de explantes viables (73.33 ± 1.15), mientras que el tratamiento 6 (NaClO 1% v/v con 10 minutos de tiempo de inmersión) presentó el menor porcentaje de explantes viables (13.33 ± 5.8) (Tabla 21 y Figura 7).

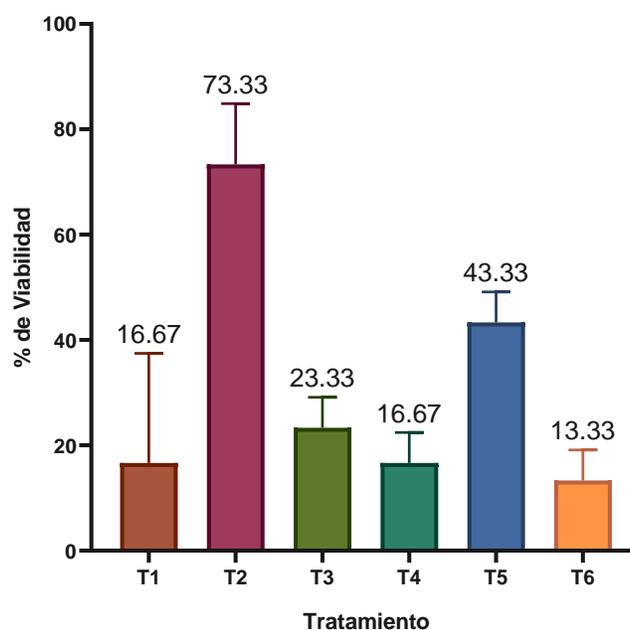
Tabla 21.

Promedio de los porcentajes de viabilidad de los explantes para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	NaClO (%v/v)	Tiempo (min)	Promedio
T1	0.25	5m	16.67 ± 20.82
T2	0.5	5m	73.33 ± 11.55
T3	1	5m	23.33 ± 5.8
T4	0.25	10m	16.67 ± 5.8
T5	0.5	10m	43.33 ± 5.8
T6	1	10m	13.33 ± 5.8

Figura 7.

Porcentaje de viabilidad promedio para cada en cada uno de los tratamientos analizados.

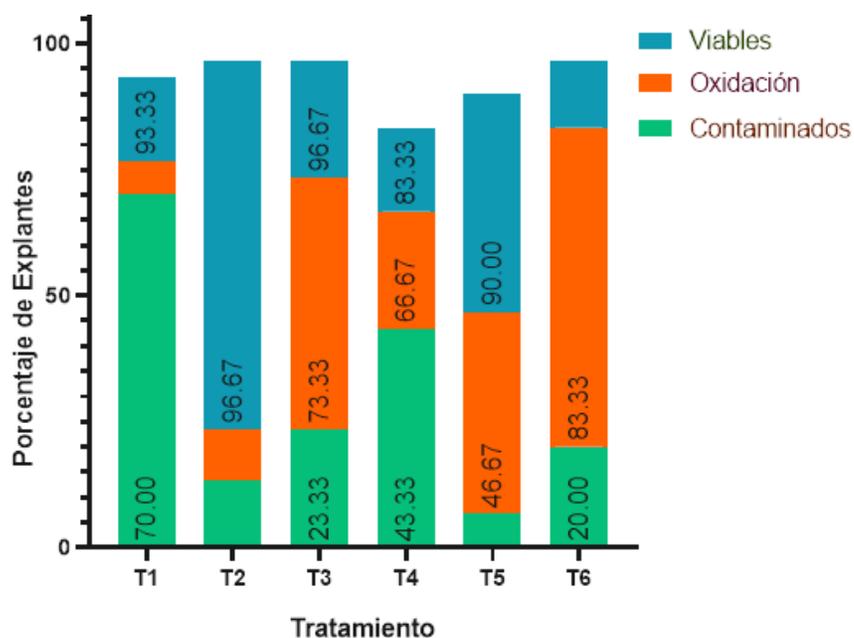


Análisis en conjunto de las variables viabilidad, contaminación y oxidación, consideradas en el ensayo

Al realizar un análisis gráfico en proporción para las 3 variables en conjunto (Figura 8) se puede evidenciar que altas tasas de contaminación y oxidación son un indicador de bajos porcentajes de viabilidad, los mejores tratamientos para esta etapa son el de NaClO 0.5% v/v con 5 minutos de inmersión, que bajas concentraciones de NaClO dan como resultado altos porcentajes de contaminación, y que un tiempo de inmersión alto junto con altas concentraciones de NaClO dan como resultado altas tasas de oxidación.

Figura 8.

Porcentaje de viabilidad, oxidación y contaminación de los explantes en cada uno de los tratamientos.



Etapa II: Multiplicación

Longitud de los Brotes

Los resultados de longitud presentan una distribución normal y se analizaron bajo un ANOVA. El resultado de la prueba presentó diferencias altamente significativas para los tratamientos analizados (Tabla 22).

Tabla 22.

Análisis de la varianza para la variable longitud de los brotes en la etapa de multiplicación.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20610.24	3	6870.08	128.06	<0.0001
Medio	20610.24	3	6870.08	128.06	<0.0001
Error	9441.87	176	53.65		
Total	30052.11	179			

La prueba de Tukey nos indica que las medias de la longitud son diferentes en cada uno de los tratamientos propuestos y se observan cuatro rangos para el primer rango como mejor tratamiento se encuentra M1 (50.53 mm) seguido por el control (44.98 mm) y los tratamientos M3 (32.16 mm) y M2 (23.22) respectivamente (Tabla 23).

Tabla 23.

Prueba de Tukey para longitud de los brotes en la etapa de multiplicación significativa al 5%.

Medio	Medias (mm)	n	E.E		
M1	50.53	45	1.09	A	
Control	44.98	45	1.09		B
M3	32.16	45	1.09		C
M2	23.22	45	1.09		D

Nota. Medias con letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Se puede observar que el tratamiento M1 (MS con 0.1 mg/L de 6-BAP) es el que presenta una mayor longitud de brotes (50.53 mm), seguido por el control que no presentaba 6-BAP. En el caso de los otros 2 tratamientos (M3 y M2) se encuentran por debajo (32.16 y 23.22 mm)

respectivamente (Tabla 24 y Figura 9).

Tabla 24.

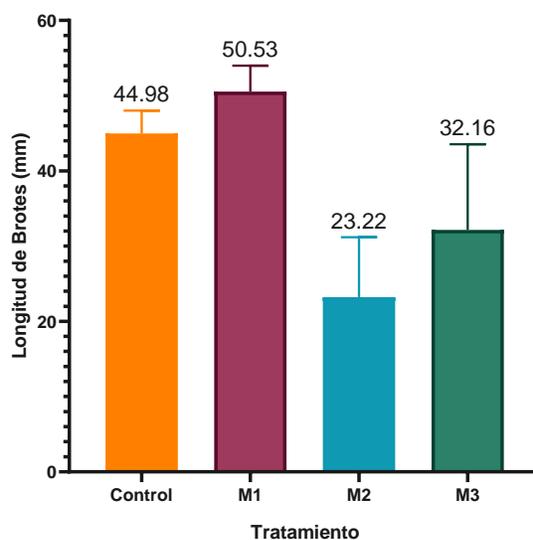
Promedio de Longitud en mm de brotes por explante para cada tratamiento de 6-BAP analizado.

Tratamiento 6-BAP (mg/L)	Longitud (mm)		PROMEDIO (mm)
	Mín	Máx	
Control (Sin 6-BAP)	40.00	50.00	44.98 ± 3.03
M1 6-BAP (0.1)	45.00	55.00	50.53 ± 3.45
M2 6-BAP (0.5)	12.00	40.00	23.22 ± 7.97
M3 6-BAP (1)	15.00	50.00	32.16 ± 11.40

Nota. Cada valor es el promedio en mm ± DE para cada tratamiento.

Figura 9.

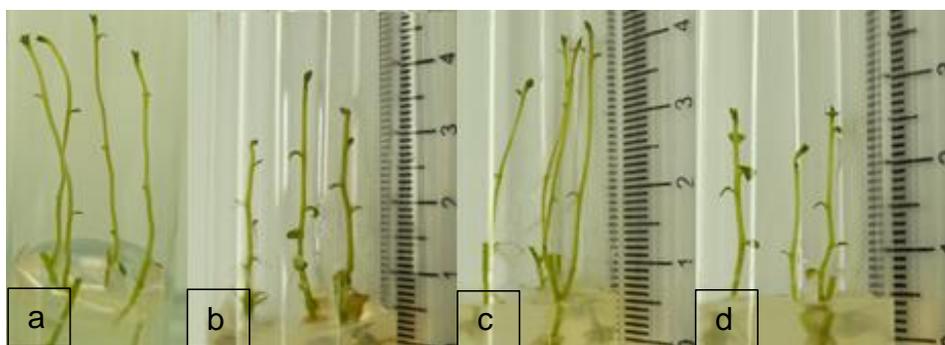
Gráfico de longitud promedio (mm) de brotes de papa para cada tratamiento de multiplicación.



En la figura 10 se puede observar varios ejemplos de brotes por cada tratamiento antes de tomar la medida.

Figura 10.

Brotos de papa a las 2 semanas del cultivo en la etapa de multiplicación y concentraciones de 6-BAP: (a) control, (b) 0.1 mg/L, (c) 0.5 mg/L, (d) 1mg/L.

**Índice de Multiplicación**

Para el índice de multiplicación dado que los datos no siguen una distribución normal, se realizó un análisis Kruskal Wallis, donde se encontró que existen diferencias significativas en al menos uno de los tratamientos empleado para la multiplicación (Tabla 25). Se observa 3 rangos de significación donde los tratamientos M3 y M2 se encuentran en el primer rango, los tratamientos M2 y M1 se encuentran en el segundo rango y los tratamientos M1 y Control en el tercer, existen tratamientos solapados (Tabla 26).

Tabla 25.

Análisis inferencial Kruskal Wallis para el índice de multiplicación significativo al 5%.

Tratamiento	N	Medias (# brotes)	D.E.	H	P
Control	45	7.40	0.69	20.27	<0.0001
M1	45	7.09	0.73		
M2	45	6.89	0.78		
M3	45	6.58	0.87		

Tabla 26.

Comparación de a pares del ensayo para índice de multiplicación.

Tratamiento	Medias (# brotes)	Ranks		
M3	6.58	67.60	A	
M2	6.89	83.28	A	B
M1	7.09	95.74	B	C
Control	7.40	115.38		C

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

En el análisis para los promedios del índice de multiplicación, se puede observar que el tratamiento M1 (0.1mg/L) y el control tienen los índices de multiplicación mayores con 7.09 y 7.40 respectivamente, mientras que el tratamiento M3 (1mg/L) presenta el menor índice de multiplicación con 6.58 (Tabla 27 y Figura 11).

Tabla 27.

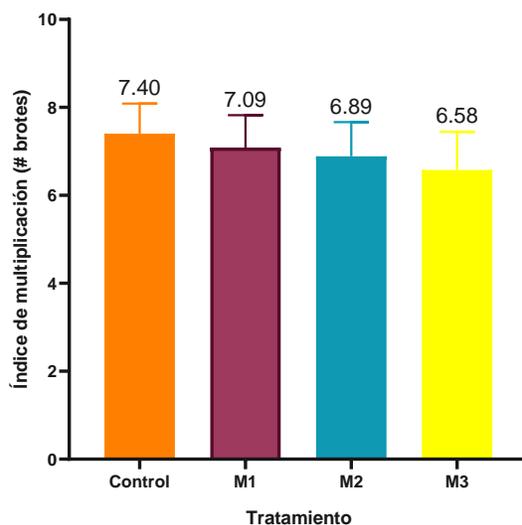
Promedios del índice de multiplicación para cada uno de los tratamientos analizados.

Tratamiento	Promedio
6-BAP (mg/L)	(# brotes)
Control	7.40 ± 0.69
M1 6-BAP (0.1)	7.09 ± 0.73
M2 6-BAP (0.5)	6.89 ± 0.78
M3 6-BAP (1)	6.58 ± 0.87

Nota. Cada valor es el promedio ± DE para cada tratamiento.

Figura 11.

Índice de multiplicación de papa para cada uno de los tratamientos de 6-BAP.

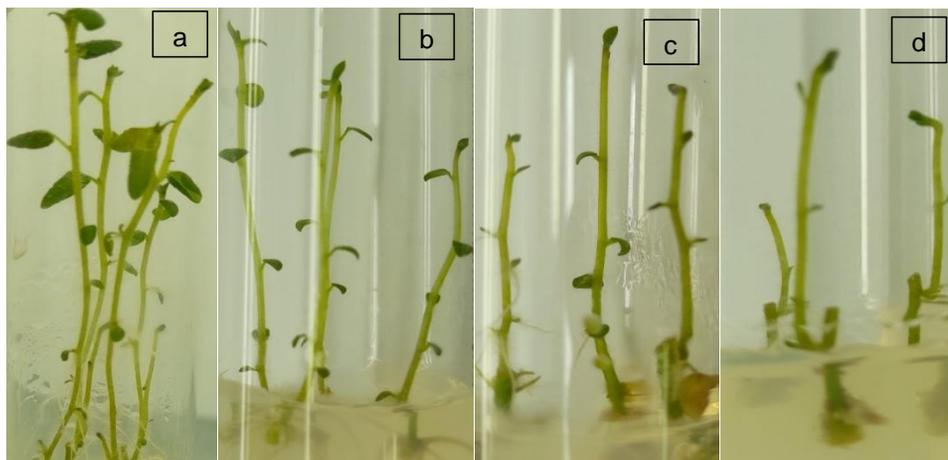


Vigorosidad

Para el caso de la variable vigorosidad del explante multiplicado hasta las 3 semanas de observación todos los explantes mostraron buenas condiciones, una coloración verde adecuada, se muestran imágenes que muestran una vigorosidad adecuada observable para cada tratamiento (Figura 12).

Figura 12.

Brotos de papa a las 3 semanas del cultivo en la etapa de multiplicación y concentraciones de 6-BAP: (a) control, (b) 0.1 mg/L, (c) 0.5 mg/L, (d) 1 mg/L.



Capítulo V: Discusión

Etapa de Establecimiento

Para la fase de brotación obtuvimos para nuestro ensayo brotes etiolados hasta la tercera semana, parte de los brotes que se presentaron tenían una coloración blanquecina y se veían poco vigorosos, como indica Kalt *et al.* (1999) uno de los principales problemas a los que se enfrenta la producción de semilla de papa es la escasa brotación, debida a la latencia, que conduce a un retraso en la plantación y a una escasa emergencia y vigor del cultivo. Para que este protocolo de propagación sea óptimo, la disponibilidad oportuna de tubérculos de papa recién germinados es un prerrequisito para alcanzar altos rendimientos.

En nuestro tratamiento de brotación, el almacenamiento de los tubérculos se lo realizó en cajas de cartón y durante el ensayo se utilizó condiciones de completa oscuridad para obtener los brotes etiolados, sin embargo, hay nuevos protocolos de brotación que pueden ser más eficientes. El almacenamiento con luz difusa (ALD) desarrollado por el Centro Internacional de la Papa (CIP) puede utilizarse para el almacenamiento acortando el ciclo vegetativo (Demo *et al.*, 2004). Bajo observación, nuestro protocolo de brotación produce una gran cantidad de brotes etiolados y nuestros brotes se desempeñaron eficazmente en la fase de desinfección, no obstante, se ha comprobado que el almacenamiento en ALD retrasa el envejecimiento fisiológico de los tubérculos de papa y reduce la dominancia apical, lo que da lugar a un mayor número de tallos por tubérculo, brotes cortos y firmes. Estos reportes se podrían contrastar con el resultado nuestros brotes, que a simple vista mostraron ser los adecuados, pero teniendo en cuenta las variaciones de concentración de hipoclorito que tuvieron que ajustarse y el aún alto grado de oxidación en los tratamientos como T6 para desinfección (1% v/v NaClO y 10 min) con un 63% de oxidación hay que considerar nuevas técnicas para mejorar el protocolo. Para concluir con esta parte en literatura se señala que cuando los tubérculos de semilla de papa se almacenan bajo ALD se producen menos pérdidas de almacenamiento por plagas y enfermedades y se

facilita el control de humedad (Demo *et al.*, 2004).

Para el aumentar la brotación de nuestros tubérculos aplicamos una solución de ácido giberélico, este es uno de los promotores de crecimiento para acelerar la brotación de los muchos existentes en laboratorio, sin embargo, las gibelinas han demostrado ser más estimulantes para la brotación de las semillas de patata (Shibairo *et al.*, 2006) e incluso se utilizan en su mantenimiento para preparar tubérculos de calidad en términos de salud y vigor (Demo, 2002).

Para el caso de papa los desinfectantes más utilizados son el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el etanol, el cloruro mercúrico en los protocolos de cultivo *in vitro* (Ahad *et al.*, 2017), para nuestro ensayo utilizamos 2 de estos componentes que son alcohol y el hipoclorito de sodio en tres concentraciones. Esta elección de desinfectantes concuerda con los experimentos de Badoni & Chauhan (2010), donde se encontró que el NaClO era mejor para controlar la contaminación de la papa. Goodwin *et al.* (1980) tuvo la misma elección, su protocolo buscaba desinfectar los brotes de ocho cultivares diferentes con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1%, sus ensayos exhibieron buenos resultados.

Como indica Ajayi *et al.* (2006), en su protocolo utilizaron hipoclorito de sodio para su proceso de desinfección, encontraron que el porcentaje de esterilización se incrementaba significativamente con el aumento de la concentración y el tiempo de inmersión, en el caso de nuestro ensayo, los tratamientos T1 (0.25 % v/v NaClO y 5 min) y T4 (0.25 % v/v NaClO y 10 min) exhibieron los porcentajes de contaminación más altos con un 70 y 43.33% respectivamente, después hubo una disminución de la contaminación seguida de un aumento de la concentración de hipoclorito de sodio tratamientos T2 y T5 (ambos 0.5 %v/v NaClO), sin embargo esto no ocurrió con las concentraciones más altas (T3 y T6) que al contrario mostraron un incremento en su porcentaje de contaminación.

En nuestro ensayo después de todos los análisis podemos ver que los efectos de las variables concentración y tiempo son independientes, estadísticamente la variación de los niveles

de estos factores no mostró afectar el grado de contaminación, sin embargo, matemáticamente se encontró que el tratamiento 5 (0.5 % v/v NaClO y 10 min) es el mejor para controlar la contaminación bacteriana ya que presentó solo un 3.33% de contaminación. Esto concuerda con González & Chavarría (2016), que utilizaron concentraciones de hipoclorito (0.5-2.5% v/v) y tiempos similares (10 y 15 min) durante su ensayo de propagación y obtuvieron un 100% de desinfección en sus ensayos.

Muy similar a nuestro tratamiento 5 (0.5 % v/v NaClO y 10 min), Polo (2019) que trabajó con la misma variedad Superchola para sus ensayos de propagación encontraron que concentraciones entre 0.5%-0.7% v/v para yemas y tiempos entre los 5 y 10 minutos de inmersión son condiciones adecuadas para el establecimiento con un 100% de desinfección en sus ensayos.

En la mayoría de ensayos de cultivo *in vitro* que trabajan con papa, se evalúa la contaminación de manera general, en nuestros resultados la contaminación fúngica alcanza hasta un 46.67% en el tratamiento 1 (0.25 % v/v y 5 min) y respecto a la contaminación total es la que más se presenta en todos los tratamientos. En literatura se indica que los hongos y las levaduras pueden controlarse eliminando el material contaminado, o desinfectando previamente el material vegetal antes del tratamiento de brotación (Morais *et al.*, 2018). Pero parece necesario un desinfectante fúngico para mejorar el rendimiento de desinfección.

Naik & Chandra, (1993) recomendaron enjuagar primero los brotes con etanol al 20% durante 30 segundos, seguido de 10 minutos de agitación con una solución de hipoclorito de sodio al 25% (v/v) con 1-2 gotas de Tween-20. En el caso de nuestro ensayo utilizamos alcohol al 70% por 30 segundos en la etapa de desinfección, de manera similar Polo (2019) y Ahad *et al.*, (2017) utilizaron etanol a esta concentración y en combinación con hipoclorito de sodio para su proceso de desinfección con buenos resultados, un ensayo de Morales, (2016) donde probaron múltiples concentraciones de alcohol e hipoclorito de sodio muestran que la

concentración de alcohol al 70%, con una concentración de hipoclorito de sodio dentro de los rangos 0.8 al 1% (v/v) alcanzan solo un 10% de contaminación, en nuestro ensayo obtuvimos un resultado similar bajo las mismas condiciones con un porcentaje del 6.67% de contaminación total para el tratamiento 5.

La oxidación tuvo su mayor porcentaje en el tratamiento 1 (NaClO 1% v/v y 10min), Chinnappan (2018) indica que uno de los principales problemas asociados a la oxidación son los compuestos fenólicos liberados del extremo cortado de los explantes, ya que esto conduce a la muerte celular. Sin embargo, López, (2019) indica que la manipulación y exposición de los explantes jóvenes a condiciones no aptas para su desinfección son las que producen la oxidación, al parecer nuestra variedad es más sensible a los procesos de desinfección, solo con el tratamiento 1 (0.25 % v/v y 5 min) se obtuvo una oxidación por debajo del 10%, sin embargo, en este tratamiento es donde se presenta mayor contaminación total (70%).

Los porcentajes de viabilidad no son un problema por lo general en esta especie vegetal, Polo (2019) y Ahad *et al.*, (2017) alcanzaron hasta un 100% de viabilidad en sus ensayos, por nuestro lado nosotros conseguimos con el tratamiento 2 (NaClO de 0.5% v/v y 5 minutos) un porcentaje del 73.33%. En el ensayo de establecimiento de Qureshi *et al.*, (2017) practicó un protocolo similar al de nuestro ensayo para 6 variedades diferentes de papa y evidencio un 92.2% de viabilidad para sus explantes.

Multiplicación

La iniciación y multiplicación de brotes es un problema duradero del cultivo de tejidos de papa (Ajayi *et al.*, 2006), en nuestro ensayo se mostraron buenos resultados con la longitud y el índice de multiplicación para el caso de la variedad Superchola. En nuestro ensayo utilizamos 6-BAP como regulador de crecimiento en esta etapa, Jarret *et al.* (1980) y Kikuta & Okazawa, (1984) fueron quienes encontraron la mejor iniciación de brotes en el medio MS suplementado con 6-BAP en una concentración que osciló entre 1,5 y 3,0 mg/l de 6-BAP, en contraste con

nuestro ensayo utilizamos concentraciones por debajo del 1mg/L de 6-BAP. En el caso de su ensayo altas concentraciones de 6-BAP más de 3,0 mg/L e inferior a 1,0 mg/L, fallaron por completo en iniciar brotes en sus variedades de papa, en nuestro caso utilizamos concentraciones que varían entre 0.1 y 1 mg/L del regulador de crecimiento para Superchola y mostro de igual manera la longitud y el índice de multiplicación fue el más bajo en las concentraciones de 6-BAP mayores.

En la investigación de Lázaro *et al.*, (2021) utilizo concentración de 6-BAP que varían de 0 a 1 mg/L, sus resultados presentan plantas hasta los 60 mm con un índice de multiplicación del 5 aproximadamente. Para nuestro ensayo encontramos una longitud máxima promedio con el tratamiento M1 (0.1 mg/L de 6-BAP) de 50.53 mm, el resultado similar lo obtuvo Polo, (2019) con una altura media de 50.02 mm.

González & Chavarría, (2016) en su ensayo con 6-BAP encontraron un índice de multiplicación de 9.15 con la concentración de 1.00 mg/L 6-BAP, a la par encontraron un índice de 8.44 con la concentración menor de (0.50 mg/L de 6-BAP) y 8.12 con el tratamiento control, esto tiene cierta relación con nuestro ensayo donde obtenemos un índice de 7.09 con la menor concentración (0.1 mg/L de 6-BAP) y 7.40 con el tratamiento control. Esto se podría explicar con la investigación de Berrie, 1984, indica que las citoquininas sintéticas son inhibidoras del crecimiento de los brotes en altas concentraciones. Diferentes estudios sugirieron que la combinación de hormonas de crecimiento varía según las variedades de papa y también según el tipo de explantes utilizados. Por lo tanto, queda claro a partir de los estudios mencionados anteriormente que la estandarización del protocolo varía según los explantes utilizados y la variedad del tubérculo.

Capítulo VI: Conclusiones

- Se obtuvieron brotes etiolados de *Solanum tuberosum* L. variedad Superchola bajo condiciones de oscuridad para producir los brotes etiolados y se aplicó un promotor de crecimiento (ácido giberélico) para acelerar el proceso de brotación.
- El estado aparente de los brotes etiolados puede no ser el apto para exponerse a un proceso de desinfección con concentraciones altas de hipoclorito de sodio.
- Se implementó un protocolo de desinfección para *Solanum tuberosum* L. variedad Superchola para brotes etiolados. El tratamiento 2 (NaClO 0.5 %v/v y 5 minutos de inmersión) obtuvo una viabilidad de 73.33%.
- Si bien se obtuvieron mejores porcentajes de desinfección con concentraciones más altas de hipoclorito y mayores tiempos de inmersión, los altos niveles de oxidación hacen que estos tratamientos no sean los más aptos.
- A bajas concentraciones del regulador de crecimiento citocinico, el tratamiento M1 (0.1 mg/L 6-BAP) alcanzo una media de 50.53 mm de longitud de brote siendo este el mejor tratamiento para esta variable, por otro lado, el tratamiento control seguido por el tratamiento M1 presentan los mejores índices de multiplicación (7.40 y 7.09 respectivamente) y son significativamente diferentes a los demás tratamientos. Podemos concluir que el tratamiento M1 es el mejor para la etapa de multiplicación por sus resultados en la longitud del brote y el índice de multiplicación presentado.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda hacer estudios sobre las condiciones de brotación, los tratamientos de luz difusa junto con un proceso de verdeamiento previo a la toma de muestra de los explantes pueden hacer que el brote sea más vigoroso al momento de su paso por el proceso de desinfección.
- Evaluar los efectos sobre la contaminación que tienen otros agentes desinfectantes sobre los explantes, se recomienda hacer un estudio con cloruro de mercurio, debido a su amplio uso e incidencia que se encontró haciendo esta investigación.
- Probar otros reguladores de crecimiento a las mismas o menores concentraciones ya que en bibliografía bajas concentraciones de citoquininas muestran buenos resultados para la multiplicación.
- Se recomienda revisar los protocolos de toma de datos ya que se pierde información valiosa durante las evaluaciones de las variables de estudio.
- Se recomienda a la empresa el uso de nuestro protocolo de desinfección y multiplicación debido a los resultados que se obtuvieron.

Referencias

Abbasi, Z., Singh, R. P., Gautam, D. N. S. (2016) A novel aseptic technique for micropropagation of Aloe vera mill. *Advanced Herbal Medicine* 2: 47-60.

Aguilar, M. (2015). Evaluación de la producción de semilla de dos cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) aptos para la agroindustria, en el sistema aeropónico con dos densidades de trasplante. Quito.

AGRIANUAL- Anuário da agricultura brasileira. (2013). Batata. São Paulo: AgraFNP. p. 181-188, 2013.

Alcántara, J; Godoy, J; & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en. *NOVA*, 111-125.

Ahad, A; Akhtat, N; Ahmad, Ishfaq, Kausar, M. (2017). Effect of sodium hypochlorite on *in vitro* sterilization of six promising potato cultivars. *INNSPUB*.

Ajayi SA, Berjak P, Kioko JI, Dullo ME, Vodouhe RS. (2006). Observation on *In vitro* Behaviour of the Zygotic Axes of Potato. *African Journal of Biotechnology* 5(15), 1397-1404.

Araque, E., Bohórquez, M., Pacheco, J., Correa, L., Urquijo, J., Castañeda, S., & Pacheco, J. (2018). Propagación y tuberización *in vitro* de dos variedades de Papa. *Ciencia En Desarrollo*, 9(1). <https://doi.org/10.19053/01217488.v9.n1.2018.7132>

Arroyo, A., Sánchez, M., García, B., Álvarez, E., & Gutiérrez, C. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de *Arabidopsis thaliana* L. *REB*.

Badoni A., Chauhan JS. (2010) Producción de semilla de patata del cultivar "Kufri Himalini", *in vitro*. *Célula madre* 1 : pág. 16.

Bamberg, J. B., Martin, M. W., Abad, J., Jenderek, M. M., Tanner, J., Donnelly, D. J., ... Novy, R. G. (2016). *In vitro* technology at the US Potato Genebank. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(3), 213–225. doi:10.1007/s11627-016-9753-x

Basantes, F., Aragón Suárez, J. P., Albuja Illescas, L. M., & Vásquez Hernández, L. del

R. (2020). Diagnóstico de la situación actual de la producción y comercialización de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en la Zona 1 del Ecuador. In *e-Agronegocios* (Vol. 6, Issue 2, pp. 103–120). <https://doi.org/10.18845/ea.v6i2.5103>

Berrie, A. (1984). Fisiología vegetal avanzada. Londres, Reino Unido: Pitman. Reguladores de germinación y crecimiento.

Biniam, T., & Tadesse, M. (2008). A survey of viral status on potatoes grown in Eritrea and *in vitro* virus elimination of a local variety 'Tsaeda embaba'. *African J. Biotechnol. Biotechnol.*

Boeri, P. (2016). Bioprospección química y propagación de plantas nativas del monte patagónico como estrategias de conservación y uso sustentable. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

Bolaños, H., & Panoluisa, F. (2017). Sistema de Inmersión Temporal en la propagación de minitubérculos semilla de papa. Quito: Revista Latinoamericana de la Papa.

Castillo, A. (2014). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>

Castillo, F. (2020). Plagas de papa en Ecuador podrían diseminarse a la región Andina. Obtenido de <https://cipotato.org/es/blog-es/plagas-papa-ecuador-podria-diseminarse/>

Cárdenas, A., & Espinoza, R. (2014). Guía práctica de cultivo *in vitro* de especies vegetales. CERS.

Chuntale, K. (2018). Biotechnological Approaches to Improve Potato: Review Article. *Journal of Natural Sciences Research*, 8(11), 81–89. www.iiste.org

Chinnappan, R. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11: 165-172

CIP. (31 de Marzo de 2021). Centro Internacional de la Papa. Obtenido de <https://cipotato.org/potato/>

CFIA. (2015). The Biology of *Solanum tuberosum* L. (Potatoes). Plant Biosafety Office,

December(5), 1–8. <https://www.inspection.gc.ca/plant-health/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/solanum-tuberosum-l-/eng/1330982063974/1330982145930#a26%0Ahttp://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94>

Cobos, E. (2019). La papa nacional tiene buena producción pero sufre por la demanda. *Revista Gestión*, 2-3.

CONABIO. (2016). *Solanum tuberosum* L. México: Proyecto GEF-CIBIOGEM.

Demo, P; Akoroda, R; El-Bewedy & Asiedu. R (2004). Monitoring storage losses of seed potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers of different sizes under diffuse light conditions. *Proceedings, 6th triennial congress of the African Potato Association (APA)*.

Dong, J; Terzaghi, W; Deng, X; Chen, H. (2015). Multiple photomorphogenic repressors work in concert to regulate Arabidopsis seedling development. *Plant Signal Behav* 10:4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1011934>

Dutra, LF et al. (2010). Protocolos de micropropagación de plantas. I-Batata. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Available at: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/903700>.

Fernald, M. L. (1970). *Gray's manual of botany. A handbook of the flowering plants and ferns of the central and northeastern United States and adjacent Canada*. 8 ed. (edition) American Book Company, New York. 1251 pp. (pages)

García, L., Rodríguez, M., La O, M., Pérez, M., Alvarado, Y., de Fera, M., Veitía, N., Mirabal, D., & Castillo, J. (2015). Propagación *in vitro* de variedades cubanas de *Solanum tuberosum* L. 'Yuya', 'Marinca', 'Grettel' e 'Ibis.' *Biotecnología Vegetal*, 15(2), 75–83. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/13/11>

Gudeva, K., Mitrev, S., Fidanka, T., & Mite, I. (2012). Micropropagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Electronic Journal of Biology*, 8(3), 91–106. <https://doi.org/10.1007/978-3-662->

07770-2_6

Gixhari, B., & Xhulaj, D. (2018). *In vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. Montenegro: Univerzitet Crne Gore.

González, J. (2015). Evaluación agronómica de papa, variedad Superchola (*Solanum tuberosum* L), con el uso de semilla prebásica, bajo dos modalidades de fertilización, Tabacundo. Pichincha. Quito: Universidad Central del Ecuador.

González, D & Chavarría, M (2015). Microtuberización del cultivar de papa (*Solanum tuberosum* L.) Banba en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal, Managua: Universidad Nacional Agraria.

Goodwin, P; Kim, Y; Adisarwanto, T. (1980). Propagation of potato by shoot tip culture. *Potato Research* 23(1), 9-18. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02364021>

Hussey, G., & Stacey, N. (1981). *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *John Innes Institute Norwich*, 462(1), 959–964. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.462.152>.

Igarza, J., Agramonte, D., Alvarado, Y., De Fera, M., & Pugh, T. (2012). Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. *Biotecnología Vegetal*, 12(1), 3–24.

Indacochea, S., Parrales, J., Zhindón, B., Valverde, Y., & Choez, P. (2019). Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Manabí: MAWIL.

Jarret,R; Hasegawa, P; Erickson,T. (1980) Efecto de los componentes del medio en la formación de brotes a partir de discos de tubérculos cultivados de papa. *Revista de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas*. 105 :238–242.

Jayawardana, Kasumi D. E. (2015). Respuesta *in vitro* y en casa de cultivo de variedades cubanas durante la obtención de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Facultad de

Ciencias Agropecuarias.

Kalt, W.; Prange, R.K.; Daniels-Lake, B.J.; Walsh, J.; Dean, P.; Coffin, R. (1999) Alternative compounds for the maintenance of processing quality of stored potatoes (*Solanum tuberosum* L.). J. Food Process. Preserv.

Kikuta, Y; Okazawa, Y. Control de la formación de raíces y brotes a partir de tejido de tubérculo de patata cultivado in vitro. (1984). Fisiología Plantarum; 61 (1): 8–12. doi: 10.1111/j.1399-3054.1984.tb06092.x.

Koch, K. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 509-540.

Kozai T, Kubota, C & Ryoung, JB. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51(1), 49. <https://doi.org/10.1023/A:1005809518371>.

Lázaro, A; Hernández, A; Díaz, H. (2021). Multiplicación y reducción del crecimiento *in vitro* de papa chaucha (*Solanum tuberosum* L. grupo Phureja). Universidad Nacional de Tumbes

López, G. (2019). Establecimiento *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) -variedad Purén- a partir de meristemos. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano .

Pumisacho, M., & Sherwood, S. (2005). El cultivo de la papa en Ecuador. Quito: INIAP-CIP.

Martínez, F. (2009). Caracterización morfológica e inventario de conocimientos colectivos de variedades de papas nativas (*Solanum tuberosum* L.) en la provincia de Chimborazo. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Masclef, A. (1891). Atlas des plantes de France.

Mejía, D. (2017). Pérdidas poscosecha en la cadena de valor del rubro papa, un estudio de caso en la provincia del Carchi Año: 2016. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (31 de Marzo de 2021). Agricultura.gob.ec.

Obtenido de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador> se proyecta a ser exportador de papa

Morais, T; Asmar, S; Silva, J; Luz, J & Melo, B. (2018). Aplicación de Tissue Culture Techniques in Potato. Instituto de Ciencias Agrarias.

Morales, J. (2016). Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de semillas de *Solanum caripense* D. para la obtención de plantas libres de Bacterias y Hongos. Universidad Politécnica Salesiana.

Naik, P., & Karihaloo, J. (2007). Tissue Cultural Innovations for Production of Quality Potato Seed in Asia-Pacific Region. New Delhi: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology.

Naik, P; Chandra, R. (1993). Use of tissue culture technique in crop improvement with special reference to potato. CPRI, Shimla.

Niino, T., & Arizaga, M. V. (2015). Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science*, 65(1), 41–52. doi:10.1270/jsbbs.65.41

Noroña, J., & Tipanquiza, J. (2011). Evaluación del comportamiento en el cultivo de Papa (*Solanum tuberosum* L.) variedades "Iniap-Natividad; Iniap Estela"; versus un testigo, la variedad tradicional "Bolona" en el cantón Paute, provincia de Azuay. Azuay: Universidad Politécnica Salesiana.

Okazawa Y, Katsura N, Tagawa T (1967). Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 20, 862-869

Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*. Bogotá: Departamento de Biología.

Pérez, F. (2017). Fisiología Vegetal Metabolismo de hidratos de carbono. Pucallpa: Universidad Nacional de Ucayali.

Piedra, M. A. (2014). Evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola, bajo sistemas de inmersión Temporal. Quito: Universidad Central del

Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2490/1/T-UCE-0004-68.pdf>

PotatoPro. (Octubre de 2020). PotatoPro. Obtenido de <https://www.potatopro.com/world/potato-statistics>.

Polo, J. (2019). Evaluación de tres medios de cultivo para la micropropagación de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Superchola. Tulcán. Universidad Politécnica del Carchi.

Rafique, T., Jaskani, M., Raza, H., & Abbas, M. (2014). Estudios *in vitro* de inducción de microtubérculos en papa. *International Journal of Agriculture & Biology*, May, 4–7.

Rodríguez, M., & Flórez, V. (2004). Elementos esenciales y beneficiosos. Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.

Santos, M; Araujo, F; Lima, P; Costa, L; Finger, F. (2019). Changes in potato tuber sugar metabolism in response to natural sprout suppressive compounds. *Acta Sci. Agron*.

Sharma, G., Dashora, R., & Jagetiya, S. (2015). *General Techniques of Plant Tissue Culture* (págs. 2-4). United States: Lulu Press Inc.

Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. La plata: Edulp.

Shibairo, S; Rein, P; Demo, P; Gachango, E. (2006). Effects of Gibberellic Acid (GA₃) on Sprouting and Quality of Potato Seed Tubers in Diffused Light and Pit Storage Conditions

Spooner, D. & Knapp, S. (2013). *Solanum tuberosum* L. (<http://solanaceaesource.org/content/solanum-tuberosum>). [12 December 2014].

Sillanpaa, M. (1972). Los oligoelementos en los suelos y en la agricultura. Roma: FAO.

Struik, P. C. 2007. Above-ground and below-ground plant development. Pages 219-236 in D.Vreugdenhil, J. Bradshaw, C. Gebhardt, F. Govers, D. K. L. Mackerron, M. A. Taylor, H. A.Ross, eds. (editions) *Potato biology and biotechnology: Advances and perspectives*. ElsevierScience B.V., Amsterdam.

Taramuel, X. (2017). Evaluación del peso del tubérculo y densidad de siembra en la producción de semilla registrada de papa (*Solanum tuberosum* L.). Ibarra: Universidad Técnica

del Norte.

Veitía, N., Collado, R., García, L., Bermúdez, I., Torres, D., & Romero, C. (2012). Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. Santa Clara: Biotecnología Vegetal IBP.

Visse-Mansiaux, M.; Tallant, M.; Brostaux, Y.; Delaplace, P.; Vanderschuren, H.; Dupuis, B. (2021). Assessment of pre- and post-harvest anti-sprouting treatments to replace CIPC for potato storage. *Postharvest Biol. Technol.*

Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A., Abades, S., & Cáceres, J. (2013). Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *Ahnfeltia plicata* (Hudson), 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) de la región de magallanes. *Magallanes: Anales del Instituto de la Patagonia.*

Vinterhaltar, D. (2008). *Potato In vitro Culture Techniques and Biotechnology*. Global Science Books.