

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Obtención de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” mediante el sistema de inmersión temporal – Ayacucho, 2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por la:  
Bach. CARHUAZ CONDORI, Roxana Karen

AYACUCHO – PERÚ  
2017



A Dios, por permitirme llegar a este momento especial en mi vida. Por los triunfos y momentos difíciles que me ha enseñado a valorar cada día.



## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Máter* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por acogerme en sus aulas durante la etapa de mi formación profesional.

A la Escuela Profesional de Biología y a los Biólogos, por compartir sus conocimientos, enseñanzas y transmitirme el optimismo en el proceso de formación profesional.

Agradezco a CONCYTEC, CIENCIACTIVA-MINEDU por su financiamiento a través del Convenio 199-2015-FONDECYT-UNSCH: Obtención de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* “mashua negra” en sistema de inmersión temporal automatizado y caracterización de sus moléculas bioactivas (fenólicos y glucosinolatos).

Al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho que me permitió utilizar su infraestructura, equipos y reactivos para la realización del proyecto.

A los biólogos: Fidel Mujica, Sonia Felices y Paula García, quienes brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante.

Al Dr. Gilmar Peña Rojas por brindarme su apoyo moral y asesoramiento para la elaboración y conclusión del trabajo de investigación.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por sus consejos y por su colaboración en el procesamiento de datos estadísticos.

A mis padres Víctor y Feliciano, por brindarme consejos para seguir adelante, a mis hermanos Ronal, Edison y Yesenia, quienes estuvieron siempre con su apoyo incondicional.



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la investigación	3
2.2. Base teórica	9
2.2.1. <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua”	9
2.2.2. Taxonomía	9
2.2.3. Características botánicas	9
2.2.4. Distribución geográfica	10
2.2.5. Etapas de la siembra	10
2.2.6. Valor nutricional	11
2.2.7. Usos de la mashua	11
2.2.8. El Biocomercio	12
2.2.9. El Biocomercio en el Perú	12
2.2.10. El Biocomercio y la mashua	12
2.3. Glucosinolatos	12
2.4. Sistema de inmersión temporal (SIT)	13
2.4.1. Sistema de inmersión temporal RITA	13
2.4.2. Importancia	14
2.4.3. Ventajas	14
2.4.4. Desventajas	15
2.4.5. Funcionamiento	15
2.5. Sacarosa	15
2.6. Citocinina	15
2.6.1. BAP (6-Bensilamino purina)	16
2.6.2. Efectos	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17

3.1.	Zona de estudio	17
3.2.	Población muestral	17
3.3.	Metodología y recolección de datos	17
3.4.	Análisis estadístico	18
IV.	RESULTADOS	19
V.	DISCUSIÓN	25
VI.	CONCLUSIONES	29
VII.	RECOMENDACIONES	31
VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
	ANEXOS	37

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de la mashua	9
Tabla 2 Etapas del cultivo de la mashua	11
Tabla 3 Valor nutricional de la mashua en 100g	11



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Sistema de inmersión temporal RITA	14
Figura 2	Comparación de promedios de los tamaños de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	21
Figura 3	Comparación de promedios de los pesos de microtubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	22
Figura 4	Comparación de medianas e intervalos de los tamaños de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016. U de Mann-Whitney =719,000, $\alpha=0.05$ , Sig. =0.017.	23
Figura 5	Comparación de medianas e intervalos de los pesos de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	24



## ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Medida de los microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	39
Anexo 2	Peso fresco de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 in vitro, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	40
Anexo 3	<i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	41
Anexo 4	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” in vitro en medio MS sólido, accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	42
Anexo 5	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” in vitro en medio MS líquido en proceso de micropropagación, accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	43
Anexo 6	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” in vitro en medio MS líquido, accesión MAC003 con tamaño adecuado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	44
Anexo 7	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro en funcionamiento del sistema de inmersión temporal con medio MS líquido para el proceso de tuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	45
Anexo 8	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro en el sistema de inmersión temporal cubierta con papel de aluminio para el proceso de tuberización y brindar la oscuridad necesaria para el tratamiento en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	46

Anexo 9	Microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro, obtenido en la inducción para la obtención de microtubérculos en sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	47
Anexo 10	Coleccionando los microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro del sistema de inmersión temporal, obtenido en la inducción de microtuberización del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	48
Anexo 11	Medidas longitudinales de los microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 in vitro, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	49
Anexo 12	Evaluación del crecimiento de plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 in vitro en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	50
Anexo 13	Promedios del tamaño y peso de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” accesión MAC003 in vitro, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	51
Anexo 14	Componentes del tratamiento realizado para la inducción de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” in vitro, en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	52
Anexo 15	Componentes de la micropropagación realizado para la inducción de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” in vitro, en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.	53
Anexo 16	Sistema de clasificación de Cronquist A. 1988. Fuente: Aucasime, L. 2016)	54
Anexo 17	Procedimiento de la investigación	55
Anexo 18	Matriz de consistencia	56

## RESUMEN

El sistema de inmersión temporal es una herramienta que permite obtener plántulas de calidad en un espacio reducido, en un menor tiempo y a gran escala. Con el objetivo de obtener microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. "mashua" en sistema de inmersión se utilizó plántulas *in vitro* del morfotipo mashua andina caracterizada (MAC) 003 proveniente de la localidad de Yaruca, Distrito de Vinchos, que se conservan en el laboratorio de Biología Celular y Molecular. Las plántulas fueron propagadas en medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con 3% de sacarosa, a un pH de 5.6 y 3% de agar. Transcurrido 30 días de cultivo en medio MS semisólido fueron transferidas a un matraz erlenmeyer con 100 mL de medio MS líquido. Posteriormente, los explantes de mashua con un promedio aproximado de 10 cm. de tamaño fueron transferidas a los envases del sistema de inmersión temporal que contenía 200 mL de medio MS líquido suplementado con 8% de sacarosa y 2 ppm de benzilamino purina (BAP), para este proceso se utilizaron 20 plántulas por envase con dos repeticiones incubando por 10 semanas en oscuridad completa. Además, se experimentó dos tiempos de frecuencia de inmersión: cada 3 horas por 2 minutos y cada 5 horas por 2 minutos. Los resultados en la frecuencia de cada 3 horas por 2 minutos, se obtuvieron un promedio de 1cm de tamaño y 0,09 g de peso y en la frecuencia de cada 5 horas por 2 minutos con medidas de 0,86 cm en tamaño y 0,09 g en peso de los microtubérculos de mashua. El sistema de inmersión temporal es la mejor estrategia para micropropagación como para la obtención de microtubérculos de mashua de calidad.

**Palabras claves:** Microtubérculos, sistema de inmersión temporal, mashua



## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es poseedor de gran diversidad de raíces y tuberosas andinas: papa, oca, olluco y la mashua. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. "mashua" es un tubérculo originario de los Andes, tiene la particularidad de crecer en suelos pobres y a mayores altitudes que los otros cultivos; es un recurso milenario de los andes y una especie promisoría, que constituye un recurso con un valor alimenticio y medicinal de las generaciones presentes y futuras. La mashua presenta un conjunto de características, tanto en tamaño, forma y color que es producto del desarrollo fisiológico regulado por el ambiente. El desarrollo del tubérculo es influenciado por bacterias, hongos y virus que influyen negativamente en la producción de la mashua. Frente a esta problemática existe una estrategia de propagación más rápida y eficiente que permite la obtención de plántulas de calidad en un espacio controlado, reducido y con la ventaja de producir gran cantidad de plántulas en cualquier época del año libres de patógenos. La otra estrategia de propagación *in vitro* constituye la propagación por sistema de inmersión temporal, que fue desarrollado con la finalidad de producir plántulas y semillas de calidad, utilizando frascos como pequeños bioreactores con mayor eficiencia, calidad y reducción de los costos, comparado con la técnica de micropropagación. Existen muchos reportes sobre el uso de esta técnica para obtención de plántulas desde herbáceas hasta leñosas en diferentes partes del mundo y fundamentalmente con fines comerciales. El sistema de inmersión temporal (SIT), también se está empleando para la propagación de microtubérculos de papa, olluco, oca y una en el presente trabajo en la mashua. El sistema tiene la ventaja de favorecer el crecimiento de las plantas como en el proceso de tuberización *in vitro* con un control del ambiente y obtener como resultado el crecimiento de los microtubérculos, influenciado por una adecuada renovación del aire interno del frasco de cultivo. El objeto de la investigación fue evaluar el efecto del tiempo de inmersión con la interacción de BAP y sacarosa

determinados en un tiempo de 10 semanas, para la obtención de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav., en el sistema de inmersión temporal.

**Objetivo general**

Obtener microtubérculos del morfotipo MAC003 de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” en sistema de inmersión temporal.

**Objetivos específicos**

1. Estandarizar el sistema de inmersión temporal para la obtención de microtubérculos de mashua.
2. Determinar el tiempo óptimo de inmersión temporal para la obtención de microtubérculos de mashua.
3. Evaluar el medio Murashige & Skoog suplementado con BAP y sacarosa para la obtención de microtubérculos de mashua.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Verastegui<sup>1</sup>, logró la inducción de tubérculos *in vitro* en *Tropaeolum tuberosum* “mashua” empleando como medio básico el Murashige & Skoog (MS) suplementado con BAP, CCC (Cloruro de clorocolina) y sacarosa en condiciones de oscuridad y temperaturas bajas.

Okazawa<sup>2</sup>, en mecanismo de tuberización reportó que el trabajo bajo condiciones de esterilidad había obtenido tubérculos de papa y la formación de éstos está en relación con la concentración de sacarosa. Así mismo, indica que no obtuvo tubérculos *in vitro* a partir de las yemas apicales, pero sí de las yemas intercalares. En las yemas apicales se encontró mayor cantidad de auxinas y baja actividad de IAA oxidase (ácido indol acético) con respecto a los segmentos de tallo con las yemas intercalares. Se utilizaron cinco frascos por tratamiento y en el frasco inferior de cada sistema se adicionó 225 ml de medio de cultivo de multiplicación. El medio de cultivo de multiplicación, contenía sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962) (MS), mio-inositol (100 mg l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (3.0 mg l<sup>-1</sup>).

Hussey y Stacey<sup>3</sup>, trabajó con tubérculos *in vitro* de papa y explica que el BAP (benzil amino purina) tiene un efecto promovedor de tuberculillos, el cual es mayor en días cortos que en días largos. Si bien la tuberización es promovida en menor proporción por el CCC su aplicación refuerza los efectos del BAP induciendo la formación temprana de tubérculos. Así también observaron que la tuberización tenía lugar sin la aplicación de hormonas, pero tardaba más, en especial si era bajo condiciones de días largos. Esto comprueba que el ácido abscísico tuvo un pequeño efecto en la promoción de la tuberización en un tiempo corto.

Elizalde<sup>4</sup> et. al., en tuberización de melloco, reportan haber obtenido tubérculos *in vitro* de oca utilizando el medio Murashige & Skoog suplementado con BAP y altas concentraciones de sacarosa. Para ello el cultivo en inmersión temporal (SIT)

puede constituir una alternativa de micropropagación, para obtener semilla de alta calidad, para la observación del resultado de esta alternativa se determinó el efecto de dos sistemas de cultivo: semi-automatizados SIT y sistema de inmersión constante con aireación mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo (SIC) en la fase de multiplicación de los brotes de yemas axilares. Los resultados permitieron demostrar la superioridad en la eficiencia del SIT respecto al SIC en la multiplicación de los brotes. Los brotes de yemas axilares cultivados en este sistema de cultivo mostraron los mejores resultados en la multiplicación respecto al SIC y el sistema de cultivo estático con renovación pasiva de la atmósfera interna. Con las condiciones de cultivo creadas en el sistema de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de los brotes de yema axilares se lograron los más altos coeficientes de multiplicación. El uso de este sistema de cultivo *in vitro*, posibilitará incrementar los coeficientes de multiplicación en la micropropagación para la producción de semilla en este género como en otras plantas de importancia industrial y alimentaria.

Agramonte<sup>5</sup> et al., mencionan en los métodos biotecnológicos para producción de semilla de papa que: la papa se propaga asexualmente mediante tubérculos o a través de semilla botánica. Por ello, es propenso a la infección acumulativa por microorganismos, lo cual provoca afectaciones en los rendimientos, la calidad comercial de los tubérculos y el intercambio de germoplasma. En los programas de producción de semilla, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, combinadas con el diagnóstico y saneamiento de los principales patógenos del cultivo ha contribuido a incrementar su eficiencia; en lo cual se utilizó la técnica del sistema de inmersión temporal y refieren que la etapa de inducción de la tuberización *in vitro* se utilizó un medio de cultivo Murashige & Skoog, complementado con 0.5mg.l-1 de tiamina, 100mg.l-1 de mioinositol y 2.0% de sacarosa con pH ajustado a 5.7, incrementándose solamente la concentración de sacarosa hasta un 8.0%, previo a la esterilización para detectar posibles contaminantes presentes en el cultivo.

Koda<sup>6</sup> et. al., en inducción de tubérculo de papa, demostraron que, bajo ciertas condiciones, el ácido salicílico y ácidos acetilsalicílico puede inducir tuberización *in vitro*. Estos compuestos ejercen funciones reguladoras en los niveles hormonales y la interacción con otras hormonas, para la inducción de tuberización de papa, el cual reportan una tasa más rápida de microtuberización acompañada de una senescencia temprana de las plántulas por efecto de la oscuridad. A

medida que se incrementó la concentración de sacarosa se agregó en combinación con 0 y 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP, también se incrementó la media de microtubérculos por planta. Únicamente en el medio que contenía 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 110 g l<sup>-1</sup> de sacarosa la media de microtubérculos por planta alcanzó una media de 1.

Pérez<sup>7</sup> et. al., reportan que se diseñó una unidad de inmersión temporal con el objetivo de lograr a gran escala la producción de tubérculos *in vitro* de papa como una vía alternativa para la producción de semilla. Se alcanzó un promedio de 2.6 tubérculos *in vitro* por planta con promedios de peso fresco de 1.27g y de diámetro de 11.4mm. Se obtuvo sólo un 2.9% de tubérculos *in vitro* con un calibre menor de 4.0mm, mientras que el 78.1% correspondió al calibre superior a 7.0mm. Los tubérculos de mayor tamaño presentaron 100% de conservación durante nueve meses y fue posible su plantación en campo sin necesidad de una etapa previa a la aclimatización. Los resultados en condiciones de campo permitieron observar que las plantas obtenidas de los tubérculos *in vitro* presentaron una altura promedio de 22.77cm y 1.51 tallos por planta, mientras que en las plantas *in vitro* los valores fueron de 15.32cm y 1.16 respectivamente. Después de cosechados ambos tratamientos, no se observó diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de minitubérculos por planta. Sin embargo, los procedentes de tubérculos *in vitro* a campo, presentaron valores estadísticamente superiores en cuanto al peso y diámetro de los mismos con respecto a los tubérculos obtenidos de las plantas *in vitro* (laboratorio).

Pérez<sup>8</sup> et. al., explica que los sistemas de inmersión temporal reducen algunos de los problemas que se presentan en los cultivos permanentes en medio de cultivo líquido estático, como son la pobre calidad del propágulo y la necesidad de tener que subcultivarlos en medio de cultivo semisólido para el posterior crecimiento y enraizamiento. También permite el intercambio bidireccional de las plantas con el medio ambiente. En este sistema la renovación de gases dentro del frasco de cultivo favorece el crecimiento y desarrollo de los brotes. Estos sistemas de inmersión temporal estimulan tanto el crecimiento de las plantas *in vitro* como el proceso de tuberización, en papa se ha logrado incrementar el número de tubérculos formados en un sistema con dos frascos de cultivo; los microtubérculos que se obtienen presentan el doble de la masa fresca y seca que los microtubérculos formados en sistemas de cultivo donde no se logra una adecuada renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo.

Según Montoya<sup>9</sup> et. al., se han desarrollado varias técnicas para la producción de microtubérculos *in vitro*. Entre ellas está la técnica de los bioreactores de inmersión temporal (BIT). Esta tecnología ha sido empleada satisfactoriamente en la inducción de tubérculos *in vitro* de papa en BIT en un programa de producción de semilla certificada de papa Diacol Capiro. Para la inducción de microtubérculos a partir de brotes micropropagados, se desarrollaron dos fases: a) fase de proliferación masiva de brotes, en la que se encontró que la frecuencia de inmersión de cada 3 horas con duración de 3 minutos y 600 mL de medio de cultivo produjo la mejor cantidad y calidad de brotes; b) fase de tuberización, en la que se encontró que la adición de sacarosa al 8% produjo mayor cantidad de microtubérculos, y cuando se adicionó 6-bencil-amino-purina (6- BAP, 1,0 mgL-1) mejoró la producción (229 microtubérculos/BIT). En campo se comparó el comportamiento de los microtubérculos con semilla élite y plántulas *in vitro* de papa. Se encontró que para la obtención de semilla élite son superiores los microtubérculos porque producen en promedio 49 tubérculos por planta, mientras que con plantas *in vitro* y semilla élite *in vitro* la producción es de 24 y 34 tubérculos por planta.

Teisson y Alvard<sup>10</sup>, en el cultivo *in vitro* no todas las especies responden igual al crecimiento, ni todos los genotipos dentro de una misma especie se comportan igual, se observa una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en medio de cultivo líquido, teniendo como desventaja la disminución de la oxigenación de los tejidos, lo cual reduce o elimina la formación de yemas axilares en los explantes, lo cual puede ocasionar hiperhidricidad; un desorden fisiológico causado parcialmente por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos celulares. Atendiendo a estos nuevos retos para el cultivo de plantas con medio de cultivo líquido, se han diseñado equipos y sistemas de cultivo que posibilitan su utilización en la propagación masiva, en los cuales la intervención de la mano de obra se minimiza. Estos se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo líquido, solo durante unos minutos con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo. Todos estos sistemas respetan las siguientes condiciones: evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen bajo costo. Así lograron la formación de microtubérculos

empleando la técnica semiautomatizada (RITA) y usando como medio básico el Murashige & Skoog suplementado con cicocel (CCC), ancymidol, ácido pantoténico y concentraciones altas de sacarosa, informan que la técnica de inmersión temporal permite que todas las yemas axilares sean inducidas a formar microtubérculos y que estos, a su vez, alcancen mayor tamaño.

Igarza<sup>11</sup> et. al., como objetivos se trazaron determinar en campo las características morfológicas y la respuesta agronómica de plantas de papa cv. 'Andinita' obtenidas de microtubérculos de diferentes diámetros y masa fresca producidos en sistemas de inmersión temporal. Los microtubérculos fueron clasificados en cuatro diámetros, < 4.0 mm, de 4.0 – 6.9 mm, de 7.0 – 10 mm y > 10 mm y se conservaron en contenedores plásticos a una temperatura que osciló entre 11.0 y 15.0°C. Al momento de la siembra se observó que los microtubérculos con un diámetro inferior a 4.0 mm se habían deshidratado y por lo tanto no fueron utilizados. A los 21 días de realizada la plantación existían diferencias significativas en la supervivencia de las plantas, el mayor porcentaje (93.9%) se alcanzó al plantar microtubérculos con un diámetro superior a 10 mm. La obtención de los microtubérculos en sistemas de inmersión temporal no afectó las características morfológicas de las plantas durante su ciclo vegetativo y desde el punto de vista agronómico se logró un promedio de 8.5 a 9.5 tubérculos por planta. Con un rendimiento relativo por planta entre 1.9 - 2.3 kg y de 16 a 23% de tubérculos con características deseadas para su conservación como semilla. Se demostró que tanto el desarrollo vegetativo de la plantación como el número y masa fresca de los tubérculos obtenidos, dependió del diámetro y la masa de los microtubérculos utilizados como material vegetal de plantación y que es posible utilizarlos para su siembra directa en campo.

Jimenez<sup>12</sup> et. al., mencionan que el empleo de técnicas de cultivo *in vitro* podría contribuir a la producción de estos. El objetivo de este trabajo fue multiplicar M. royoc con el uso de SIT. Se emplearon sistemas de inmersión temporal (SIT) de 1000 ml de capacidad. Cada SIT contenía 250 ml de medio de cultivo de multiplicación MS con 4.4 µM de benciladenina (BA) y 2.9 µM de ácido indol acético (AIA). Los SIT fueron inoculados con 30 explantes individuales (ápices y segmentos nodales). Se determinó el efecto de la frecuencia de inmersión (dos, cuatro y seis inmersiones de dos minutos por día) y el tipo de explante (ápices, segmentos nodales) sobre la multiplicación de los brotes y la producción de biomasa. Se comprobó que con cuatro y seis inmersiones por día se obtuvieron

los mayores valores de coeficiente de multiplicación y de longitud de los brotes. El máximo valor en la producción de biomasa se alcanzó con seis inmersiones por día. No se observaron síntomas de hiperhidricidad en los brotes y se observó que los segmentos nodales produjeron más brotes por explantes mayor coeficiente de multiplicación y biomasa que los ápices, mientras que estos últimos dieron lugar a brotes de mayor longitud.

León<sup>13</sup>, llega a la conclusión de que la mashwa o isaño es probablemente originaria de la zona del Altiplano de Perú y Bolivia. Sin embargo, especies silvestres se encuentran frecuentemente en diversas zonas altas de los valles interandinos. Las referencias de los cronistas señalan al grupo étnico Múiscos del reino Chibcha, en Colombia como pobladores que consumían los cubios (mashwa) así como la chigua (*Ullucus tuberosus*). Incluso se menciona que las especies del género *Tropaeolum* de Colombia se comportan de manera diferente a los de Perú y Bolivia en cuanto a las horas de luz y que se les cultiva a menores alturas, por lo cual Bukasov (1930) sugirió de crear la especie *T. cubio* para diferenciar las especies sabaneras. Su cultivo se concentra a partir de los 1 500 hasta los 4 200 m.s.n.m. Es una planta que soporta bien el frío.

Grau<sup>14</sup>, et al, Sobre la base de usos medicinales y creencias actuales que rodean mashua, así como el uso de la planta como (una rara) ornamental en el noroeste de Argentina.

Yu<sup>15</sup> et al., sugieren que tenía la mashua un lugar significativo en el pasado distante por motivos distintos de los alimentos, y que su domesticación puede estar relacionada con su importancia como medicamento. Así también argumentan a favor de que sea un relicto de un complejo agrícola primordial. Lo cual se ve representado Nazca en Pacheco, fechado en el año 1000, lo que sugiere que, a pesar de ser un cultivo de las tierras altas, que fue también bien conocido en la costa de Perú.

Rivera<sup>16</sup> et al., en la microtuberización in vitro de siete accesiones de papa, se emplearon dos protocolos (líquido-líquido, sólido y líquido) con un diseño completo al azar. La producción de microtubérculos estuvo determinada por el genotipo, el protocolo y las concentraciones de las hormonas benzilamino purina (BAP) y cloruro de cloro colina (CCC). La mayor producción de microtubérculos se obtuvo con el protocolo sólido-líquido y entre las concentraciones de mejor producción fue a concentraciones de sales MS 100%, sacarosa 8%, 10mg BAP/500mg CCC y oscuridad.

## 2.2. BASE TEÓRICA

### 2.2.1. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”

La mashua, mashwa, isaño, majua, cubio o papa amarga (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.), es una planta originaria de los Andes Centrales, y la mayor concentración se encuentra en Colombia, Bolivia, Ecuador y en el Perú entre los 3 500 y 4 100 msnm. En Colombia se cultivan variedades que crecen entre los 2.600 y 3 500 msnm. La mashua es muy rústica, por ello puede cultivarse en suelos pobres, sin uso de fertilizantes y pesticidas, y aún en estas condiciones, su rendimiento puede duplicar al de la papa<sup>17</sup>.

### 2.2.2. Taxonomía

Tabla 1: Clasificación de la mashua

<b>DIVISIÓN:</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>CLASE:</b>	Magnoliopsida
<b>SUB CLASE:</b>	Rosidae
<b>ORDEN:</b>	Geraniales
<b>FAMILIA:</b>	Tropaeolaceae
<b>GÉNERO:</b>	<i>Tropaeolum</i>
<b>ESPECIE:</b>	<i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav.
<b>N. V.:</b>	“mashua”

Fuente: (Aucasime<sup>44</sup> 2016)

Sistema de clasificación de Cronquist. A. 1988

### 2.2.3. Características botánicas

La mashua es una planta anual, herbácea, glabra en todas sus partes; de crecimiento inicialmente erecto que luego varía a semiprostrado, trepadora ocasionalmente mediante los peciolos táctiles y tiene un buen desarrollo del follaje presentando una forma compacta. Con las hojas alternas, brillantes en el haz y más claras en el envés, muestran una considerable variación en forma, son peltadas con tres a cinco lóbulos, aún en la misma planta; miden de 4.0 a 6.0 cm de longitud por 5.0 a 7.0 cm de ancho; las láminas son mayores en la base de las plantas; los peciolos son cilíndricos de 2.0 a 20.0 cm de largo, de color verde con puntos rojos, irritables como si fueran zarcillo, pudiendo enrollarse alrededor de un soporte o sobre otras plantas; los peciolos son notablemente más cortos que los pedúnculos. Las flores de la mashua son solitarias, zigomorfas, de 2.0 a 2.8 cm de longitud; nacen en las axilas de las hojas y aparecen sobre pedúnculos intensamente pigmentados. El periodo de flor abierta varía de 9 a 15 días; la duración de la floración varía de 9 a 48 días; el fruto es un esquizocarpo, formado

por tres mericarpios uniseminados indehiscentes que se separan y caen individualmente en la madurez y son carentes de endospermo. La mashua produce abundante semilla, la cual es viable para concluir los tubérculos de la mashua son menos variables en forma que aquellos de la oca y el melloco; existiendo cónicos cortos, cónicos alargados y cilíndricos ya rectos o curvos, el tamaño de los tubérculos varían de 5.0 a 15.0 cm de largo y de 3.0 a 6.0 cm de ancho. La coloración varía desde blanco marfileño a púrpura morado muy oscuro, pasando por el amarillo, naranja y púrpura morado en distintas tonalidades<sup>18</sup>.

#### **2.2.4.1. Características del tubérculo del morfotipo MAC003**

El tubérculo del morfotipo MAC003 (Mashua Andina Caracterizada), presenta las siguientes características: color predominante de la superficie negro, no presenta color secundario de la superficie, forma del tubérculo cilíndrico fusiforme, profundidad de los ojos de los tubérculos ligeramente profundo<sup>19</sup>.

#### **2.2.4. Distribución geográfica**

La mashua es una planta originaria de los Andes centrales, probablemente en las mismas zonas donde se originó la papa. En el Perú ha sido cultivada desde épocas preincaicas y numerosas culturas la han representado en sus ceramios. Crece en forma silvestre o cultivada en la cordillera de los Andes desde Colombia hasta Argentina, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 4,000 m<sup>12</sup>.

La mashua es una planta de fácil cultivo que puede ser cosechada a los 6 o 8 meses de su siembra, y está asociada a la pobreza en vista que desarrolla en pisos altitudinales elevados. Crece en suelos pobres y no requiere del uso de fertilizantes ni pesticidas, es resistente a las heladas, y en estado natural es capaz de repeler insectos y nemátodos. Los tubérculos pueden ser almacenados hasta seis meses en lugares fríos y ventilados, inclusive pueden ser guardados bajo el suelo para ser extraído cuando se necesiten. El cultivo de la mashua es muy productivo, pudiendo llegar a rendir hasta 25 t/ha<sup>20</sup>.

#### **2.2.5. Etapas de siembra**

El periodo de siembra y cultivo, fluctúa entre cinco a ocho meses. La etapa crítica para el ataque de la plaga y enfermedades es la cuarta etapa, en la que se puede producir ataque de gusanos de tierra, gusanos aradores y pudrición blanca de los tubérculos<sup>21</sup>.

Tabla N° 2: Etapas del cultivo de la mashua

ETAPAS DE CULTIVO	DÍAS
<b>Primera etapa</b>	Siembra de emergencia, 20-30 días
<b>Segunda etapa</b>	Emergencia a floración, 100-148 días
<b>Tercera etapa</b>	Floración a tuberización
<b>Cuarta etapa</b>	Tuberización a cosecha, 150-280 días

Fuente: Zambrano<sup>21</sup>, E. "Estudio de la variabilidad de melloco, oca y mashua en la Finca de agricultores de Colta-Chimborazo".

### 2.2.6. Valor nutricional

La mashua tiene un contenido alto en proteínas, carbohidratos, fibras y calorías. Es rica en vitaminas C y B. Su valor nutritivo supera al de algunos cereales y de la papa, por lo que forma parte de la dieta diaria nutricional de los habitantes de menores recursos en zonas rurales de la sierra norte y central del Ecuador. A este tubérculo se lo consume conjuntamente con papas, ocas y mellocos. Contiene un balance apropiado de aminoácidos esenciales. Algunas variedades de la Mashua pueden contener apreciables cantidades de carotenos (vitamina A) y de vitamina C (77mg en 100g de materia fresca comestible), siendo cuatro veces más que la cantidad de esta vitamina encontrada en la papa<sup>22</sup>.

Tabla N° 3: Valor nutricional de la mashua en 100 g

NUTRIENTES	CANTIDAD	NUTRIENTES	CANTIDAD
<b>Energía</b>	50	Yodo (ug)	-
<b>Proteína</b>	1.50	Vitamina A (mg)	-
<b>Grasa total (g)</b>	0.70	Vitamina C (mg)	77.50
<b>Colesterol (mg)</b>	-	Vitamina D (ug)	-
<b>Glúcidos</b>	9.80	Vitamina E (mg)	-
<b>Fibra (g)</b>	0.90	Vitamina B12 (ug)	-
<b>Calcio (mg)</b>	12.0	Hierro (mg)	1.0

Fuente: Fundación Universitaria Iberoamericana

### 2.2.7. Usos de la mashua

Los centros de investigación han realizado varias pruebas e investigaciones acerca de los usos y beneficios de la mashua el cual tiene un alto valor nutritivo: en proteínas, carbohidratos, fibra y calorías. Contiene todos los aminoácidos esenciales, excepto histidina, es rica en vitamina, siendo importante en la alimentación de los pobladores alto andinos. Los tubérculos se consumen cocidos, como ingredientes en sopas, mermeladas. Los brotes tiernos y las flores se comen cocidos como verduras. Tiene propiedades medicinales, los tubérculos son usados como antibacteriales, insecticidas, nemátocidas. Se utiliza como

ingrediente para algunos antibióticos. Las poblaciones indígenas y de escasos recursos utilizan la mashua casera para el tratamiento de la próstata, ya que tiene la propiedad de reducir los niveles de 13 testosterona. Se le atribuye propiedades curativas para el hígado y riñones. Es pobre en yodo.<sup>23,24</sup>

#### **2.2.8. El Biocomercio**

El biocomercio o comercio sostenible de la biodiversidad es un modelo de negocio que tiene como principal insumo la biodiversidad nativa, el cual tiene la finalidad de la conservación de la diversidad biológica, el uso sostenible de sus componentes y la distribución justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos<sup>25</sup>.

#### **2.2.9. El Biocomercio en el Perú**

El Perú, participó como socio nacional, a través del Programa Nacional de Promoción al Biocomercio del Perú (PNPB), aprobado oficialmente en el año 2004 por el Concejo Nacional del Ambiente (CONAM). El diseño del PNPB comenzó 3 años antes y estuvo a cargo del Concejo Nacional del Ambiente (CONAM), máxima autoridad del sector ambiental en ese entonces y PROMPEX, que convocaron a diversas instituciones públicas y privadas para tal fin, conformando el Grupo Técnico denominado Comité Biocomercio Perú, reconocido formalmente el año 2001<sup>26</sup>.

#### **2.2.10. Mashua y el biocomercio**

En nuestros días un factor crítico de desarrollo y sostenibilidad será promover las buenas prácticas de consumo y de comercio bajo los principios y valores del Biocomercio. De esta manera, garantizaremos el desarrollo y subsistencia de las futuras generaciones a nivel mundial<sup>27</sup>.

La mashua es uno de los tubérculos que tiene una importancia alimentaria, para lo cual es necesario evaluar todo el contexto bajo un enfoque sistémico, y comprender que nuestros actos no solo impactan nuestro entorno inmediato, sino que generan un impacto en los diferentes actores involucrados y en nuestra diversidad biológica (biodiversidad), cultural y social.

### **2.3. Glucosinolatos**

La presencia de glucosinolatos en este tubérculo tiene efectos beneficiosos para el sistema inmunológico y podrían proteger al organismo humano contra el cáncer, pero, al mismo tiempo, podrían tener efectos perjudiciales sobre el sistema nervioso cuando se consumen en grandes cantidades. La mashua está compuesto de sólidos en un 20% en su forma de materia seca, de los cuales el

11% es proteína. Algunas variedades pueden contener más de un 12% de proteínas en su forma de materia seca. La mashua posee mayor cantidad de proteínas, calcio, hierro, fósforo, vitaminas tales como B1, B2 y vitamina C que la oca o el ulluco<sup>28</sup>.

#### **2.4. Sistema de inmersión temporal (SIT)**

Son sistemas semiautomatizados en la propagación *in vitro* fundamentado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la acumulación de gases tóxicos<sup>29,30</sup>.

Permite airear los tejidos de los brotes unido al contacto completo de los mismos lo que facilita una mayor incorporación y asimilación de los nutrientes por los tejidos y como consecuencia aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes. Estos sistemas alternativos con el empleo de medio de cultivo líquido se han desarrollado con el propósito de automatizar, al menos las fases que requieran mayor manipulación del proceso *in vitro* y con ello, la consiguiente reducción de los costos de producción. El sistema de inmersión temporal puede ser utilizado para la producción de brotes vía organogénesis a escala masiva, brindando la posibilidad de automatizar algunas etapas del proceso de micropropagación. Además, ofrecen mayor facilidad de escalado, con la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas<sup>31, 32, 33</sup>.

##### **2.4.1. Sistema de inmersión temporal RITA ®**

En el año 1997, surgió el denominado sistema de inmersión temporal, creado en el CIRAD (Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo) de Francia, dicho sistema, se logra a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual logra subir el medio de cultivo y luego de sumergir los explantes por un determinado tiempo, el medio descendía por gravedad. Este método revolucionó los métodos tradicionales de micropropagación *in vitro*, y que se ha logrado una mayor tasa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación, así como niveles elevados de supervivencia en condiciones de campo<sup>34</sup>.

Se plantea que este sistema induce muchos cambios favorables en la atmósfera interna de los frascos, teniendo como resultado un mayor crecimiento y desarrollo de los explantes, además de que las vitroplantas mantienen una capa superficial de medio de cultivo hasta la próxima inmersión, lo que evita la pérdida por desecación. Por lo anteriormente planteado y por las grandes ventajas que ofrece

este sistema, se diseñó y construyó un sistema similar, para su utilización y contar con tecnología avanzada<sup>35</sup>.



Fuente: García<sup>35</sup>, 2013.

Figura N° 1: Sistema de inmersión temporal RITA

#### **2.4.2. Importancia**

Permite airear los tejidos de los brotes unido al contacto completo lo que facilita una mayor incorporación y asimilación de los nutrientes por los tejidos y como consecuencia aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes. Estos sistemas alternativos con el empleo de medio de cultivo líquido se han desarrollado con el propósito de automatizar, al menos las fases que requieran mayor manipulación del proceso *in vitro* y con ello, la consiguiente reducción de los costos de producción. Los SIT pueden ser utilizados para la producción de brotes vía organogénesis a escala masiva, brindando la posibilidad de automatizar algunas etapas del proceso de micropropagación. Además, ofrecen mayor facilidad de escalado, con la finalidad de producir grandes volúmenes de plantas *in vitro*<sup>36</sup>.

#### **2.4.3. Ventajas**

El contacto directo con el medio de cultivo renovado durante cada inmersión garantiza una forma más eficiente de suministro de los nutrientes en comparación con la forma estática en que se toman los mismos en el cultivo convencional (semisólido ó solido), los tiempos de inmersión son cortos, la mayoría del tiempo los explantes están solamente recubiertos de una película de medio de cultivo líquido y de esta forma se evita la desecación de los mismos. Así la resistencia a la difusión de gases es baja y existe una mínima ruptura del intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera, por tal razón está dentro del vaso de cultivo se renueva en intervalos regulares de tiempo; la agitación por el flujo de aire durante la fase de inmersión causa expansión de los tejidos y se facilita un mayor contacto de estos con el medio de cultivo, teniendo mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen una reducción del número de

frascos y estantes en las cámaras de cultivo y por tanto mayor producción por metro cuadrado de cámara<sup>30,37</sup>.

#### **2.4.4. Desventajas**

En condiciones estáticas provoca un efecto depresivo sobre el crecimiento del tejido en el cultivo *in vitro*, ya sea por hipoxia o por hiperhidricidad. Para evitar este problema se han diseñado nuevos tipos de biorreactores y sistemas semiautomatizados de cultivo líquido basados en la inmersión parcial y temporal de los explantes<sup>37</sup>.

#### **2.4.5. Funcionamiento**

El sistema consiste en dos recipientes que contiene a las muestras y al medio de cultivo. Este sistema cuenta con filtros hidrófobos de 0.2µm reutilizables: uno central (entrada de aire) y uno lateral (salida de aire). El filtro central se conecta al sistema de aireación (bomba), a una presión de salida de 0.2bar para que impulse el medio del compartimento inferior al superior durante un periodo corto (periodo de inmersión). Este baño temporal que reciben los explantes se controla por un reloj temporizador (automatización) que permite la abertura de una electro-válvula que controla el sistema<sup>38, 39</sup>.

### **2.5. Sacarosa**

La sacarosa, popularmente conocida por todos como azúcar común, es un disacárido que se encuentra formado por la combinación de glucosa y de fructosa. La primera es un tipo de azúcar que se halla presente en frutas y en la miel mientras que la fructosa es otro tipo que se encuentra también en las frutas y en la miel pero asimismo en los vegetales. En tanto, los disacáridos son un tipo de glúcido que se forman como consecuencia de la condensación de dos azúcares iguales o diferentes. Cabe destacarse que el cristal de sacarosa se caracteriza físicamente por ser transparente y de coloración blanca. Esta situación está causada por la difracción de la luz sobre la agrupación de cristales<sup>40</sup>.

Los dos azúcares ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) simples que conforman la sacarosa son la glucosa y la fructosa, que se encuentran unidas por un enlace glucosídico entre el átomo de carbono-1 de la glucosa y el átomo de carbono-2 de la fructosa. El átomo de carbono-1 de la glucosa es la molécula de carbono que forma parte del aldehído, o grupo CHO. El átomo de carbono-2 de la fructosa es el átomo de carbono de la cetona, o grupo CO<sup>41</sup>.

### **2.6. Citoquinina**

Son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) para la diferenciación celular. Su nombre proviene del término “citocinesis” que se refiere al proceso de división

celular. Son hormonas fundamentales en el proceso de organogénesis en las plantas y en la regulación de diversos procesos fisiológicos como fotosíntesis, regulación del crecimiento (dominancia apical), senescencia, apoptosis (muerte programada) vegetal, inmunidad vegetal (resistencia a patógenos), y tolerancia y defensa ante herbívoros<sup>42</sup>.

#### **2.6.1. BAP ( 6 – benzilamino purina )**

En la superficie de la piel de los tubérculos de mashua se encuentran distribuidas las lenticelas por las cuales se efectúa el intercambio de gases entre el tubérculo y el ambiente. En condiciones húmedas, las lenticelas aumentan de tamaño y se ven como puntos blancos prominentes. Se reportan que en presencia de BAP en los medios de cultivo provocaron la elongación de los tubérculos, reducción del número de ojos (yemas), aumento del tamaño de lenticelas y desorganización del periderma<sup>43</sup>.

#### **2.6.2. Efectos**

Estimula mediante la división celular; BAP incide favorablemente no solo en el número de brotes/explante, sino también en el incremento del tamaño de los brotes producidos<sup>44</sup>.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. ZONA DE ESTUDIO

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho (13°08'43"S 74°13'16"W, 2790 m.s.n.m.)

#### 3.2. POBLACIÓN MUESTRAL

Se utilizó el morfotipo MAC003 de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. *in vitro*, fue propagado y recolectado en *in vitro* del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho 2016.

El morfotipo MAC003 fue caracterizada utilizando los descriptores morfológicos del Centro Internacional de Papa (CIP 2013)

##### Criterios de inclusión

- Crecimiento en un mes
- Libre de contaminación
- Acceso requerida

##### Criterio de exclusión

- Acceso contaminada
- Acceso no adoptada al medio *in vitro*

#### 3.3. METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

##### 3.3.1. Selección de muestras

Se eligió plántulas del morfotipo MAC003 de mashua *in vitro*, las cuales se conservan en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 18 °C.

##### 3.3.2. Propagación de plántulas de mashua

Como fuente de los explantes se empleó brotes de "mashua" crecidas en condiciones de 18±1°C, fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Las plántulas fueron obtenidas por micropropagación en medio Murashige & Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa, gelificado con 0.7% de agar y a un pH de 5.6

### **3.3.3. Multiplicación en sistema de inmersión temporal**

Las plántulas crecidas en medio semisólido por 15 días, fueron transferidos a frascos (matraz) conteniendo 100mL medio líquido MS suplementado con 3% de sacarosa a un pH de 5.6. Los frascos se mantuvieron en constante agitación.

### **3.3.4. Tuberización en el sistema de inmersión temporal**

En la etapa de tuberización, se utilizó la metodología propuesta por Rivera et al (2008) modificado. Se empleó el medio de cultivo Murashige & Skoog líquido suplementado con 2 ppm de BAP y 8% de sacarosa, posteriormente se transfirió las plántulas de los frascos (matraz) a los envases sistema de inmersión temporal RITA®.

Cada frasco del sistema de inmersión temporal fue conectado a un compresor de aire y un programador automático de tiempo para controlar la frecuencia y duración de inmersión. Los frascos del SIT fueron cubiertos hasta la cosecha con láminas de papel aluminio para garantizar total oscuridad y garantizar la obtención de microtubérculos.

a. Tratamiento:

- Medio MS + 8% sacarosa + 2ppm de BAP.

En el experimento, como control se utilizó un frasco del SIT sin la adición de BAP y sacarosa.

### **3.3.5. Tiempo de inmersión temporal**

Se utilizó dos intervalos de tiempo de inmersión, evaluándose el crecimiento y desarrollo de las plántulas de mashua durante diez semanas.

a. Frecuencias de inmersión:

- Cada 3 horas por 2 minutos + oscuridad total.
- Cada 5 horas por 2 minutos + oscuridad total.

## **3.4. ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos obtenidos del diseño estadístico completamente aleatorizado, fueron ingresados a una base de datos en Microsoft Excel, y se realizó el análisis de variabilidad para comparar dos medianas utilizando para ellos la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

El programa estadístico empleado fue R versión 3.4.3 (2) y IBM SPSS versión 24.

#### **IV. RESULTADOS**



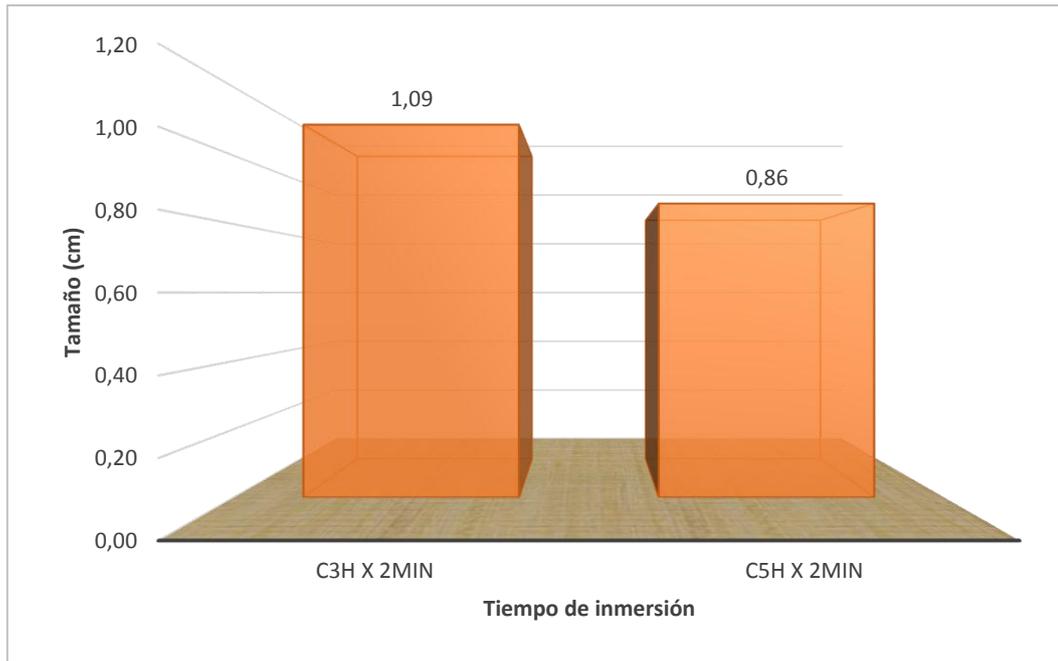


Figura 2. Comparación de promedios de los tamaños de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

LEYENDA:

C3H x 2Min: Cada tres horas por dos minutos.

C5H x 2Min: cada cinco horas por dos minutos.

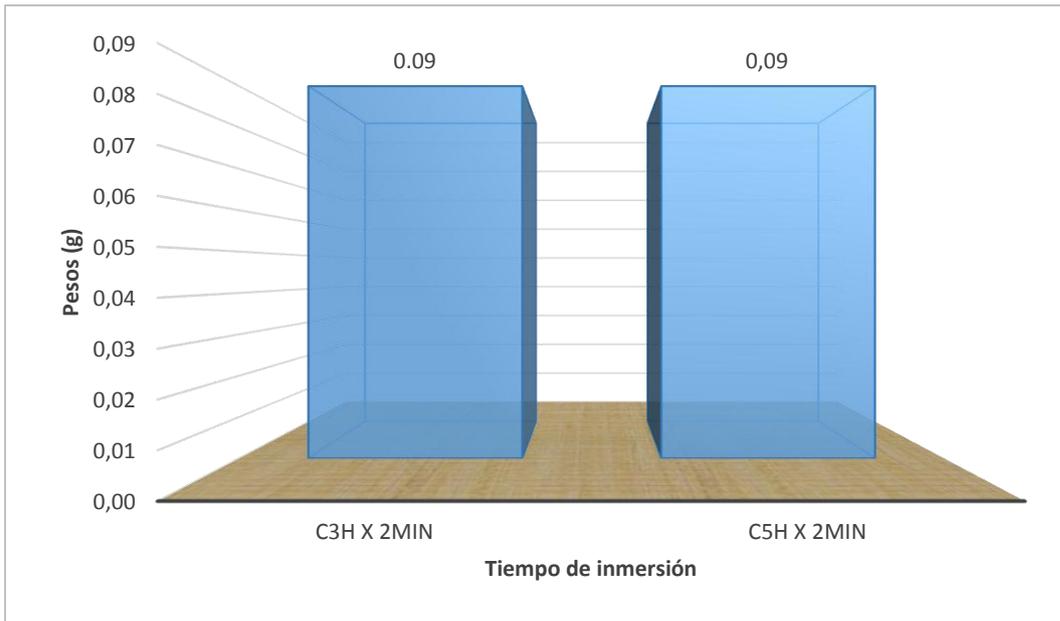


Figura 3. Comparación de promedios de los pesos de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

LEYENDA:

C3H x 2Min: Cada tres horas por dos minutos.

C5H x 2Min: cada cinco horas por dos minutos.

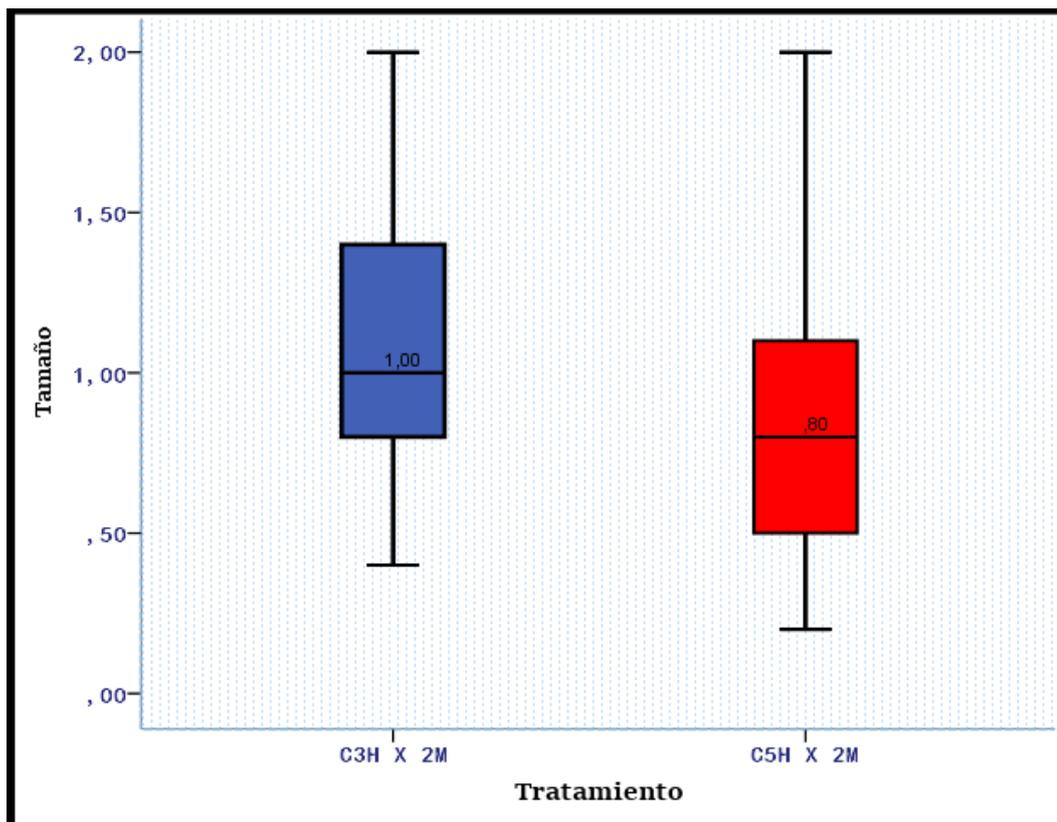


Figura 4. Comparación de medianas e intervalos de los tamaños de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. "mashua", obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016. U de Mann-Whitney =719,000,  $\alpha=0.05$ , Sig. =0.017.

LEYENDA:

C3H x 2Min: Cada tres horas por dos minutos.

C5H x 2Min: cada cinco horas por dos minutos.

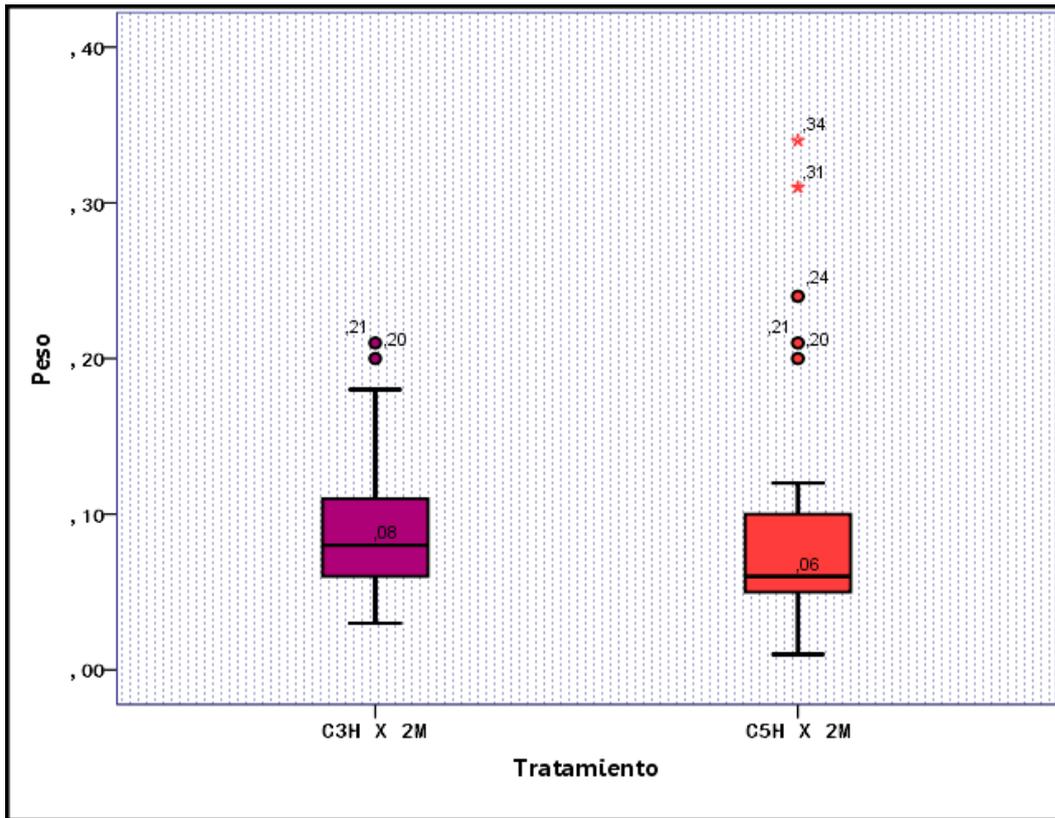


Figura 5. Comparación de medianas e intervalos de los pesos de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua”, obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

LEYENDA:

C3H x 2Min: Cada tres horas por dos minutos.

C5H x 2Min: cada cinco horas por dos minutos

## V. DISCUSIÓN

El sistema de inmersión temporal es una estrategia biotecnológica innovadora que permite la obtención de plántulas a gran escala en un espacio reducido y en menor tiempo. No obstante, es necesario estandarizar la técnica con la especie de planta que se requiere propagar. En los resultados obtenidos en la obtención de microtubérculos en el SIT del morfotipo MAC003 de “mashua” se comprobó que con una frecuencia de cada tres horas de inmersión por dos minutos se obtuvieron los mejores promedios de los tamaños de microtubérculos (Figura 2). Sin embargo, a una frecuencia de cada cinco horas por dos minutos se obtuvieron microtubérculos con menor tamaño y cantidad. Al respecto Escalona<sup>45</sup> et al., en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) encontró que con un tiempo de inmersión de dos minutos por hora y una frecuencia de tres horas se incrementó el coeficiente de multiplicación y por lo tanto facilitó una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes. De igual forma Etienne<sup>46</sup> y Berthouly, señalaron que el volumen de medio de cultivo por explante utilizado en los frascos de cultivo de inmersión temporal, es uno de los principales factores a evaluar para utilizar eficientemente este tipo de sistema de cultivo, así la frecuencia de inmersión influye sobre la morfología, el coeficiente de multiplicación como también sobre la asimilación de nutrientes y la composición gaseosa del interior del recipiente de cultivo.

En la obtención de microtubérculos de “mashua” en una frecuencia de cada 3 horas por 2 minutos se logró en promedio de 1,9 cm en tamaño, a diferencia del tiempo de inmersión de cada 5 horas por dos minutos, donde se obtuvieron un promedio de 0,86cm en tamaño después de 10 semanas de tratamiento a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  y en completa oscuridad. Gopal<sup>47</sup> et al., obtuvieron una mayor producción y tamaño de los tubérculos de papa trabajando bajo condiciones de días cortos y bajas temperaturas que en días largos y temperaturas altas.

Los microtubérculos se lograron utilizando 2ppm de BAP en comparación al medio control sin BAP y bajo las condiciones de incubación señaladas y controladas. Montoya<sup>48</sup> et al., en tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L), variedad Diacol Capiro en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo, lograron la tuberización *in vitro* como resultado al enriquecer el medio de cultivo en la etapa de tuberización con vitaminas, antioxidantes y reguladores del crecimiento.

De otro lado, después de 10 semanas de tratamiento, se obtuvieron en promedio 45 microtubérculos en el tratamiento de una frecuencia de cada tres horas de inmersión por dos minutos. Igarza<sup>49</sup> et. al., reportaron que, utilizando sistema de inmersión temporal, lograron obtener en promedio entre cinco y siete microtubérculos de 4 y 16mm de papa de la variedad “Andinita”.

La figura 3 se muestra la comparación de los pesos de microtubérculos de “mashua” obtenidos en los dos tratamientos del sistema de inmersión temporal, demostrando así la funcionalidad del uso del SIT. Mehrotra<sup>50</sup> et al., han destacado la eficiencia de los sistemas de cultivo líquido sobre la micropropagación convencional, permitiendo el mejor crecimiento de brotes y raíces. También los mismos autores señalan que la óptima producción de plantas en estos sistemas, depende del mejor entendimiento de las respuestas fisiológicas y bioquímicas al cultivo en el microambiente y a la optimización de las condiciones de cultivo físicas y químicas, para el control de la morfogénesis de las plantas en los sistemas de cultivo líquido.

En la obtención del peso de la mashua, se logró en promedio 0,09g de peso fresco en ambos tratamientos de frecuencia de inmersión (cada 3 horas por 2 minutos y cada 5 horas por 2 minutos) por tanto estadísticamente no hay diferencia significativa en los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos concuerdan con Igarza<sup>51</sup> et. al., quienes lograron entre uno y dos microtubérculos por planta, que generalmente son pequeños y con masa fresca inferior a 0.5g utilizando sistema de inmersión en la obtención de microtubérculos de papa cv. “Andinita”. No obstante, la microtuberización proporciona ventajas en el almacenamiento y transporte de germoplasma libre de patógenos.

En la figura 4, se observa la comparación de medianas e intervalos de los tamaños de microtubérculos del MAC003 de “mashua” obtenidos en dos tratamientos del sistema de inmersión temporal. Estadísticamente los resultados obtenidos en la prueba de Mann Whitney (U de Mann-Whitney = 719,000,  $\alpha=0.05$ , sig.= 0,017)

evidencia que existe diferencia significativa entre los dos tratamientos donde el tratamiento a una frecuencia de inmersión de cada 3 horas por dos minutos permitió mejor tamaño de los microtubérculos.

El SIT permitió automatizar en forma parcial la micropropagación de mashua, además permitió propagar plántulas vigorosas y de buena calidad sanitaria, para su posterior aclimatación en campo. Salauces<sup>52</sup>, et al., mencionan que la producción de microtubérculos, sólo tiene sentido si se parte de un material libre de todos los endo y exopatógenos conocidos, sanidad que se debe intentar conservar en lo posible, hasta la semilla comercial certificada, por esta razón es necesario iniciar la micropropagación utilizando material de buena calidad.

La figura 5, muestra la comparación no paramétrica de medianas e intervalos de los pesos de microtubérculos del morfotipo MAC003 de "mashua" en la cual utilizando la prueba de Mann Whitney se visualiza, que no hay diferencia significativa en los dos tratamientos de frecuencias de inmersión. No obstante, en el segundo tratamiento de cada 5 horas por dos minutos, se logró valores extremos del peso del tubérculo. Pérez<sup>33</sup> et al., mencionan que el sistema de inmersión no sólo nos brinda microtubérculos deseados, sino también constituye una herramienta complementaria a la micropropagación convencional, esto concuerda con Santos<sup>53</sup> et al., (2006) quienes refieren que en la germinación y conversión de embriones somáticos el SIT es una estrategia eficiente. Por lo general, la calidad del desarrollo de los brotes es mejor que la obtenida con el empleo de medio líquido o semi-sólido. La efectividad de la técnica de inmersión temporal en el aumento de la proliferación y calidad de los brotes ha sido señalada en otras especies de plantas. De otro lado, Etienne<sup>36</sup> y Berthouly, (2002) reportaron que en sistemas de inmersión en la propagación de Aráceas ornamentales el empleo del SIT fue eficiente para su propagación.



## **VI. CONCLUSIONES**

1. Se logró obtener microtubérculos de mashua del morfotipo MAC003 con un promedio de 0.98 cm de tamaño y 0,09 g de peso utilizando el sistema de inmersión temporal.
2. Se estandarizó la implementación del sistema de inmersión temporal para la obtención de microtubérculos de mashua a una temperatura de  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  y la cobertura de los frascos del sistema con láminas de papel aluminio para garantizar la oscuridad total.
3. Se determinó el tiempo óptimo de inmersión de cada 3 horas por 2 minutos durante 10 semanas obteniéndose mayor cantidad de tubérculos.
4. Se logró obtener microtubérculos de mashua utilizando el medio de Murashige & Skoog suplementado con 8% de sacarosa y 2 ppm de BAP.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Con los resultados obtenidos, nos indican que la inducción de microtubérculos *in vitro* podría iniciarse a gran escala en un amplio rango de morfotipos, suplementado con 2ppm de BAP y 8% de sacarosa. Realizando pruebas experimentales, con una mayor cantidad de morfotipos de “mashua”, para una producción en laboratorio.
2. Los microtubérculos deben ser utilizados como semilla básica, para realizar pruebas de conservación, caracterización de variedades, intercambio de germoplasma, etc.
3. Continuar la siembra de microtubérculos obtenidos *in vitro* para su posterior evaluación en campo.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verastegui M, Inducción *in vitro* de tubérculos en *tropaeolum tuberosum* "mashua" [Tesis pregrado]. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1993.
2. Okazawa Y, Physiological Studies on the Mechanism of Tuber Formation of Potato Plant. Proceeding of the Crop Science Society of Japan; 1957; 26 (36).
3. Hussey G, y Stacey N, Factors Affecting the Formation of *In vitro* Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Annals of Botany; 1984. 53. pp. 565- 578.
4. Elizalde B, Muñoz L, y Castillo R, Tuberización *in vitro* de melloco; 1997.
5. Agramonte D, Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba; 1999.
6. Koda Y, Takahashi K, and Kikuta I, Potato tuber inducing activities of salicylic acid and related compounds. Journal of Plant Growth and Regulation; 1992: 11:215-219.
7. Pérez J, Jiménez Y, y Agramonte, Aumento de la eficiencia en la micropropagación. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. En: Pérez, J. (Ed). Santa Clara, Cuba; 1998: p. 179-190.
8. Pérez M, Jiménez E, Capote A, Chávez M y Quiala E, Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en campo. Biotecnología Vegetal; 2001: 1: 17-21
9. Montoya N, Castro D, Díaz J, Ríos D, Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en Biorreactores de Inmersión Temporal y evaluación de su comportamiento en campo; 2008; 16(3): 288 (295).
10. Teisson C, Alvard D, *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion; 1999; 42: 499–504
11. Igarza et. al. Empleo de microtubérculos de papa cv. 'andinita' obtenidos en sistemas de inmersión temporal para producir minitubérculos en casa de cultivo, *biotecnología vegetal vol. 13, no. 4: 209 - 217*, Santa Clara, Villa Clara. Cuba; 2013.
12. Jiménez E, Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) en sistema de inmersión temporal. Universidad de Ciego de Ávila, Cuba; 1999.
13. León J, Plantas alimenticias andinas. Boletín Técnico # 6. IICA, Zona andina. Lima; 1964.
14. Grau A, Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). Promoting the conservation and use of under and neglected crops. Roma: IPGRI; 2003.
15. Yu WC P, J Joyce, D.C. Cameron, B.H. McCown, Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports; 2000: 19:407–413.
16. Rivera Á, Valbuena R, Hidalgo R y Moreno J, Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. En: Acta Agron. v. 57 no.3 Palmira Colombia; 2008: 175-180.
17. Espinoza P, Vaca R, Raíces y tuberosas Andinos, Cultivos Marginales en el Ecuador, situación social y limitaciones para la producción. CIP. Quito; 1996.
18. Tapia M, Fries A, Mazar I, Rosell C, Guía de campo de los cultivos andinos. FAO-Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú. Lima; 2007: PE. 209 p.

19. Felices M, Caracterización morfológica y productiva de germoplasma de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón "mashua" de la región Ayacucho. [Tesis pregrado]. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2016.
20. Aragón C, Escalona M, Capote I, Cejas I, Rodríguez et. al. "Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (CEMSA <sup>3</sup>/<sub>4</sub>) micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT)", Cultivos Tropicales, vol. 27, no. 1; 2006: pp. 39-44, ISSN 0258-5936.
21. Zambrano E, "Estudio de la Variabilidad de Melloco (*Ullucus tuberosus* Caldas), Oca (*Oxalis tuberosa* Molna) y Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) en Finca de Agricultores Colta - Chimborazo.", Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Quito – Ecuador; 2004.
22. Espín S, Chiriboga J, Altamirano. Caracterización cualitativa del potencial fitoquímico de siete especies de raíces y tubérculos andinos del Ecuador. En XI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Alberto Di Capua" Atti\_Resumenes. Università degli Studi di Pavia. Pavia, Italia; 2002. p. 155.
23. Daquinta M, Mosqueda O, González M, Benega R, Teixeira da Silv J, "Shoot Proliferation of *Caladium x hortulanum* in a Temporary Immersion System", Floriculture and Ornamental Biotechnology, vol. 1, no. 1; 2007, pp. 70-72, ISSN 1749-0294.
24. Ministerio de Agricultura. «Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). » [www.inia.gob.pe](http://www.inia.gob.pe). 2005. 15 de diciembre de 2012.
25. Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. Ed. Universidad Antonio Ruiz de Montoya – PROMPERÚ; 2014.
26. Ministerio del Ambiente, Impacto de promoción del biocomercio en el Perú – retos y oportunidades. Lima; 2015.
27. Samaniego Pantoja, Luis Alberto. Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias de la Ingeniería. «La Caracterización de la Mashua (*tropaeolum tuberosum* c.) en el Ecuador.»; 2010. [ute.edu.ec](http://ute.edu.ec). 13 de diciembre de 2012.
28. Akita M, y TAKAYAM S, Simulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. Plant Cell Reports; 1994: 13: 184-187.
29. Cabrera J, Gómez R, Rayas A, Feria M, López J, Rev. Colomb. Biotecnol. Protocolo para la formación de microtubérculos. Cab. de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Vol. XI No. 2, Diciembre; 2009. 19-30.
30. Basail M, Medero V, Otero E, Torres M, Cabrera M, López J, et. al. Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. Revista Biotecnología Vegetal; 2011: 11(1): 27-31.
31. Salazar D, Hoyos S, Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Rev Fac Nal Agr Medellín; 2007: 60 (2): 3907-3921.
32. Roca W. M, Mroginski L. A, Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia; 1991.
33. Pérez J, Suárez Y, Posibilidades y potencial de la micropropagación masiva de plantas en Cuba. Biotecnología Vegetal; 2000: 1: 3-12
34. Teisson C, RITA an apparatus for application of temporary inmersión in plant tissue culture. BIOVEG '97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas. Libro de Resúmenes: 1997.
35. Pérez J.N, (ED.). *Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, Cuba; 2003 400 pp. (Centro Agrícola, año 30, no.1)

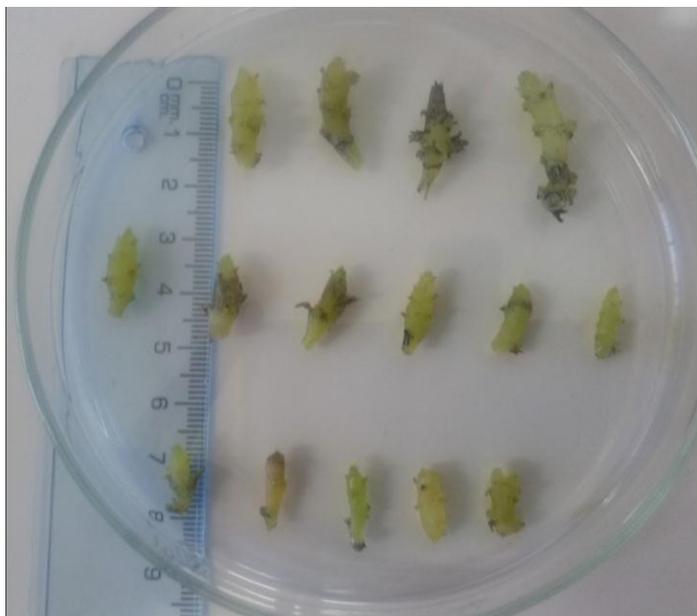
36. Chen F.Y., Wang D., Gao X., Wang L. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation of *Dioscorea nipponica* makino. *Plant Growth Regulation*; 2007: 26: 38-45.
37. Basail M, Empleo del Sistema de Inmersión Temporal para la multiplicación del clon de plátano vianda 'INIVIT PV 06-30' (AAB) y su generalización en las biofábricas; 2011.
38. Basail M, Medero V, Otero E, Torres M, Cabrera M, López J, et. al. Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Revista Biotecnología Vegetal*; 2011: 11(1): 27-31.
39. Ziv M, Simple bioreactor for mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed); 2005. pp. 79-93.
40. Feduchi Y Cols. *Bioquímica: conceptos esenciales*. Panamericana; 2011.
41. Baynes and Dominiczak. *Bioquímica Médica*. 3ª ed. Elsevier; 2011.
42. Kerbauy, G.B. – *Fisiología Vegetal*, Editora Guanabara Koogan / RJ.; 2004.
43. Kakimoto T. Biosíntesis de citoquininas. *J Plant Research*; 2003
44. Suarez I, Espitia M, Quintero I, Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento de *Stevia rebaudiana*. *Fitotecnia Colombiana*; 2006; 6(2):1-8.
45. Escalona M, Cid M, Lezcano Y, Capote I, Yáñez E, González J, Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. Efecto de la frecuencia de inmersión y el paclobutrazol. *BioVeg'99*. Ciego de Ávila, Cuba. Libro de resúmenes; 1999: p. 28.
46. Etienne H, Berthouly M, sistemas de inmersión temporal en la planta propagación. *Célula vegetal. Tejido. Organ Cult*; 2009: 69: 215-231.
47. Gopal J, Chamail A, Sarkar D, *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germoplasma: effect of genotype, abscisic acid and sucrose. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*; 2004: 40: 485-490.
48. Montoya N, Castro D, Díaz J, Rios G, Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo; 2008: 16(3): 288-295.
49. Igarza J, Feria M, Alvarado Y, et. al, empleo de microtubérculos de papa cv. 'andinita' obtenidos en sistemas de inmersión temporal para producir minitubérculos en casa de cultivo, *biotecnología vegetal vol. 13, no. 4: 209 - 217*, Santa Clara, Villa Clara. Cuba; 2003.
50. Mehotra S, Goel A, Kukreja B, Mishra, Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*; 2007: 6(13): 1484-1492.
51. Janet igarza, Manuel de feria, yelenys alvarado-capó, et. al, empleo de microtubérculos de papa cv. 'andinita' obtenidos en sistemas de inmersión temporal para producir minitubérculos en casa de cultivo, *biotecnología vegetal vol. 13, no. 4: 209 - 217*, Santa Clara, Villa Clara. Cuba; 2013.
52. Salauces R, Rocabado C, Blanc D, La producción de semilla Prebásica. Cochabamba, BO. (Unidad de Producción de Semilla de Papa); 1998: 57 p.
53. Santos R, González M, De Feria M, y Torres W, *Biotecnología Vegetal*. En colectivo de autores (eds.). *Las Investigaciones Agropecuarias en Cuba, cien años después*. La Habana, Cuba. Ed. Científico-Técnica; 2006: pp 207-221.
54. Aucasime Laura, *Clasificación de Cronquist A.*; 2016.
55. R version 3.4.3 (2017-11-30) -- "Kite-Eating Tree" Copyright (C) The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit); 2017.



## **ANEXOS**



**Anexo 1.** Medidas (0,86 – 1,09 cm) de los microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro*, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016



**Anexo 2.** Peso fresco (0,09g) de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro*, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 3.** *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 4.** Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” *in vitro* en medio MS sólido, accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



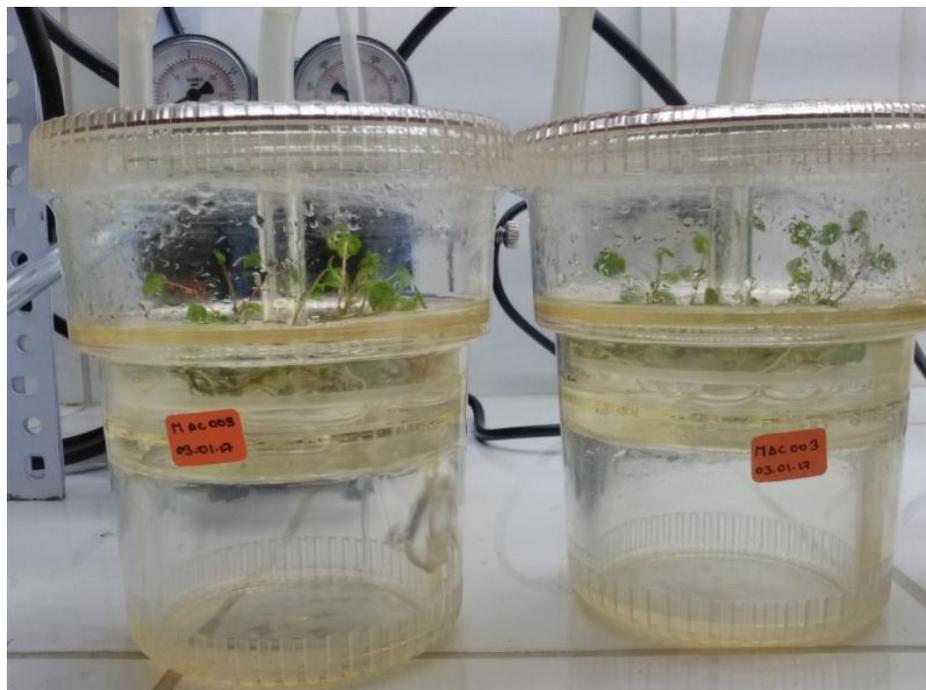
**Anexo 5.** Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” *in vitro* en medio MS líquido en proceso de micropropagación, accesión MAC003 utilizado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 6.** Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” *in vitro* en medio MS líquido, accesión MAC003 con tamaño adecuado para la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 7.** Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro* en funcionamiento del sistema de inmersión temporal con medio MS líquido para el proceso de tuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 8.** Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro* en el sistema de inmersión temporal cubierta con papel de aluminio para el proceso de tuberización y brindar la oscuridad necesaria para el tratamiento en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 9.** Microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro*, obtenido en la inducción para la obtención de microtubérculos en sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 10.** Coleccionando los microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro* del sistema de inmersión temporal, obtenido en la inducción de microtuberización del sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 11.** Medidas longitudinales de los microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro*, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 12.** Evaluación del crecimiento de plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro* en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.



**Anexo 13.** Promedios del tamaño y peso de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” accesión MAC003 *in vitro*, obtenidos en la inducción de microtuberización en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>TAMAÑO (cm)</b>	<b>PESO (g)</b>
<b>C3H X 2MIN</b>	1,09	0,09
<b>C5H X 2MIN</b>	0,86	0,09

**Anexo 14.** Componentes del tratamiento para la inducción de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” *in vitro*, en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

<b>MEDIO DE TUBERIZACIÓN</b>			
<b>MEDIO</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>BAP</b>	<b>TRAT. + OSCURIDAD</b>
MS	8%	2 ppm	C3H X 2MIN
MS	8%	2 ppm	C5H X 2MIN

**Anexo 15.** Componentes de la micropropagación para la inducción de microtubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” *in vitro*, en el sistema de inmersión temporal, Ayacucho 2016.

<b>MICROPROPAGACIÓN</b>		
<b>MEDIO</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>TRAT. + LUZ Y OSCURIDAD</b>
<b>MS</b>	8%	C3H X 2MIN
<b>MS</b>	8%	C5H X 2MIN

## Anexo 16. Certificado de identificación



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

### C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Biología, **Srta. Roxana Karen , CARHUAZ CONDORI**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

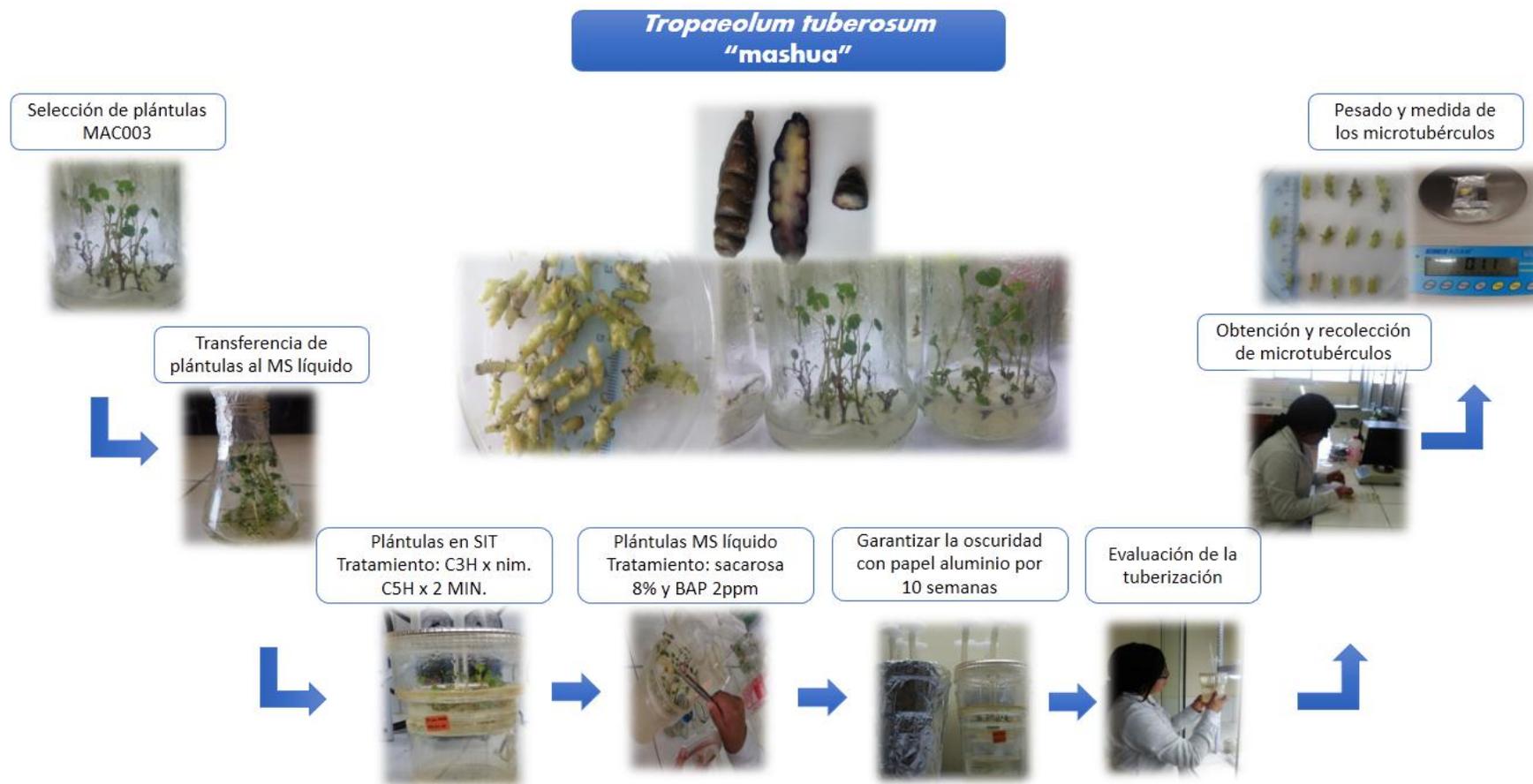
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	GERANIALES
FAMILIA	:	TROPAEOLACEAE
GENERO	:	Tropaeolum
ESPECIE	:	<b><i>Tropaeolum tuberosum Ruiz &amp; Pav.</i></b>
N.V.	:	"mashua"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 12 de Diciembre del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Elga. Laura Aucastine Medina  
JEFE

## Anexo 17. Procedimiento de la investigación



## Anexo 18. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLÓGICO
Obtención de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. "mashua" mediante el sistema de inmersión temporal – Ayacucho, 2016.	¿Cuál será la frecuencia del tiempo de inmersión temporal adecuado para la obtención de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. "mashua"?	<p><b>Objetivo general</b> Obtener microtubérculos del morfotipo MAC003 de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz &amp; Pav. "mashua" en sistema de inmersión temporal.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estandarizar el sistema de inmersión temporal para la obtención de microtubérculos de mashua.</li> <li>2. Determinar el tiempo óptimo de inmersión temporal para la obtención de microtubérculos de mashua.</li> <li>3. Evaluar el medio Murashige &amp; Skoog suplementado con BAP y sacarosa para la obtención de microtubérculos de mashua.</li> </ol>	<p><i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz &amp; Pav "mashua" Es una planta originaria de los Andes centrales.</p> <p><b>Sistema de inmersión temporal (SIT)</b> Son sistemas semiautomatizados en la propagación <i>in vitro</i> fundamentado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo.</p> <p><b>BAP</b> Estimula mediante la división celular; BAP incide favorablemente no solo en el número de brotes/explante.</p> <p><b>Sacarosa</b> La sacarosa, popularmente conocida por todos como azúcar común, es un disacárido que se encuentra formado por la combinación de glucosa y de fructosa.</p>	A mayor frecuencia de inmersión temporal se obtendrá una mayor obtención de microtubérculos de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav. "mashua".	<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b> -Concentración de sacarosa comercial <b>Indicador:</b> Concentración 8.0 %</p> <p>-Concentración de BAP (Hormona vegetal) <b>Indicador:</b> 2.0ppm</p> <p>-Frecuencia de tiempo de inmersión <b>Indicadores:</b> Cada 3 horas x 2 minutos Cada 5 horas x 2 minutos</p> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b> Un Morfotipo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> "mashua" <b>Indicador:</b> MAC003 -Tamaño de microtubérculos (cm) -Cantidad de microtubérculos</p>	<p><b>Selección de muestras</b> Se eligió plántulas del morfotipo MAC003 de mashua <i>in vitro</i>.</p> <p><b>Propagación de plántulas de mashua</b> Como fuente de los explantes se empleó brotes de "mashua" crecidas en condiciones de 18±1°C, fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad.</p> <p><b>Multiplificación en sistema de inmersión temporal</b> Las plántulas crecidas en medio semisólido por 15 días, fueron transferidos a frascos (matraz) conteniendo 100mL medio líquido MS suplementado con 3% de sacarosa a un pH de 5.6. Los frascos se mantuvieron en constante agitación.</p> <p><b>Tuberización en el sistema de inmersión temporal</b> Se empleó el medio de cultivo Murashige &amp; Skoog líquido suplementado con 2 ppm de BAP y 8% de sacarosa, posteriormente se transfirió las plántulas de los frascos (matraz) a los envases sistema de inmersión temporal RITA®.</p> <p><b>ANÁLISIS DE DATOS</b> Los datos obtenidos del diseño estadístico completamente aleatorizado, fueron ingresados a una base de datos en Microsoft Excel, y se realizó el análisis de variabilidad para comparar dos medianas utilizando para ellos la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. El programa estadístico empleado fue R versión 3.4.3 (2) y IBM SPSS versión 24.</p>