

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto antimicrobiano *in vitro* de nanopartículas de plata y del inhibidor químico de contaminación PTC^{3 TM} en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” – Ayacucho 2016.

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

Presentado por la:
Bach. FERNANDEZ NUÑEZ, Kelyn Jamey

AYACUCHO – PERÚ
2018

A mis padres: Antonia Nuñez y
Ricardo Fernandez, por ser partes
indisolubles de mi vida.

AGRADECIMIENTO

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

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por su contribución en la mejora de formación de buenos profesionales a la vanguardia de la región.

A la Escuela Profesional de Biología y a sus docentes biólogos, quienes me inculcaron en la preparación y formación profesional.

A CONCYTEC, que a través del proyecto financiado MINEDU-CIENCIATIVA-CONVENIO 199-2015-FONDECYT me permitió la realización de la tesis.

Al Blgo. Rolando Estrada Jiménez, catedrático de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) - Lima, por acogerme en su laboratorio, brindándome apoyo y asesoramiento.

Al Ing. Justiniano Quispe Marcatoma, Director del Centro de investigaciones tecnológicas, biomédicas y medioambientales - UNMSM - Lima, por permitirme el acceso a sus instalaciones y equipamiento.

Al Blgo. Reynan Cóndor Alarcón, por su paciencia, y apoyo en el desarrollo de la redacción de tesis y análisis estadístico.

Al Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por su confianza, apoyo y enseñanza en el aprendizaje y desarrollo de la redacción de tesis.

A la Blga. Sonia Palomino Felices, por su cariño especial y preocupación.

A Fabrizio y Dylan, por ser mi inspiración y motivación.

A mis hermanos: Carmen, Daniel, Lucy, Yurico y Kenyero, por sus enseñanzas y amor.

A Yosemir, Jhilary, Chiara, Brinny, Yosbel y Daniela por su contribución en mi bienestar emocional.

A Hely, mi mejor amiga, por tu compañía incondicional.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Microorganismos en el cultivo in vitro de células y tejidos vegetales	5
2.2.1. Contaminación endógena o latente	7
2.2.2. Contaminantes introducidos en el laboratorio	7
2.2.3. Contaminación bacteriana en el cultivo in vitro de células y tejidos vegetales	9
2.3. Efecto de las Nanopartículas de plata	9
2.4. Inhibidor químico de contaminación PTC3	11
2.5. Influencia de las nanopartículas de plata en la mitosis	11
2.6. Micropropagación	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Material biológico	15
3.2. Preparación del medio de cultivo MS suplementado con nanopartículas de plata	16
3.3. Preparación del medio de cultivo MS suplementado con PTC3	16
3.4. Micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pav.	17
3.5. Análisis de datos	18
IV. RESULTADOS	19
V. DISCUSIÓN	49
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Seguimiento del efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de las nanopartículas de plata en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante 4 semanas	20
Tabla 2. Seguimiento del efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del PTC ³ ™ en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante 4 semanas.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tubérculo de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua”. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	16
Figura 2. Número de hojas en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	22
Figura 3. Número de hojas promedio en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	23
Figura 4. Número de nudos en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	24
Figura 5. Número promedio de nudos en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	25
Figura 6. Tamaño de las plántulas en <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg.	26
Figura 7. Tamaño promedio de plántulas en <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación in vitro en MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	27
Figura 8. Número de raíces en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	28

Figura 9.	Número promedio de raíces en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	29
Figura 10.	Tamaño de raíces en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	30
Figura 11.	Tamaño promedio de las raíces en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	31
Figura 12.	Número de hojas en <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC ³ . Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	32
Figura 13.	Número promedio de hojas en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC ³ . Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	33
Figura 14.	Número de nudos en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC ³ . Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	34
Figura 15.	Número promedio de nudos en plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 a la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC ³ . Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.	35
Figura 16.	Tamaño de las plántulas en <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de	36

cultivo MS suplementado con PTC³. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

- Figura 17. Tamaño promedio de plántulas en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 37
- Figura 18. Número de raíces en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 38
- Figura 19. Número promedio de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 39
- Figura 20. Tamaño de raíces en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 40
- Figura 21. Tamaño promedio de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 41
- Figura 22. Número promedio de hojas por tratamiento (NPsAg y PTC³) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 42
- Figura 23. Número promedio de nudos por tratamiento (NPsAg y PTC³) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semanas 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 43

- Figura 24. Tamaño promedio de plántulas por tratamiento (NPsAg y PTC³) en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 44
- Figura 25. Número promedio de raíces por tratamiento (NPsAg y PTC³) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 45
- Figura 26. Tamaño promedio de raíces por tratamiento (NPsAg y PTC³) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskall - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017. 46

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Pruebas de normalidad para los tratamientos de MS suplementado con NPsAg.	63
Anexo 2. Prueba de ANOVA para el tamaño de plántulas que crecieron en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg.	64
Anexo 3. Comparaciones múltiples entre tratamientos para el tamaño de plántulas que crecieron en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg.	65
Anexo 4. Pruebas no paramétricas de las características biométricas que no poseen normalidad en los tratamientos con NPsAg.	66
Anexo 5. Estadísticos de contraste ^{a,b} de aquellas características biométricas sin normalidad en los tratamientos con NPsAg.	67
Anexo 6. Prueba de kruskall Wallis del número de hojas del tratamiento con NPsAg.	67
Anexo 7. Estadísticos de prueba ^{a,b} del número de hojas en los tratamientos con NPsAg.	67
Anexo 8. Prueba de Bonferroni del número de hojas en los tratamientos con NPsAg.	68
Anexo 9. Prueba de kruskall Wallis del número de nudos en los tratamientos con NPsAg.	68
Anexo 10. Estadísticos de prueba ^{a,b} para el número de nudos en los tratamientos con NPsAg.	68
Anexo 11. Prueba de Bonferroni para el número de nudos en los tratamientos con NPsAg.	69
Anexo 12. Prueba de kruskall Wallis del número de raíces en los tratamientos con NPsAg.	69
Anexo 13. Estadísticos de prueba ^{a,b} para el número de raíz en los tratamientos con NPsAg.	69
Anexo 14. Prueba de Bonferroni para el número de raíz en los tratamientos con NPsAg.	70
Anexo 15. Prueba de kruskall Wallis el tamaño de raíces en los tratamientos con NPsAg.	70
Anexo 16. Estadísticos de prueba ^{a,b} del tamaño aproximado de las raíces en los tratamientos con NPsAg.	70
Anexo 17. Prueba de Bonferroni del tamaño aproximado de las raíces en	71

	los tratamientos con NPsAg.	
Anexo 18.	Pruebas de normalidad realizadas a los datos obtenidos en los tratamientos con PTC ³ .	71
Anexo 19.	ANOVA de un factor para el número de hojas en los tratamientos con PTC ³ .	72
Anexo 20.	Comparaciones múltiples para el número de hojas en los tratamientos con PTC ³ .	72
Anexo 21.	ANOVA de un factor para el número de hojas en los tratamientos con PTC ³ .	73
Anexo 22.	Comparaciones múltiples entre tratamientos para el número de hojas en los tratamientos con PTC ³ .	73
Anexo 23.	ANOVA de un factor para el tamaño de plántula en los tratamientos con PTC ³ .	74
Anexo 24.	Comparaciones múltiples entre tratamientos para el tamaño de plántulas en los tratamientos con PTC ³ .	74
Anexo 25.	Prueba de Kruskal Wallis del número de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	75
Anexo 26.	Estadísticos de contraste ^{a,b} del número de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	75
Anexo 27.	Prueba de Bonferroni del número de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	76
Anexo 28.	Prueba de Kruskal Wallis para el tamaño de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	76
Anexo 29.	Estadísticos de contraste ^{a,b} del tamaño de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	77
Anexo 30.	Prueba de Bonferroni del número de raíces en los tratamientos con PTC ³ .	77
Anexo 31.	Sonicador utilizado para para disolver las Nanopartículas de plata en el medio de cultivo MS.	78
Anexo 32.	Composición y preparación del medio MURASHIGE Y SKOOG.	79
Anexo 33.	Planta de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” <i>in vivo</i> .	80
Anexo 34.	Plántulas de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “mashua” <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS suplementado con nanopartículas de plata a 20 ppm.	80
Anexo 35.	Matriz de consistencia.	81

RESUMEN

El cultivo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua” es vulnerable a ataques de plagas y enfermedades que pueden causar la pérdida total del producto. Por lo tanto, para poder controlar de manera más efectiva este cultivo, se realiza *in vitro*, lo cual conlleva necesariamente a una serie de pretratamientos para la desinfección; no obstante y, a pesar de ello, aún persiste el problema de contaminación durante la fase de micropropagación, un material libre de microorganismos patógenos es una de las premisas fundamentales para la comercialización de plantas *in vitro*, el intercambio de germoplasma o el mejoramiento genético. La existencia de contaminantes exófitos y endófitos en los tejidos a cultivar, en ocasiones no visibles para el operario, acarrea en las subsiguientes fases un menor rendimiento y la pérdida total de las plántulas después de unos meses de trabajo por lo que una posible solución frente a esta problemática es el empleo de nanopartículas de plata (NPsAg) y el inhibidor químico de contaminación (PTC³). Debido a que esta es una “nueva” herramienta para el control de enfermedades en humanos y plantas, ya que ha demostrado que logran la inhibición del crecimiento de muchos microorganismos patogénicos, se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata y el inhibidor químico de contaminación en la micropropagación del morfotipo MAC003 de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. “mashua”. Se trabajó a las concentraciones de 20, 50 y 100 ppm de NPsAg y 0.2, 0.5 y 5 ppm de PTC³™ con 30 repeticiones para cada ensayo, los cuales fueron disueltos en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) sin autoclavar, suplementado con sacarosa a un 3%, regulado a un pH de 5.6, las plántulas fueron evaluadas durante las subsiguientes 4 semanas. El análisis estadístico de los resultados fue el análisis de varianza (ANOVA), Kruskal Wallis y Bonferroni a α : 0.05. Se comprobó que, para todas las concentraciones empleadas en el experimento tanto el caso de las nanopartículas de plata como del inhibidor químico de contaminación PTC³™, controlaron la contaminación microbiana, lo cual permitió eliminar el proceso del autoclavado de los medios de cultivo para la micropropagación, además indica un control efectivo de contaminación en la micropropagación del morfotipo MAC 003, además al asociar la concentración de ambos productos con el desarrollo de las características biométricas de las plántulas, se observó que utilizando las NPsAg y el PTC³™ a mayores concentraciones, inhibieron el desarrollo de las plántulas y al comparar las características biométricas de las plántulas desarrolladas en NPsAg y el PTC³™ respectivamente, el PTC³™ a 0.2 ppm mostró mejores resultados.

Palabras clave: Efecto antimicrobiano, nanopartículas de plata, PTC³, *Tropaeolum tuberosum*

I. INTRODUCCIÓN

De la diversidad de tubérculos que se consumen y comercializan en nuestra región la especie *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua”, ocupa un lugar expectante, es catalogado como el cuarto en importancia de la zona altoandina después de la papa, oca y olluco; sus tubérculos tienen propiedades nutricionales y medicinales; su propagación se realiza tradicionalmente usando los tubérculos, sin embargo, no garantiza un buen rendimiento debido a que presenta problemas de fitosanidad, por tanto la propagación *in vitro* o micropropagación es una alternativa de solución. No obstante, la micropropagación para esta especie ha sido escasamente abordada y existe poca bibliografía. Las ventajas de la propagación clonal es la factibilidad de obtener grandes cantidades en un período relativamente corto, alta homogeneidad del fenotipo, rejuvenecimiento del material vegetal, entre otros. A pesar de las ventajas de esta técnica, la contaminación de explantes, plántulas y medio de cultivo es un problema frecuente que afecta la asepsia del cultivo *in vitro*. El éxito del establecimiento de la micropropagación depende en gran medida, de la remoción de microorganismos contaminantes siendo los hongos y bacterias los microorganismos más comunes encontrados. La estrategia de la técnica mencionada requiere del desarrollo de procedimientos bien estructurados, siendo minucioso con cada factor como es la asepsia, si pretendemos lograr alta producción de plántulas, por lo tanto, es necesario implementar metodologías que aseguren obtener medios de cultivo libres de microorganismos.

Una estrategia alterna para el control de los microorganismos en el cultivo *in vitro* es el uso de los antibióticos, sin embargo, éstos son frecuentemente fitotóxicos y en algunos casos inhiben el crecimiento de las plántulas. Por las consideraciones señaladas en el presente trabajo se utilizó NPsAg y PTC³ que

constituyen una alternativa para garantizar la asepsia de los cultivos. De acuerdo a la literatura científica, ambos productos tienen efecto microbicida en diferentes áreas, disminuyen significativamente la contaminación *in vitro* permitiendo la obtención de plántulas viables.

Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* de nanopartículas de plata y del inhibidor químico de contaminación PTC³™ en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antimicrobiano de NPsAg y del PTC³™ respectivamente en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” durante 4 semanas.
- Asociar las concentraciones de NPsAg y del PTC³™ en cada medio de cultivo, con el desarrollo de las plántulas de “mashua”, mediante las características biométricas.
- Comparar el desarrollo de las plántulas de “mashua” en el medio de cultivo suplementado con NPsAg y del PTC³™, respectivamente.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Desde el principio el ser humano ha estado expuesto a nanopartículas de origen natural como son los aerosoles de origen marino,¹ las nanopartículas resultantes de las erupciones volcánicas y los fullerenos o nanotubos generados por la combustión. Desde la llegada de la revolución industrial esta exposición se ha incrementado dramáticamente debido a la presencia de fuentes antropogénicas como la combustión interna de los motores de explosión, las centrales térmicas y otras fuentes de termodegradación.² Sin embargo, en la actualidad la fuente principal de exposición a nanopartículas para los humanos se asocia con la existencia de nuevas nanopartículas fruto del rápido desarrollo de la nanotecnología.

La industria de la nanotecnología está sufriendo un rápido crecimiento dados los beneficios que se asocian a los nuevos nanomateriales, los cuales van a tener un importante impacto económico y científico, ya que son aplicables en una amplia variedad de áreas desde la ingeniería aeroespacial y la nano-electrónica hasta la remediación medioambiental y el cuidado de la salud.¹ El diseño y desarrollo de nuevos nanomateriales tienen una importancia fundamental debido a las nuevas características físico-químicas que éstos ofrecen, tales como aumento de la conductividad térmica o eléctrica, aumento de la resistencia y dureza de los materiales, aumento de la actividad catalítica y propiedades ópticas avanzadas, entre otras.²

Estudios recientes indican que en los últimos años existe un crecimiento exponencial de productos que contienen nanomateriales, hasta el año 2010 se estimó que aproximadamente unos 1300 productos comerciales contenían nanomateriales, esperándose que en el transcurso de los próximos años la cantidad de productos incremente de manera significativa. Entre los productos

que contienen nanomateriales se encuentran los cosméticos, cremas solares, aditivos alimenticios, sistemas de administración de medicamentos, productos terapéuticos, biosensores, y fármacos, entre otros.¹

Se realizó un estudio para evaluar el potencial de las nanopartículas de plata en la eliminación de contaminantes de los explantes de *Olea europea* “oliva”, los cuales fueron sembrados en medio de cultivo MS. Treinta días posteriores al cultivo los porcentajes de infección y muerte de los explantes fueron calculados. Los resultados mostraron que las nanopartículas son muy efectivas previniendo la contaminación de los explantes pero en altas concentraciones inhibieron el crecimiento de las plántulas.³

En el 2011, un estudio realizado determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de las NPsAg sobre *Escherichia coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a la Metilicina (SARM) por medio del método de microdilución y difusión en disco, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de las NPsAg sintetizadas. Adicionalmente, se evaluó el efecto sinérgico entre las NPsAg sintetizadas y cuatro antibióticos con diferentes mecanismo de acción antimicrobiana: Ampicilina, Kanamicina, Eritromicina y Ofloxacina. Las AgNPs sintetizadas exhibieron tanto actividad bacteriostática como bactericida frente a las cepas patógenas estudiadas, alcanzando valores de CMI y CMB de 0.25 y 1 µl/mL, respectivamente, estos resultados demuestran el potencial de las AgNPs sintetizadas por reducción química como agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas *in vitro*.⁴

Un estudio en el 2014, trabajó en el establecimiento de un protocolo de desinfección para el cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni “estevia”, mediante el uso de nanopartículas de plata. En este estudio se evaluó el efecto microbicida de las NPsAg sobre el porcentaje de contaminación y sobrevivencia de explantes. Se utilizaron nudos como fuente de explante y fueron tratados con NPsAg a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 mg.L⁻¹ y tiempos de exposición (5, 10 y 20 min). Los resultados mostraron que el incremento de NPsAg reducen los porcentajes de contaminación y sobrevivencia. El tiempo de exposición no es un factor determinado en la respuesta. La concentración de 50 mg.L⁻¹ fue la más adecuada para disminuir la contaminación sin afectar los porcentajes de sobrevivencia.⁵

En el 2016, se realizó un estudio en el cual se reportó la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por nanopartículas de cobre cementado y de cobre

comercial, se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positiva) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram negativa) para determinar el efecto inhibitorio mediante la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas diluidas en caldo de cultivo nutritivo y distribuidas en placas de ELISA. Los resultados indicaron que las nanopartículas de cobre comercial muestran acción inhibitoria del crecimiento de la cepa *S. aureus* y no así en la cepa *E. coli*. Asimismo, se determinó que la concentración mínima inhibitoria de la muestra de cobre comercial fue de 20 µg/mL frente a *S. aureus*. El cobre cementado no mostró efecto inhibitorio del crecimiento en ninguna de las dos cepas estudiadas.⁶

En el 2016, se trabajó utilizando el producto PTC³, el cual fue añadido al medio de cultivo tres meses después de la introducción *in vitro* para contrarrestar las bacterias endógenas que se encuentran en *Carica papaya* L. “papaya”, se dejó crecer a las plántulas en este medio de cultivo suplementado con PTC³ hasta el día 100, para lo cual no mostró alguna contaminación, posteriormente se traspasaron las plántulas a otros medios de cultivo para su elongación.⁷

Se realizó un estudio utilizando el PTC³ en la desinfección de explantes para la introducción *in vitro* de *Delphinium elatum* “Black Velvet”, junto a otros desinfectantes como el hipoclorito de sodio y la Kanamicina a concentraciones diferentes con el propósito de eliminar la contaminación del explante. Se realizaron evaluaciones de contaminación, necrosamiento y viabilidad de los explantes a los 7 y 15 días de haber sido sembrados. El tratamiento que mostró un mayor porcentaje de explantes viables fue el tratamiento que utilizó hipoclorito de sodio al 3% y sometiendo los explantes a termoterapia durante 24 horas a 4 °C por lo que podríamos considerarlo el mejor.⁸

2.2. Microorganismos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

La presencia de microorganismos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, de forma general, ha sido considerada indeseable a partir de que este se ha definido como aséptico. Tal problemática constituye uno de los principales obstáculos para el uso de métodos biotecnológicos con fines científicos o comerciales. Durante el crecimiento y desarrollo de las plantas muchos microorganismos habitantes de la rizósfera, patógenos, o no, pueden entrar a los tejidos de forma oportunista a través de aberturas naturales, heridas, etc. y colonizarlos^{9,10}, se considera a las plantas y a los microorganismos en la naturaleza como parte de un ecosistema tendiente a lograr el equilibrio. Dentro

del microsistema de la planta, diferentes especies microbianas pueden ser capaces de interactuar y establecerse. Algunas de ellas se reconocen como especies dominantes¹¹ y están representadas por aquellos microorganismos más frecuentemente aislados. De igual forma hay un grupo de especies que no se aíslan con facilidad debido a su bajo número. Así, las plantas desarrollan microbiotas endofíticas de variable composición de especies que incluyen microorganismos inter e intracelulares tales como: virus, viroides, bacterias y hongos. En el establecimiento *in vitro* de los tejidos en dependencia del tipo de explante utilizado estos microorganismos pueden introducirse.⁹ Se mencionan como contaminantes tanto a patógenos de las plantas que se cultivan *in vitro* como a saprofitos.

Una amplia variedad de microorganismos (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides) patógenos o no de las plantas cultivadas en condiciones naturales han sido identificados como contaminantes *in vitro*. Los mismos pueden ser introducidos con el explante inicial, durante las manipulaciones en el laboratorio o por microartrópodos.^{9,12} Entre ellos, las bacterias han sido consideradas como las que causan los daños más serios.

El desconocimiento de las especies bacterianas que contaminan los cultivos que se micropropagan y el efecto que pueden tener sobre las plantas *in vitro*, ha llevado a que en las biofábricas no se cuantifique su presencia y no se asuman como pérdidas las plantas *in vitro* contaminadas con bacterias hasta tanto el deterioro de las mismas impida su subcultivo. Por otra parte, en los laboratorios de investigación a pesar de que la contaminación bacteriana tampoco se registra ni se refiere generalmente en las publicaciones científicas, su incidencia ha limitado y entorpecido investigaciones sobre embriogénesis somática, semilla artificial, propagación de especies forestales y frutales, transformación genética, etc.^{13,14} El efecto negativo de los contaminantes microbianos sobre el material vegetal ha sido descrito por varios autores.¹⁵ Aquellos causantes de daños *in vitro* pero no necesariamente en condiciones *in vivo* se han considerado “vitropatógenos”.¹⁶

Se considera que la contaminación por microorganismos es un problema multicausal y que estos pueden introducirse al proceso tanto con el explante inicial como en el laboratorio. De esta forma, se reportan contaminantes endógenos o latentes cuando aparecen asociados al explante en las diferentes fases de la micropropagación (principalmente en las fases de multiplicación y

enraizamiento) y por otra parte, se mencionan a aquellos microorganismo que se introducen en el laboratorio por técnicas inadecuadas de trabajo.

2.2.1. Contaminación endógena o latente

La contaminación endógena se hace referencia de forma general a los microorganismos asociados al explante inicial; patógenas o no,) en los cultivos *in vitro*.¹⁵

Los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos asociadas a los tejidos de las plantas, algunas especies tienen la capacidad de manifestar crecimiento en los medios de cultivo inmediatamente, pero otras permanecen latentes por largos períodos de tiempo en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores, por lo que quedan protegidos de los agentes químicos debido a la ausencia de síntomas visibles sobre el material vegetal o de crecimiento microbiano sobre el medio de cultivo. De esta forma se introducen en el cultivo de tejidos vegetales, se propagan con el material vegetal y pueden permanecer sin expresarse en los medios de cultivo por largos períodos de tiempo. Debido a la inhibición ocasionada por elevadas concentraciones de sales, sacarosa o el pH pero después que hayan incrementado su número en el interior del tejido vegetal o las condiciones del ecosistema *in vitro* lo permiten, aparecen súbitamente¹¹ y pueden conllevar a pérdidas de más del 20%.¹⁵

Por otra parte, los microorganismos que se introducen en el laboratorio son generalmente habitantes del suelo que se encuentran en el ambiente, saprofitos o patógenos de las plantas¹⁷ así como habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano que se han relacionado con procedimientos inadecuados, condiciones higiénico sanitarias deficientes o incumplimientos de la disciplina tecnológica.¹⁸

2.2.2. Contaminantes introducidos en el laboratorio

Existen muchas fuentes que pueden introducir contaminantes microbianos al cultivo *in vitro* de plantas. Su determinación a menudo se dificulta ya que los análisis se realizan *post mortem* cuando han intervenido numerosos factores.

Entre las principales fuentes de contaminación por microorganismos se citan: los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, los operadores y técnicas deficientes de esterilización. Además, los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas.^{12,19}

2.2.2.1. Los explantes

Hace mucho tiempo que se ha reconocido que muchos microorganismos son residentes comunes de las plantas y pueden ejercer influencia sobre su sanidad en determinadas condiciones o tener una relación estrictamente comensal con su planta hospedera. Debido a la importancia económica de la sanidad de las plantas, numerosas investigaciones sobre las bacterias se han centrado en los patógenos y se ha prestado poca atención a los comensales estrictos²⁰. A partir de estudios de especies de plantas de importancia agrícola y hortícola se conoce que una gran variedad de géneros bacterianos pueden ser aislados del interior del tejido de las plantas sanas.²¹

Los microorganismos epifíticos o endofíticos de las plantas pueden ser introducidos al cultivo *in vitro* con el explante inicial. Con el cultivo de meristemos, según el tamaño que se establezca, muchos de ellos pueden ser eliminados pero en explantes de hojas, pecíolos o tallos, en su mayoría, no es posible.⁹

Las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* se han referido como las causantes de las mayores pérdidas en las primeras fases de la micropropagación lo cual se ha explicado porque son las bacterias más abundantes en la superficie aérea de las plantas y el suelo, y se les considera como microorganismos indicadores de ineficiente desinfección de los explantes en la fase de establecimiento.¹⁵

Antes de que puedan ser usados con efectividad protocolos de desinfección, se requiere conocer la microbiota asociada con las plantas que serán micropropagadas.²²

2.2.2.2. El ambiente de los locales

El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación ya sea directa o indirectamente. A través de las corrientes de aire las partículas de suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran por los acondicionadores de aire, son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas. Este aspecto quedó demostrado en investigaciones realizadas, quienes encontraron una correlación directa entre especies y géneros de levaduras y hongos filamentosos hallados en el ambiente de los laboratorios y aquellos que se identificaron como contaminantes de los cultivos.¹⁵

La contaminación puede diseminarse por ácaros y trips (que también se introducen al ambiente de los locales de trabajo por los conductos de los acondicionadores de aire, adheridos al vestuario del personal, con los explantes que se llevan al laboratorio desde condiciones *ex vitro* para su establecimiento, etc. Varias especies de ácaros se han identificado en el cultivo de plantas *in vitro* pertenecientes a los géneros: *Tyrophagus sp.*, *Siteroptes sp.*, *Pyemotes sp.* y *Tarsonemus sp.*¹⁹

2.2.2.3. Operadores

El hombre interviene directamente en todas las operaciones que se realizan en el cultivo *in vitro* de plantas y es una fuente primaria de contaminantes a través del estornudo, la tos, la conversación, etc. La presencia de microorganismos contaminantes que son habitantes de la microbiota normal del cuerpo humano como por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y *Micrococcus spp.* generalmente indica ineficientes técnicas de asepsia por parte de los operarios.^{12,18}

2.2.3. Contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales

Las bacterias encontradas como contaminantes en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales pertenecen a varios grupos ecológicos. Ellos incluyen a patógenos de plantas, epifitos, endofitos y contaminantes accidentales por ejemplo del aire o del hombre²³. De este modo algunas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantes pero otras se introducen durante los procedimientos de trabajo en el laboratorio.^{12,15}

Como contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, entre otros. Se estudió la composición de las comunidades bacterianas que crecían sobre plantas *in vitro* de *Delphinium* y *Hemerocallis* y llegaron a la conclusión de que podían variar considerablemente entre diferentes especies de plantas.^{15,12} Esto usualmente se atribuye a que especies de bacterias específicas de plantas han sido introducidas en el cultivo *in vitro* con el material vegetal.^{24,25}

2.3. Efecto de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata están clasificadas como nanopartículas metálicas y a su vez hacen parte de los metales nobles entre los cuales se encuentran

además oro, platino y paladio. Pueden ser usadas como agentes antibacterianos, materiales ópticos, superconductores, catalizadores, entre otras aplicaciones. La eficiencia de las NPsAg en estas áreas está relacionada con el tamaño de partícula y con su morfología. Generalmente, el tamaño y la morfología se controlan ajustando las condiciones de reacción según el método de síntesis utilizado. Una de las ventajas que tiene las NPsAg es la posibilidad de realizar la síntesis en condiciones ambientales, usando medios acuosos u orgánicos gracias a la estabilidad que tiene este metal cuando presenta valencia cero.²⁶

La capacidad microbiocida de las nanopartículas está vinculada a la naturaleza del material y a ciertas características intrínsecas de las mismas, como sus dimensiones nanométricas (lo cual les permite ser internalizadas con mayor facilidad en microorganismos) y la alta relación área/volumen que permite un mayor contacto e interacción con dichos microorganismos. Entre las nanopartículas que han demostrado tener propiedades microbicidas las más importantes son las de plata, óxido de zinc, cobre u óxidos de hierro. Las primeras tres sustancias ya presentan esta propiedad en su forma macroscópica, mientras que los óxidos de hierro únicamente resultan ser microbicidas en forma nanoestructurada.²⁷

Los mecanismos de toxicidad que presentan las nanopartículas con acción bactericida sobre los microorganismos no han sido completamente dilucidados, aunque se han postulado varios. Entre éstos se pueden mencionar perturbaciones en las funciones de la membrana celular (las cuales alteran la permeabilidad y la respiración celular), el ingreso de las nanopartículas a la célula, lo que genera una alteración en las funciones de las proteínas y el ADN, o la producción de especies oxidativas debido a la presencia de nanopartículas en el interior de la célula¹³ no es sencillo realizar un análisis comparativo de los datos de la bibliografía ya que la acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar: el tamaño y la forma de las nanopartículas, su composición química, el recubrimiento y su carga superficial potencial y la concentración de nanopartículas usada.²⁸

Dentro de la familia de las nanopartículas metálicas, aquellas que han suscitado el mayor interés son las nanopartículas de plata (NPsAg), entre otros motivos debido a que las sales de este metal ya se utilizan desde hace mucho tiempo en preparaciones (por ejemplo en cremas tópicas) y en vendajes, entre otros.²⁸

2.4. Inhibidor químico de contaminación

El PTC³ (Inhibidor de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales), es un biocida de amplio espectro que comúnmente se añade a los medios de cultivo de tejidos vegetales para reducir la contaminación bacteriana y fúngica, de apariencia clara, líquida y soluble en agua. Debido a que es un biocida de amplio espectro, también se puede utilizar en el proceso de la desinfección. Las dosis recomendadas de PTC³ son de 0.2 - 2 mL / L para uso general y como biocida se recomienda en cantidades superiores a 2 mL / L. La probabilidad de que los microorganismos contaminantes adquieran resistencia contra el PTC³ es relativamente baja debido a que inhibe la formación de varias enzimas y no de una en particular.²⁹

Estudios biológicos realizados han comparado el PTC³ con otro producto popular de control de la contaminación, y se evidenció que tiene un rendimiento equivalente en la reducción del crecimiento bacteriano y fúngico, tanto *Bacillus subtilis* como *Escherichia coli* que fueron inoculadas en crecimiento de fase logarítmica en medio de cultivo líquido Murashige & Skoog (MS) con 0,2% (v/v) de PTC³ o 0,2% (v/v) de producto competidor, no hubo crecimiento microbiano. También se demostró que el PTC³ inhibe el crecimiento fúngico de *Aspergillus niger* en medios de cultivo sólidos. Los componentes de este producto pueden estar limitados por proteínas en los medios (por ejemplo, peptona, caseína) y hacerse inactivos.

También se menciona que no hay sustituto para la desinfección adecuada de explantes en el mantenimiento de cultivos a largo plazo. Sin embargo, para fines de demostración educativa o para aficionados que buscan un cultivo de tejidos de plantas totales, PTC³™ le permitirá realizar cultivos de tejidos de rutina con menor rigor y una menor preocupación de perder su cultivo de tejidos a la contaminación diaria.³⁰

2.5. Influencia de las nanopartículas de plata en la mitosis

Los posibles efectos sobre la salud y el medio ambiente de las nanopartículas deben evaluarse exhaustivamente antes de su comercialización generalizada. Aunque hay pocos estudios sobre citotoxicidad de nanopartículas en mamíferos y líneas celulares humanas, apenas hay informes sobre el comportamiento genotóxico y citotóxico de las nanopartículas en células vegetales.

Las nanopartículas de plata podrían penetrar el sistema de la planta y puede perjudicar las etapas de la división celular causando puente de cromatina,

pegajosidad, metafase alterada, múltiples rupturas cromosómicas y desintegración celular.

En un estudio realizado y que tuvo como objetivo investigar los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata en las células de la raíz de *Allium cepa* “cebolla” como un organismo indicador, para estudiar puntos finales como índice mitótico, distribución de células en fases mitóticas, diferentes tipos de cromosomas aberraciones, metafase alterada, cromosoma adhesivo, desintegración de la pared celular y roturas.³¹

En este estudio, las nanopartículas de plata exhibieron citotoxicidad disminuyendo el índice mitótico de una manera dependiente de la dosis. Esto demuestra que las nanopartículas de plata pueden tener un efecto mitodepresivo en la “cebolla”. Muchas investigaciones han demostrado que la reducción de la actividad en la célula podría deberse a cambios en la duración del ciclo mitótico. Unos pocos los autores atribuyen la inhibición de la mitosis al aumento de la duración en la fase S.³²

Las aberraciones cromosómicas son cambios en la estructura cromosómica resultante de una ruptura o intercambio de material cromosómico. En este estudio, se observaron diferentes tipos de aberraciones cromosómicas con diferentes concentraciones de suspensiones de nanopartículas de plata. Ambas aberraciones fisiológicas y clastogénicas como pegajosidad, roturas, lagunas, metafase alterada y desintegración de la pared celular fueron notables en las células tratadas. La pegajosidad cromosómica se observó en etapas de metafase y anafase, la adherencia podría deberse a degradación o despolimerización de ADN cromosómico³³. La pegajosidad también se ha atribuido a enredo de fibras de cromatina inter cromosómicas. La pegajosidad es un signo común de influencia tóxica en los cromosomas y es probable un efecto irreversible. La metafase perturbada observada podría deberse a la perturbación en el aparato de husillo. La desintegración de la pared celular apareció en las células tratadas con 100 ppm de suspensión de nanopartículas.³⁴

Estudios previos con líneas celulares de mamíferos también demostraron que las nanopartículas penetraron estructuras subcelulares como las mitocondrias y el núcleo causando el desacoplamiento de la respiración y el aumento del estrés oxidativo.³⁵

Se están realizando más estudios para correlacionar los efectos citotóxicos y genotóxicos observados con parámetros fisicoquímicos pertenecientes a las

partículas, el transporte de las partículas a las células y la biopsia de estas partículas por las células.³⁶

2.6. Micropropagación

La micropropagación constituye la principal aplicación comercial del cultivo de tejidos vegetales. Consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de Cultivo de Tejidos. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación limitada. Se realiza bajo estrictas condiciones de esterilidad, en un medio sintético nutritivo y con el control de temperatura, luz y fotoperíodo.³⁷

La micropropagación presenta numerosas ventajas, entre las que podemos mencionar:

- Propagación vegetativa rápida y a gran escala
- Uniformidad seleccionada del material clonado
- Multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales
- Reducción en el tiempo de multiplicación y el espacio requerido para tal fin
- Mayor control sobre la sanidad del material propagado
- Introducción rápida de nuevos cultivares
- Conservación de germoplasma
- Facilidades para el intercambio internacional del material vegetal³⁷

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

El morfotipo MAC 003 de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” fue colectado en la localidad de Yaruca del distrito de Vinchos, provincia de Huamanga del Departamento de Ayacucho, entre latitud Sur Este 555290.51 UTM, Longitud Oeste Sur 8524274.99 UTM y entre las altitudes de 3 739 msnm.³⁸

Es una planta herbácea, generalmente suculenta, de tallos postrados frecuentemente trepadores por pecíolos sensitivos que se enrollan con raíces tuberosas, sus hojas son alternas, peltadas a veces lobadas, sin estípulas; flores perfectas, zigomorfas, espolonadas, generalmente solitarias axilares; Perianto: sépalos 5, uno diferenciado en espolón relleno de néctar; pétalos 5 frecuentemente unguiculados, estambres: 8; Gineceo: ovario súpero, 3 carpelar, 3 locular, con 1 óvulo péndulo por lóculo, estilo apical, estigmas 3; fruto: esquizocarpo formado por tres mericarpos; semillas: sin endosperma, con embrión recto y cotiledones gruesos, carnosos³⁹. El tubérculo de este morfotipo presenta las siguientes características: color predominante de la superficie negro, no presenta color secundario de la superficie tampoco presenta distribución del color secundario de la superficie, forma del tubérculo cilíndrico fusiforme, profundidad de los ojos de los tubérculos ligeramente profundo.³⁸



Figura 1. Tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

3.2. Preparación del medio de cultivo (MS) suplementado con nanopartículas de plata

Se pesó 0,089 g de MS (Murashige y skoog⁴¹); 0,6 g de sacarosa; 0,14 g del gelificante y las cantidades requeridas de nanopartículas de plata, debido a que se trabajó a 3 concentraciones diferentes (20 ppm, 50 ppm y 100 ppm) se pesó 0,0004 g; 0,001 g y 0,002 g respectivamente; el medio MS y la sacarosa se disolvieron en 20 mL de agua destilada utilizando opcionalmente un agitador magneto, se midió el pH y reguló a 5,7 con NaOH y HCl, posteriormente se añadió las cantidades respectivas de NPsAg para cada concentración, una vez realizado este procedimiento se llevaron inmediatamente los vasos precipitados conteniendo la solución (MS, sacarosa y NPsAg) a un baño de ultrasonido (Sonicador BransonTM 2510) a 42 kHz por 30 minutos, una vez retirada la solución del equipo se añade 0,14 g del gelificante (agar agar), se calentó para su homogenización y se vertió en los frascos de vidrio, se dejó enfriar para su solidificación para finalmente cubrirlos con bolsas de polietileno o polipropileno transparentes y debidamente adecuadas para cubrir las parte superior del frasco, de esta manera evitar el ingreso de aire.

3.3. Preparación del medio de cultivo (MS) suplementado con el inhibidor químico de contaminación PTC^{3 TM}

Haciendo el uso de una balanza digital se pesó 0,089 g de MS (Murashige y skoog⁴¹); 0,6 g de sacarosa; 0,14 g de gelificante. En un vaso precipitado se

añadió el medio MS y la sacarosa para su disolución en 20 mL de agua destilada utilizando opcionalmente un agitador magneto, se midió el pH y reguló a 5,7 con NaOH y HCl, una vez realizado este procedimiento se añadió las cantidades requeridas de PTC³™ (0.2 ppm, 2.0 ppm y 3.0 ppm), debido a que se trabajó a estas 3 concentraciones se midió con una micropipeta 0,0002 µL; 0,04 µL y 0,06 µL del PTC³™ respectivamente para cada concentración, posteriormente se llevaron inmediatamente los vasos precipitados conteniendo la solución (MS, sacarosa y PTC³™) al agitador magneto para su disolución, este procedimiento puede realizarse también con una agitación manual del vaso precipitado, una vez retirado la solución del equipo se añade 0,14 g del gelificante (agar agar), se calentó para su homogenización y se vertió en los frascos de vidrio, se dejó enfriar para su solidificación para finalmente cubrirlos con bolsas de polietileno o polipropileno transparentes y debidamente adecuadas para cubrir las parte superior del frasco, de esta manera evitar el ingreso de aire.

3.4. Micropropagación *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.

Se tomaron plántulas de “mashua” con 5 semanas de cultivo que crecieron en medio de cultivo líquido, debido a que estas presentaron mayor tamaño, vigorosidad, de tal forma podemos obtener en lo posible explantes del mismo tamaño y que se encuentren en las mismas condiciones de desarrollo, debido a que se tomó explantes de la parte superior de las plántulas, las cuales constituyeron nuestra fuente de explantes para la micropropagación por lo que se las consideraron aptas una vez que alcanzaron un tamaño aproximado de 15 cm, seguidamente se retiró las plántulas del medio de cultivo líquido y se las colocó sobre placas petri para realizar los cortes con un bisturí estéril, se descartó la parte foliar y raíces, estos explantes fueron obtenidos específicamente de los meristemas axilares, se trató en lo posible que la exposición al medio ambiente de los explantes obtenidos sea menor, seguidamente, se colocó 13 explantes por frasco, se cubrió con bolsas de polietileno o polipropileno transparentes y debidamente adecuadas para cubrir las parte superior del frasco y asegurarlas con film para paletizar, de esta manera evitar el ingreso de aire, se trasladaron a la cámara de crecimiento a una temperatura de incubación de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 horas de fotoperiodo para finalmente realizar las evaluaciones durante las semanas 1, 2, 3 y 4 subsiguientes a la micropropagación *in vitro*.

3.5. 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 de Kruskal Wallis (entre tratamientos) y la prueba Bonferrony (dentro de los tratamientos).

El programa estadístico empleado fue R versión 3.4.3 (2) y IBM SPSS versión 24.⁴²

VI. RESULTADOS

4.1. Efecto antimicrobiano de las NPsAg y del PTC³

Al determinar el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata y PTC³ durante la micropropagación respecto al tiempo, se pudo comprobar que ambos productos inhiben la contaminación para todas las concentraciones sometidas a experimentación en medios de cultivo sólido, debido a que no se manifestó alguna contaminación microbiana. Tanto la dosis aplicada como la forma de utilización resultaron efectivas.

Tabla 1. Seguimiento del efecto antimicrobiano *in vitro* de las nanopartículas de plata en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” durante 4 semanas.

NPsAg	MICROORGANISMO EVALUADO	SEGUIMIENTO DE CONTAMINACION DURANTE 4 SEMANAS			
		1	2	3	4
20 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
100 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 2. Seguimiento del efecto antimicrobiano *in vitro* del PTC³™ en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante 4 semanas.

PTC ³ ™	MICROORGANISMO EVALUADO	SEGUIMIENTO DE CONTAMINACION DURANTE 4 SEMANAS			
		1	2	3	4
0.2 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2.0 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3.0 ppm	Bacterias	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Hongos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

4.2. Evaluación de las características biométricas en plántulas de “mashua”

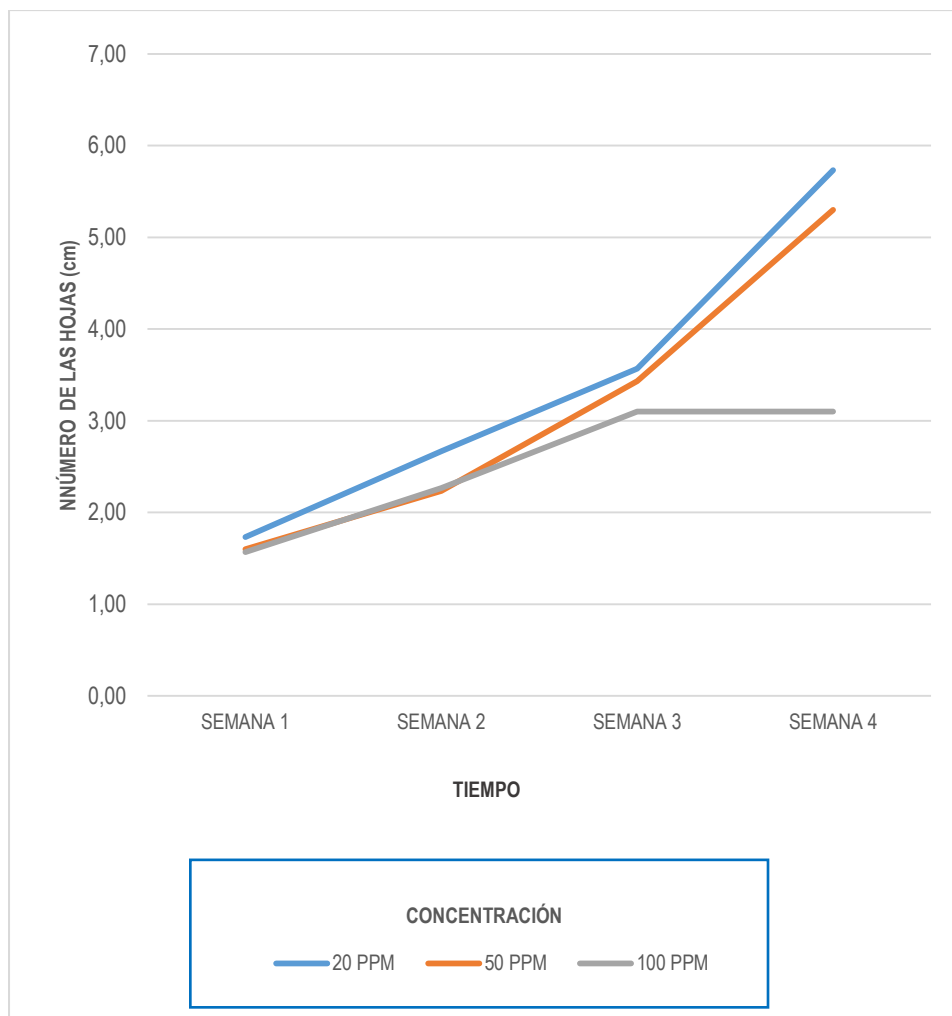


Figura 2. Número de hojas en plántulas de *Tropaolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPSAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

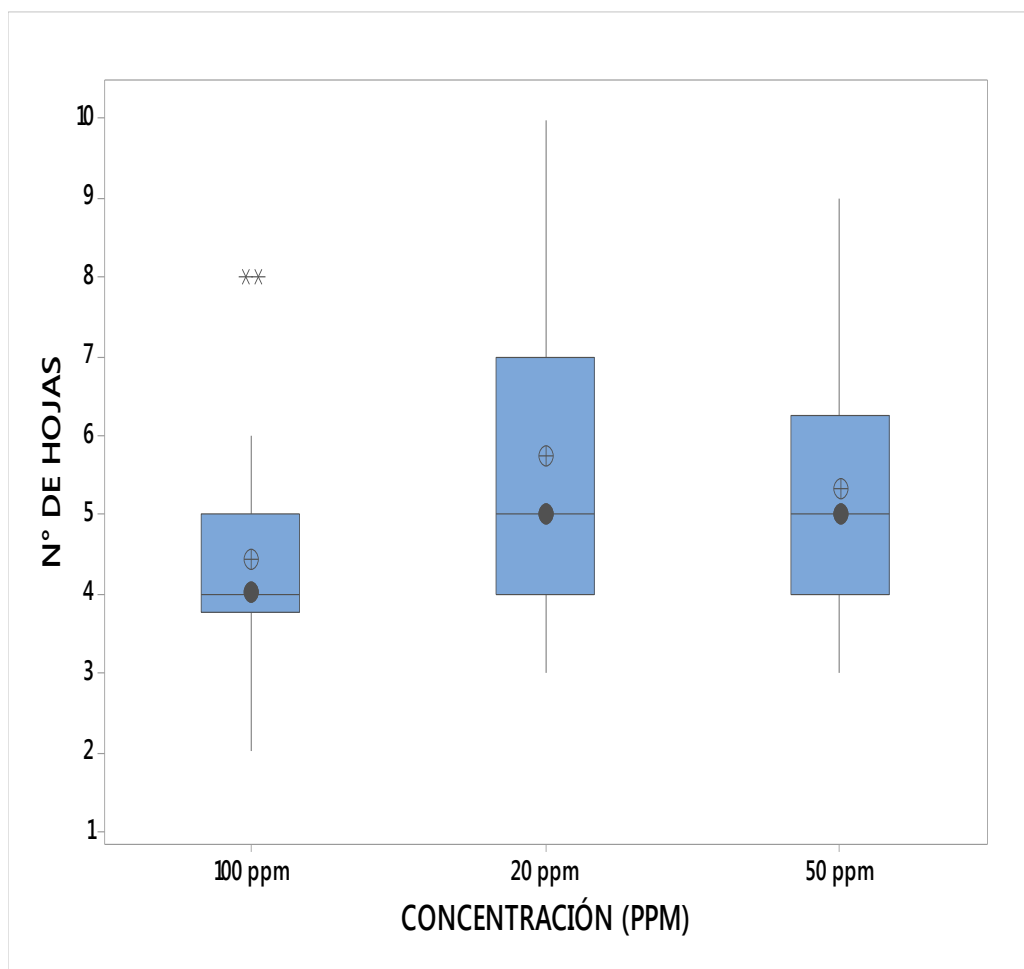


Figura 3. Número de hojas promedio en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0.05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

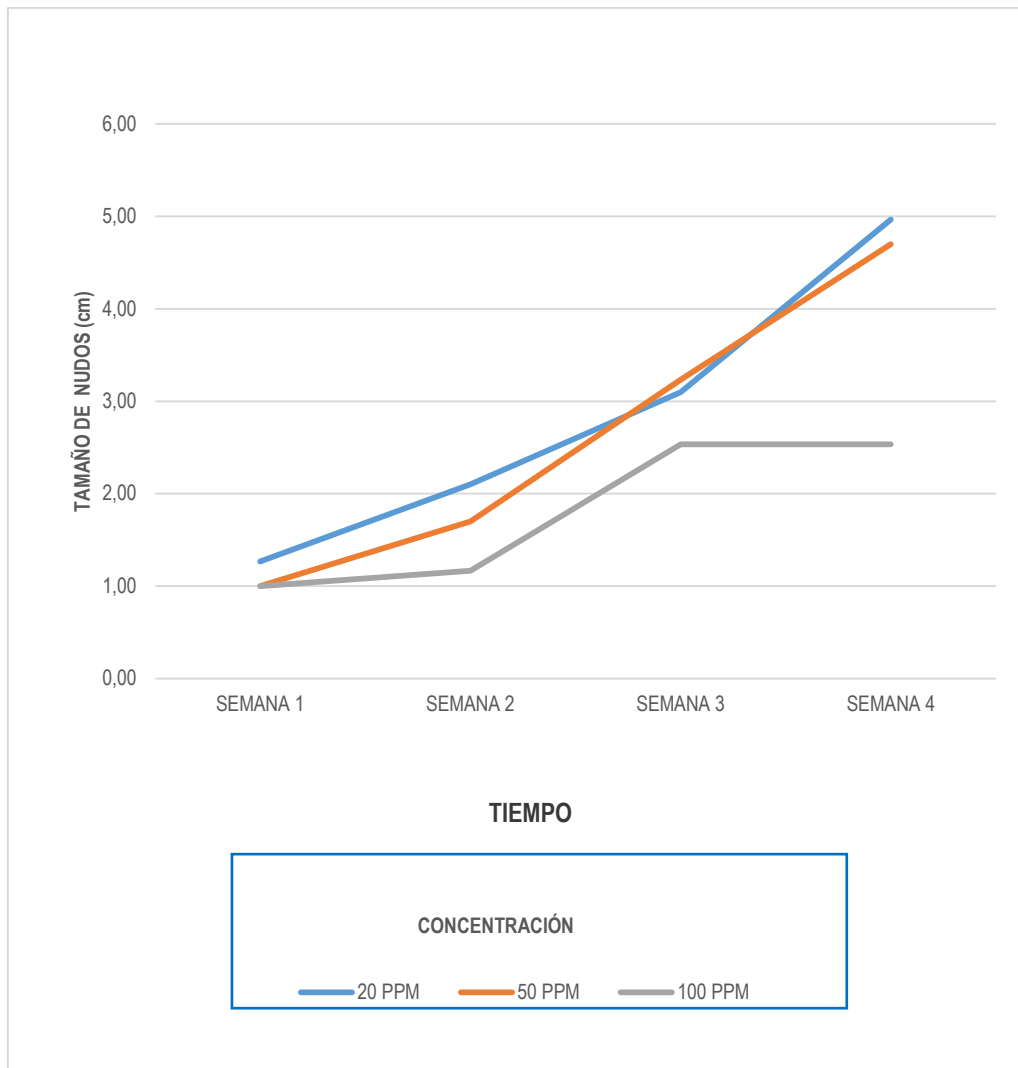


Figura 4. Número de nudos en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

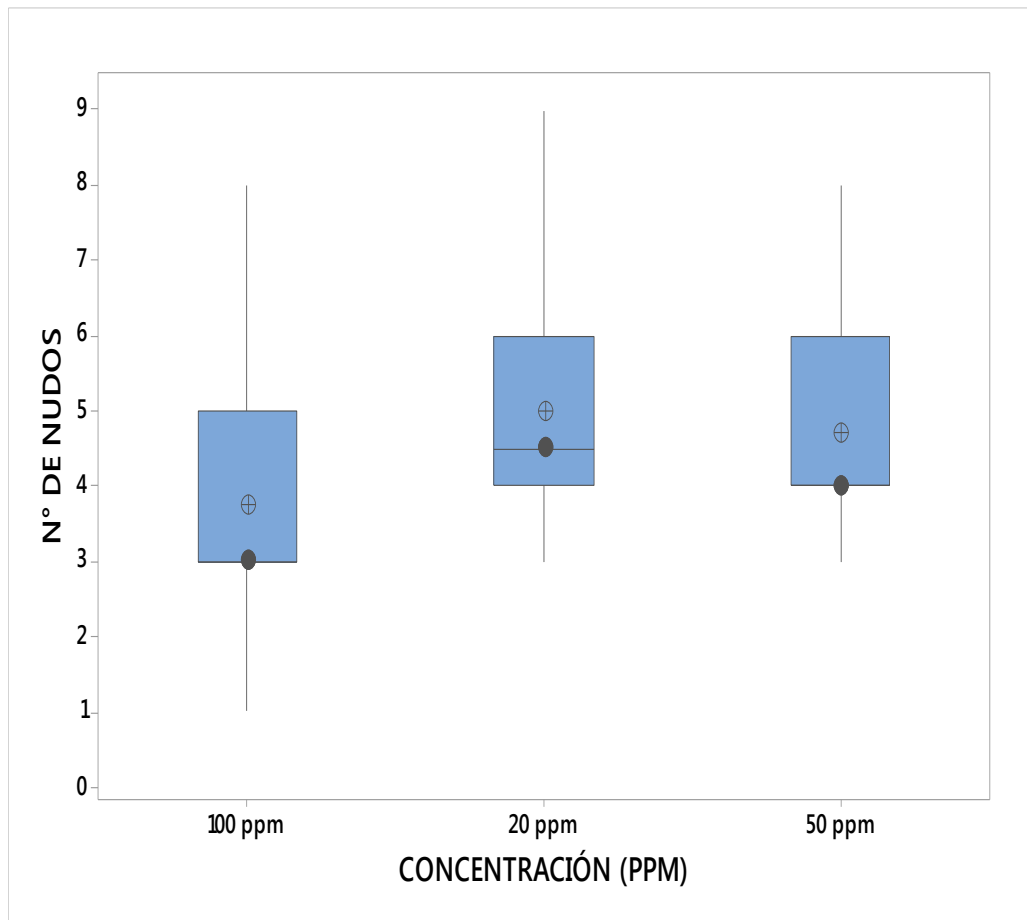


Figura 5. Número promedio de nudos en plántulas de *Tropaecolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

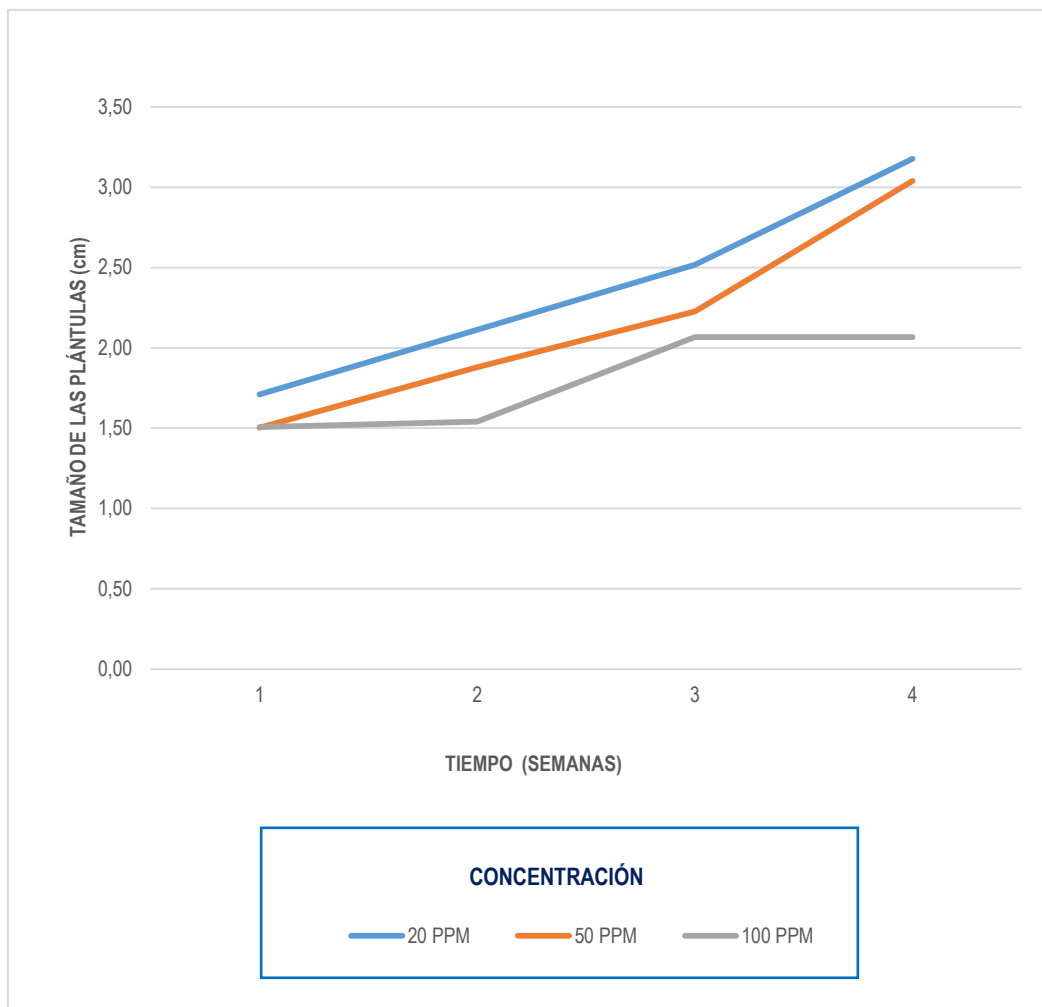


Figura 6. Tamaño de las plántulas en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

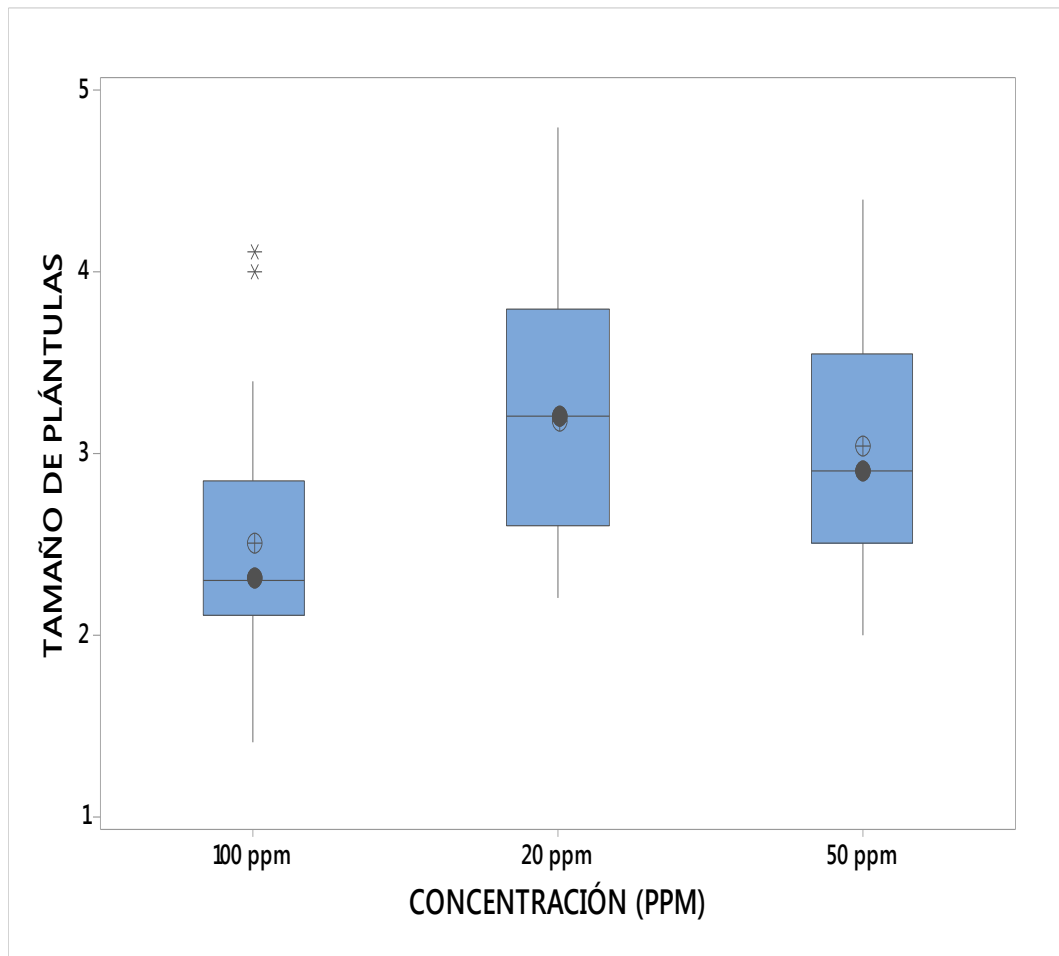


Figura 7. Tamaño promedio de plántulas en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación *in vitro* en MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

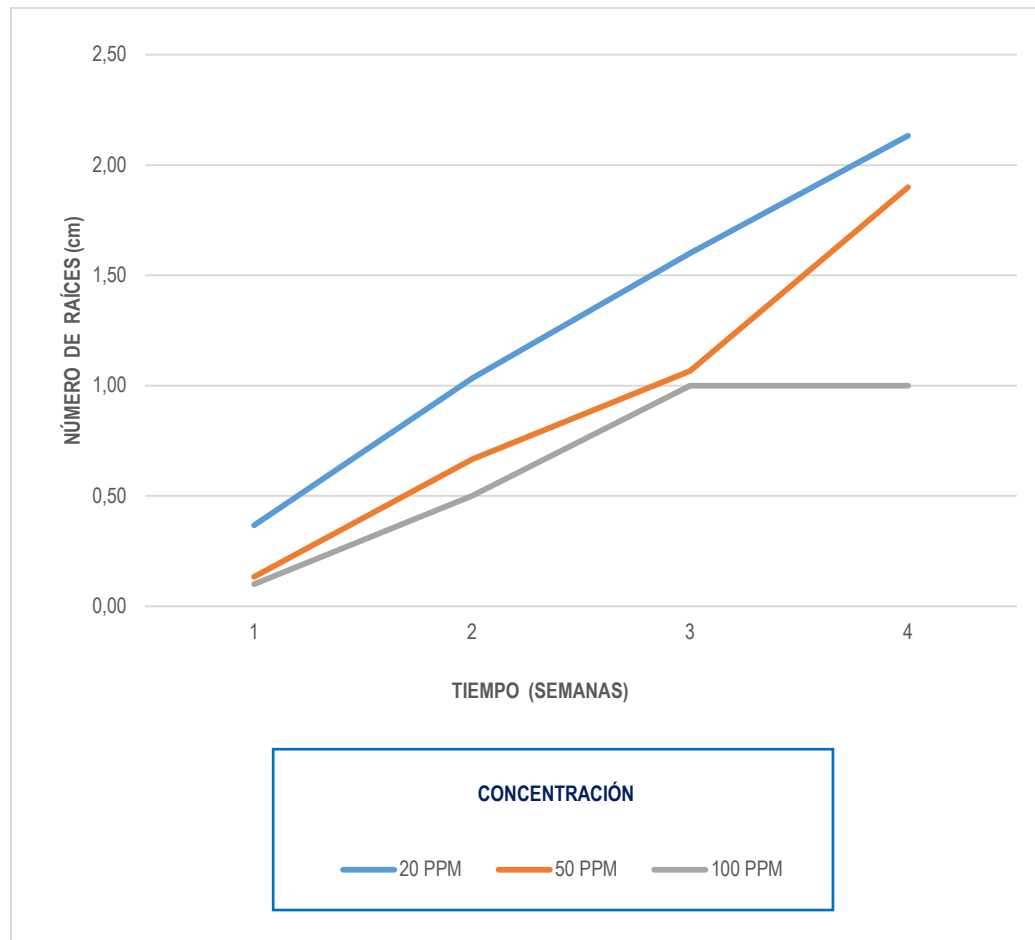


Figura 8. Número de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

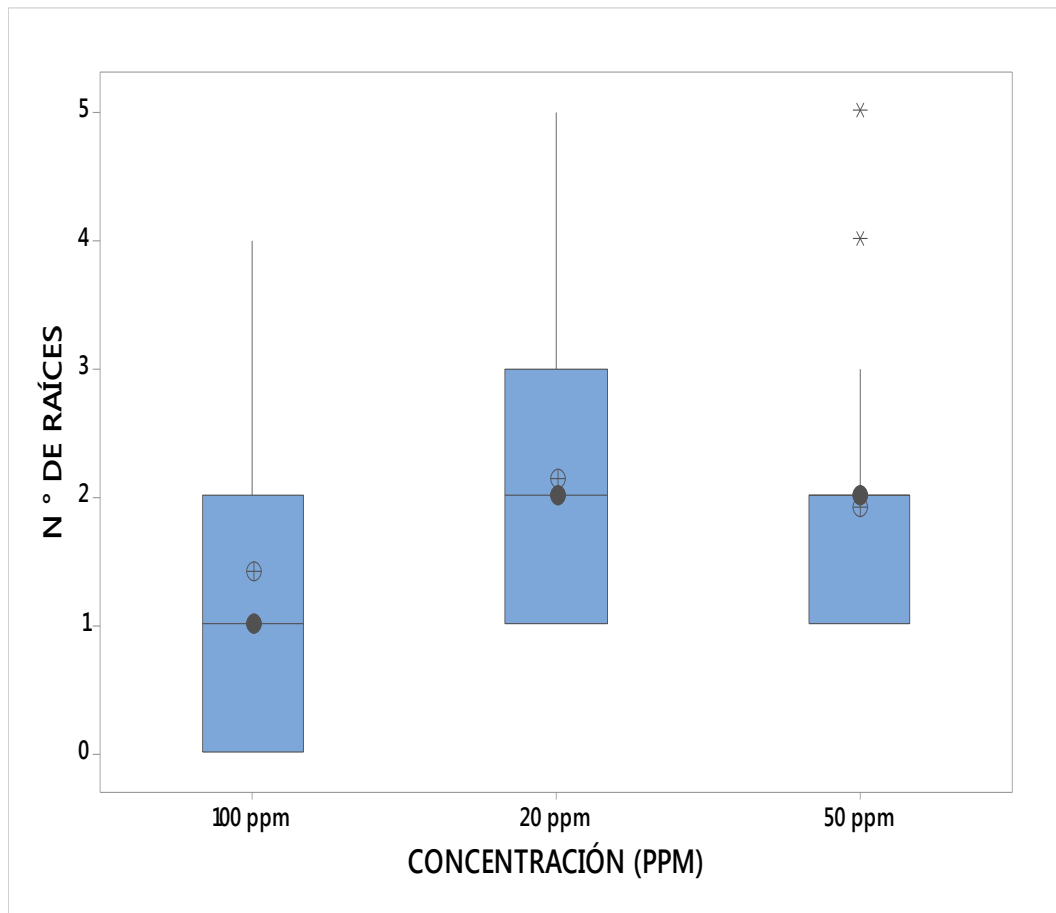


Figura 9. Número promedio de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

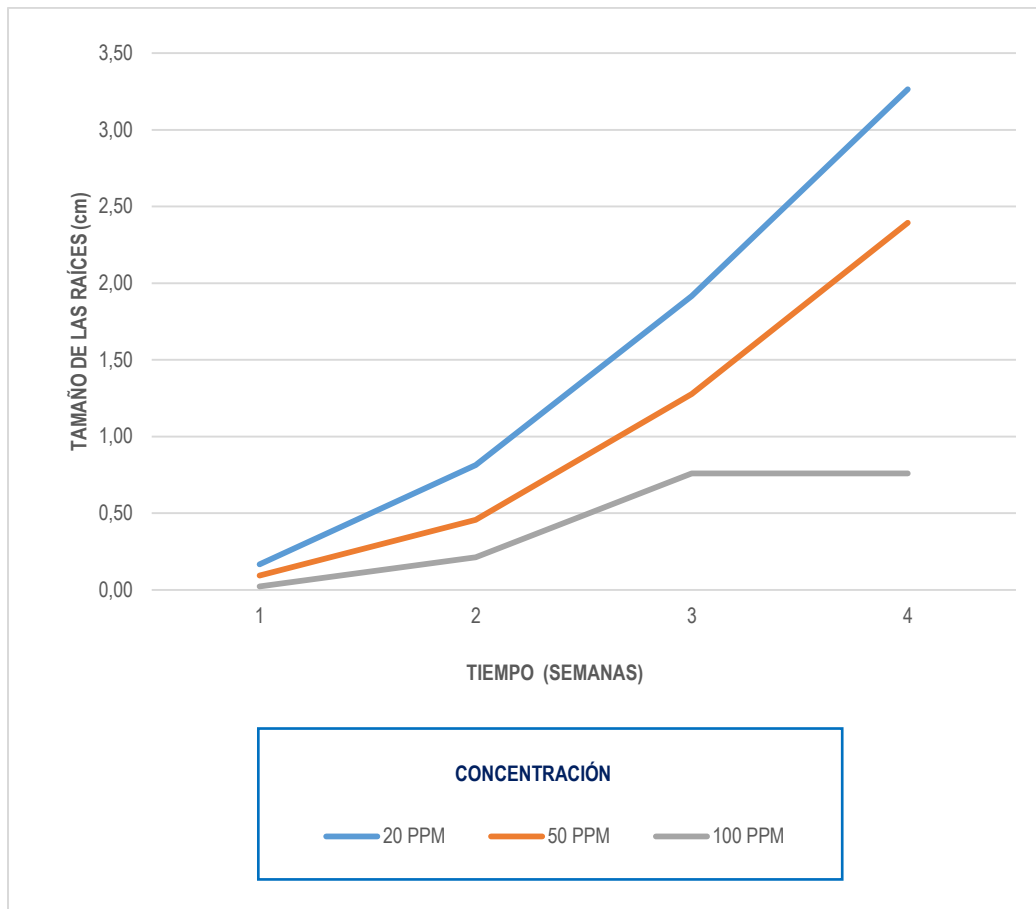


Figura 10. Tamaño de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

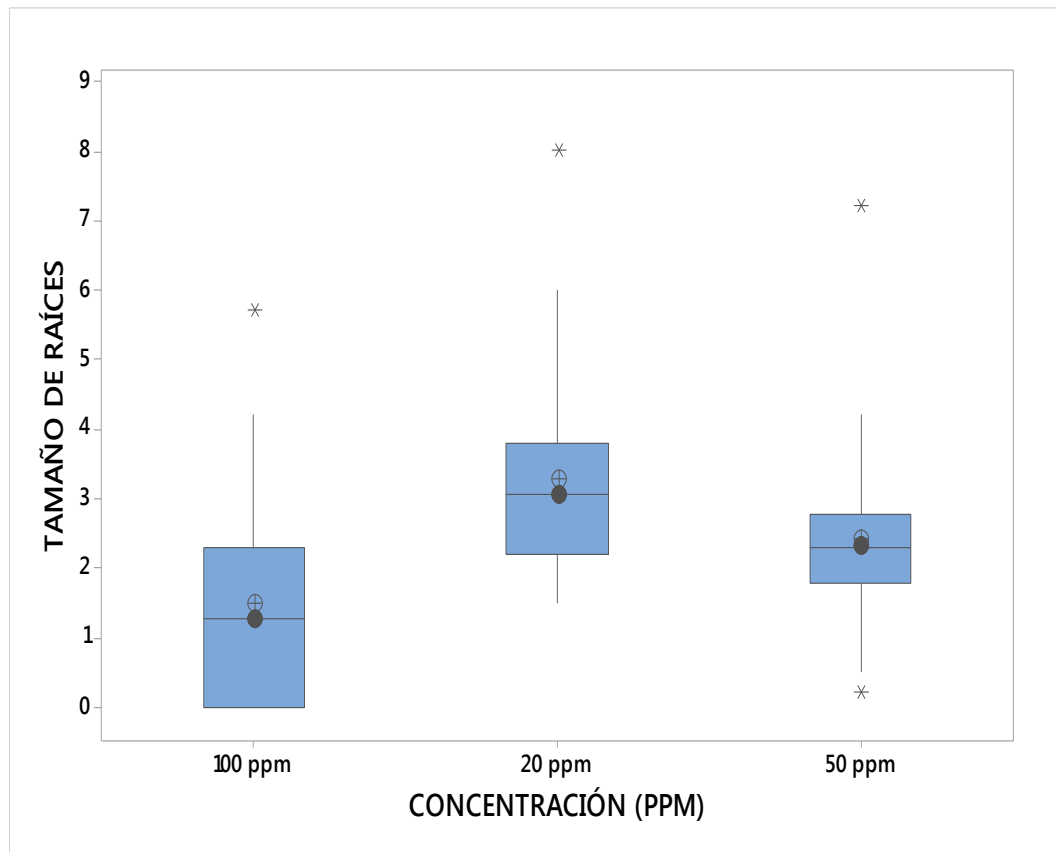


Figura 11. Tamaño promedio de las raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

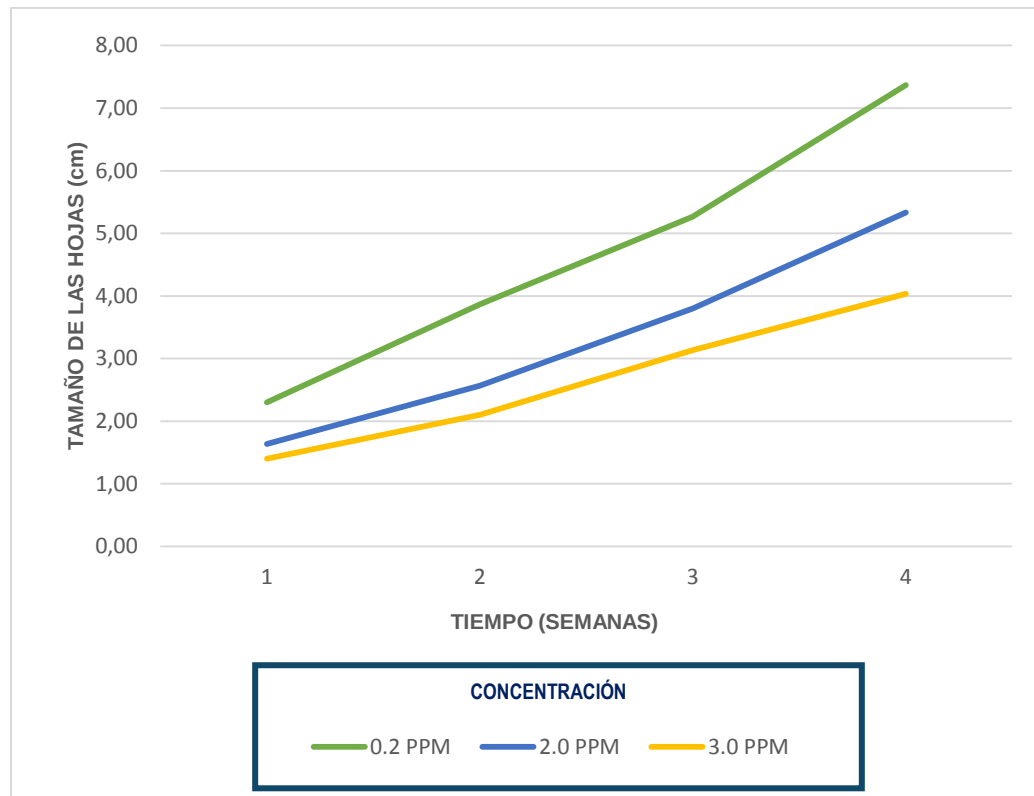


Figura 12. Número de hojas en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

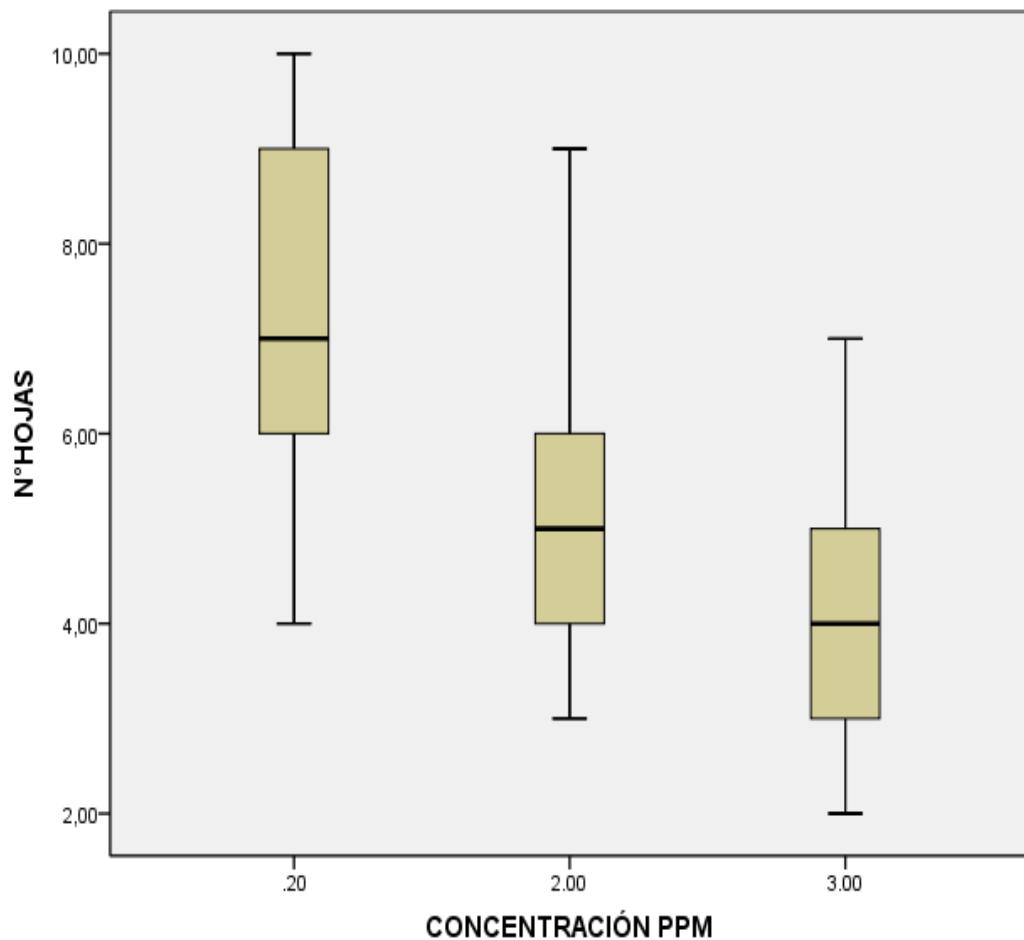


Figura 13. Número promedio de hojas en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

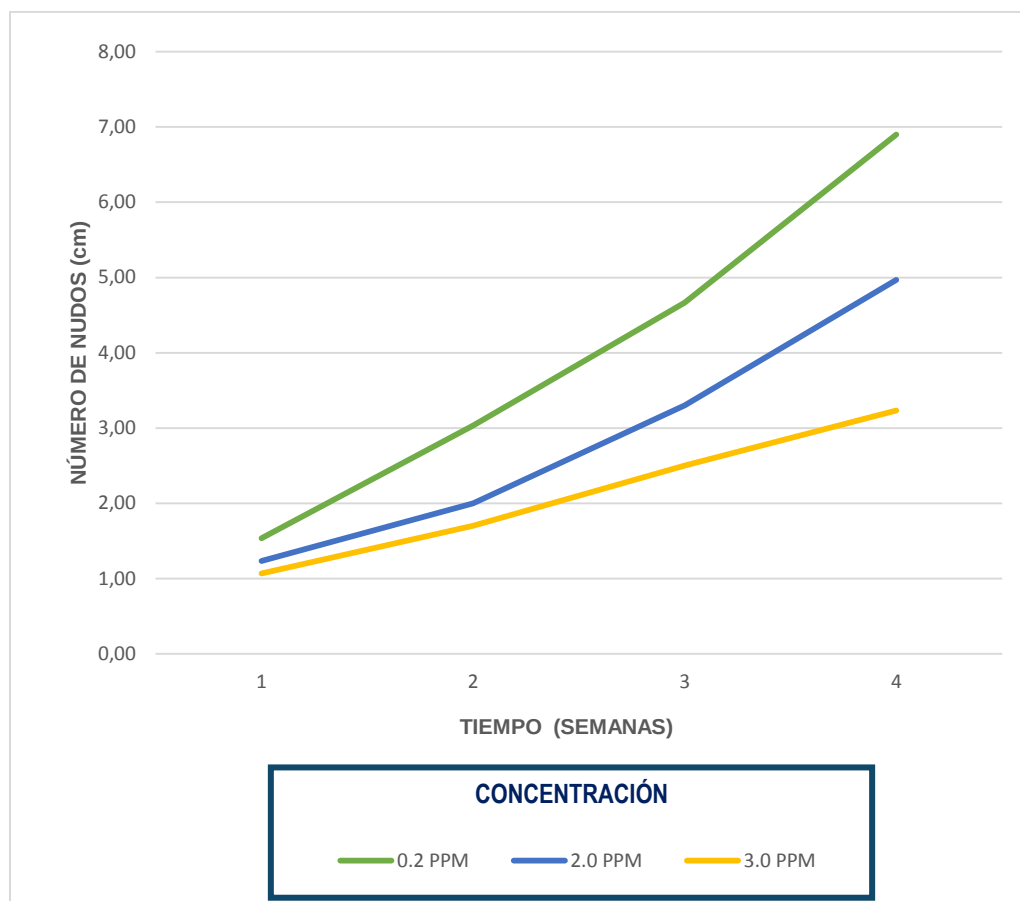


Figura 14. Número de nudos en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

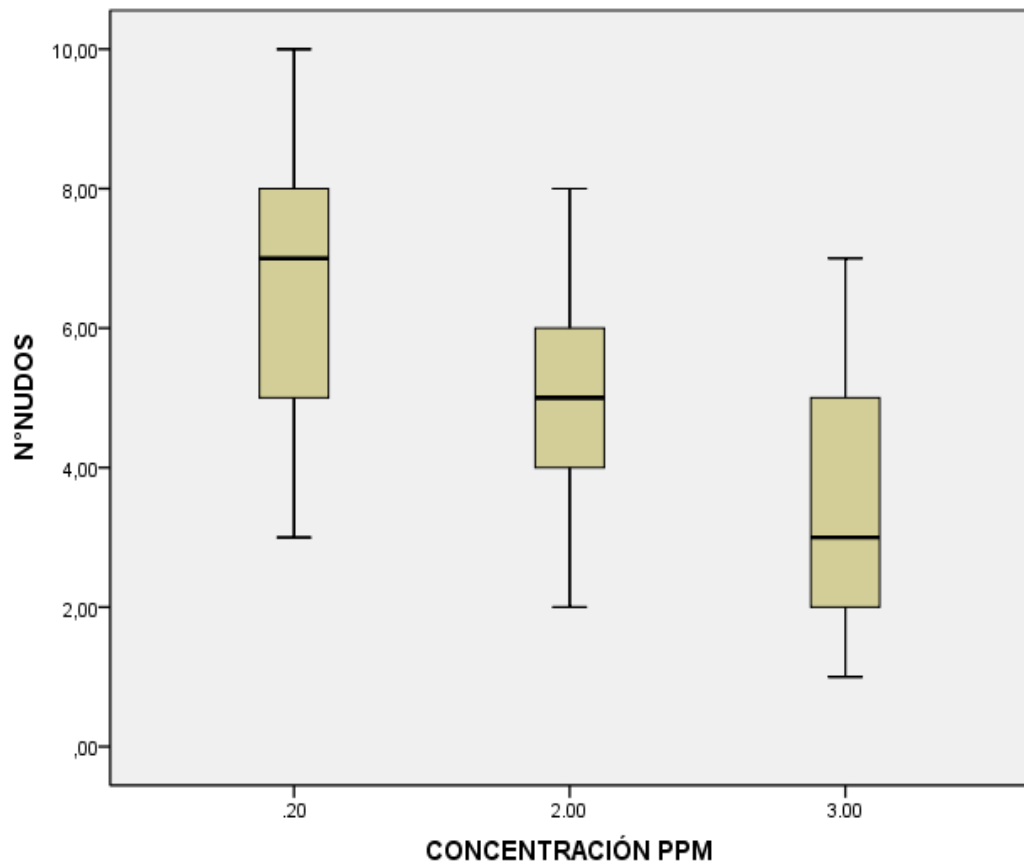


Figura 15. Número promedio de nudos en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 a la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.



Figura 16. Tamaño de las plántulas en *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

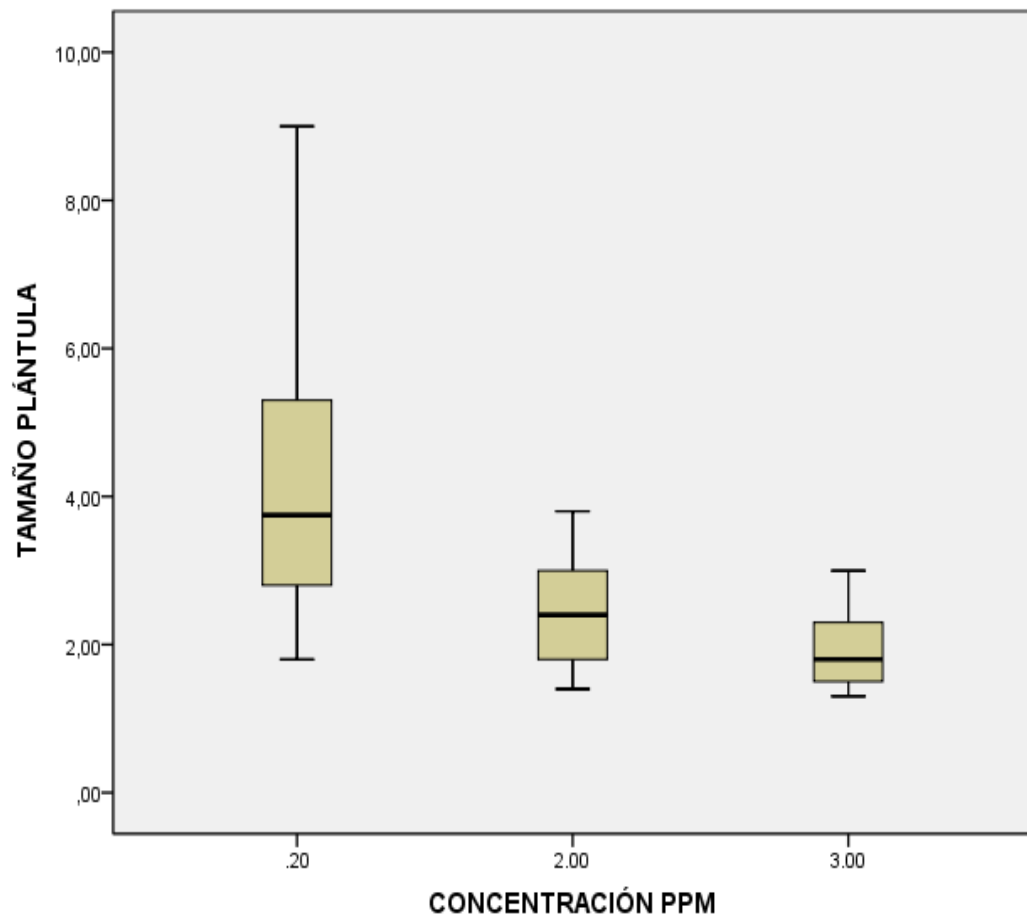


Figura 17. Tamaño promedio de plántulas en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

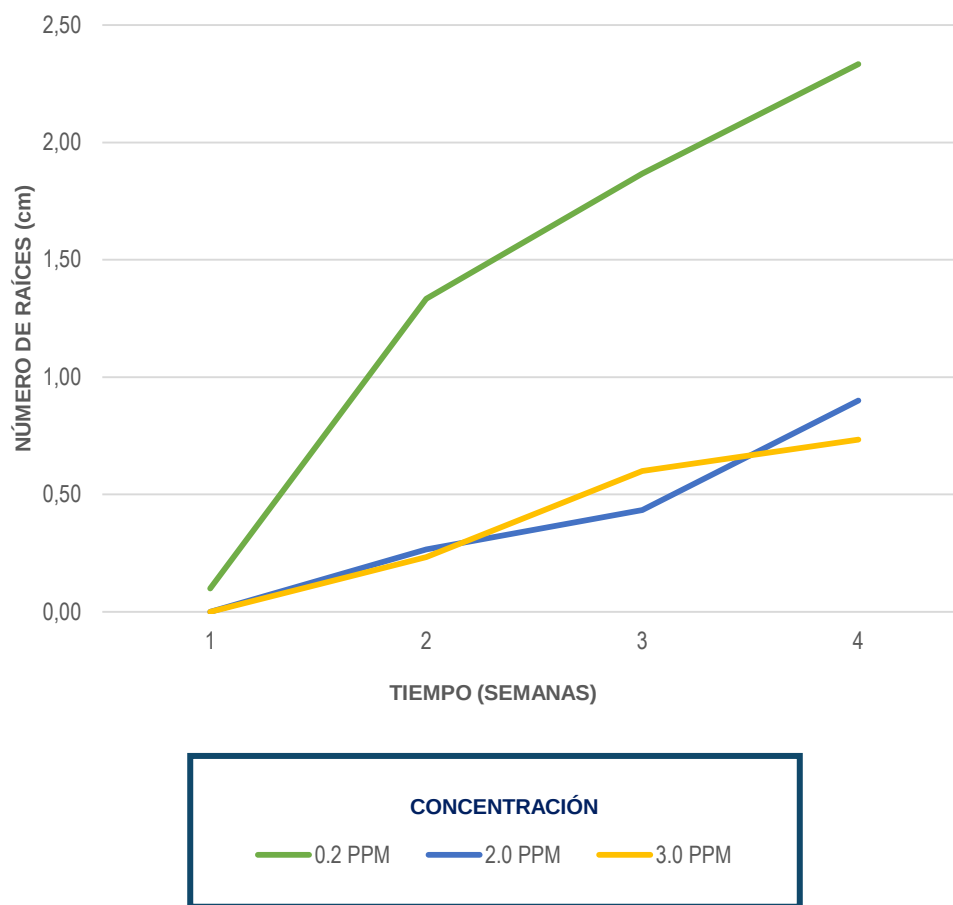


Figura 18. Número de raíces en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

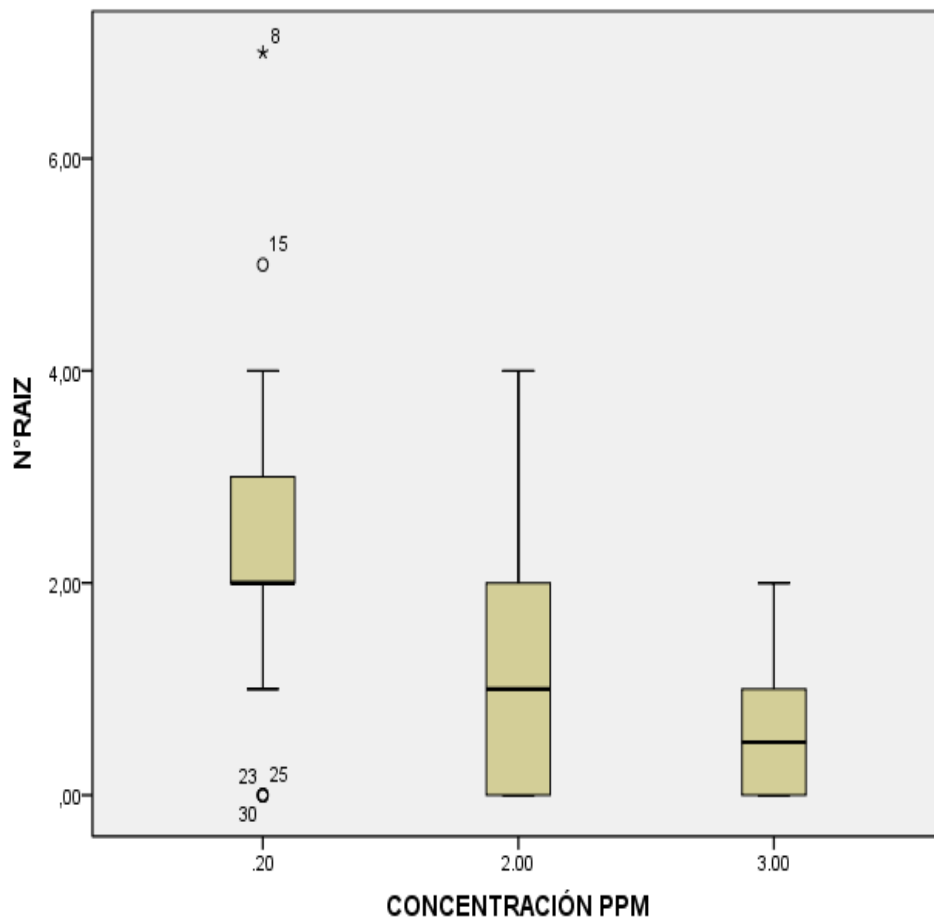


Figura 19. Número promedio de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

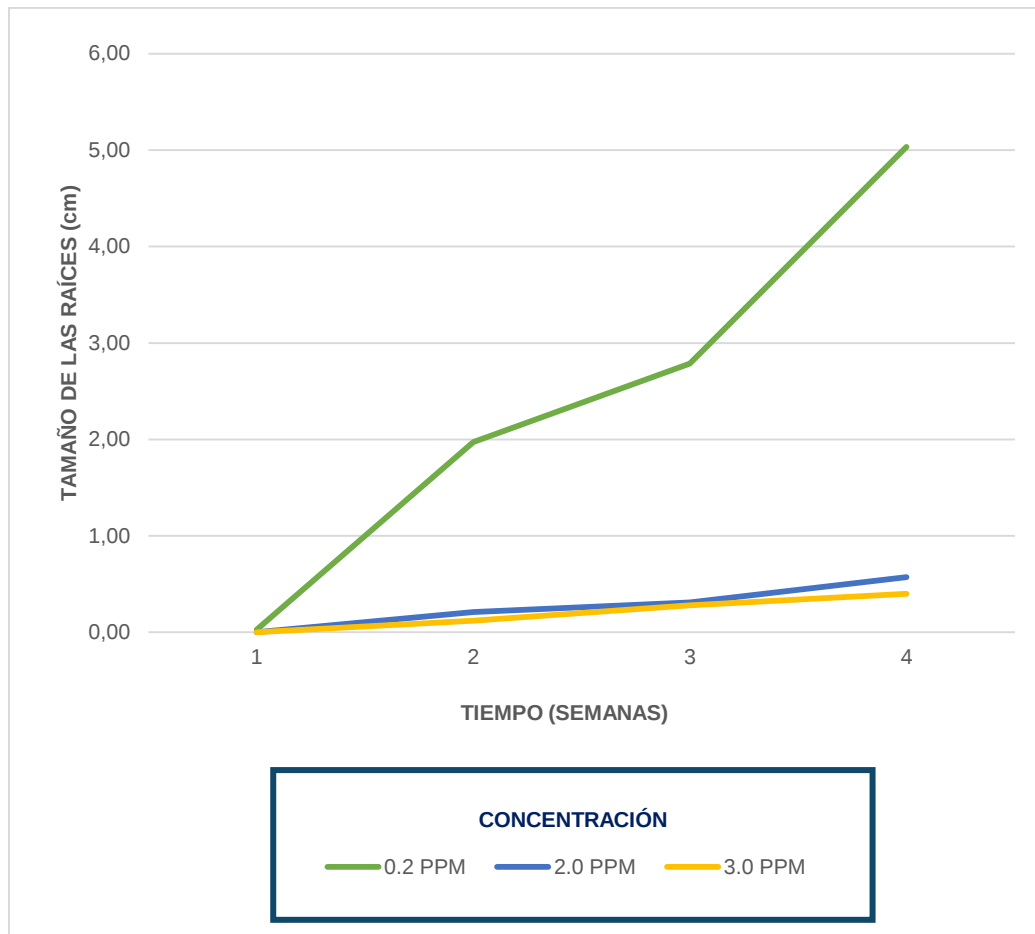


Figura 20. Tamaño de raíces en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” durante la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

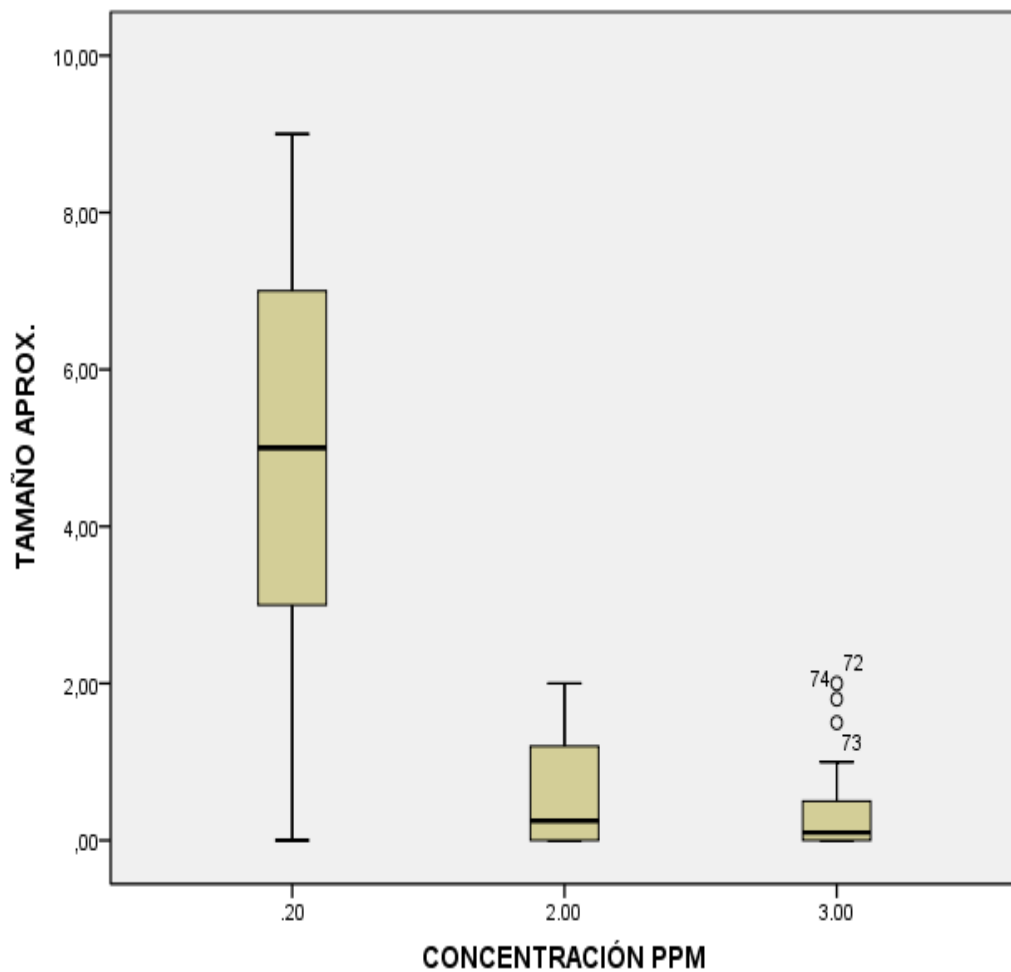


Figura 21. Tamaño promedio de raíces en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación en medio de cultivo MS suplementado con PTC³™. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

5.2. Comparación de los productos sometidos a experimentación (NPsAg y PTC³™).

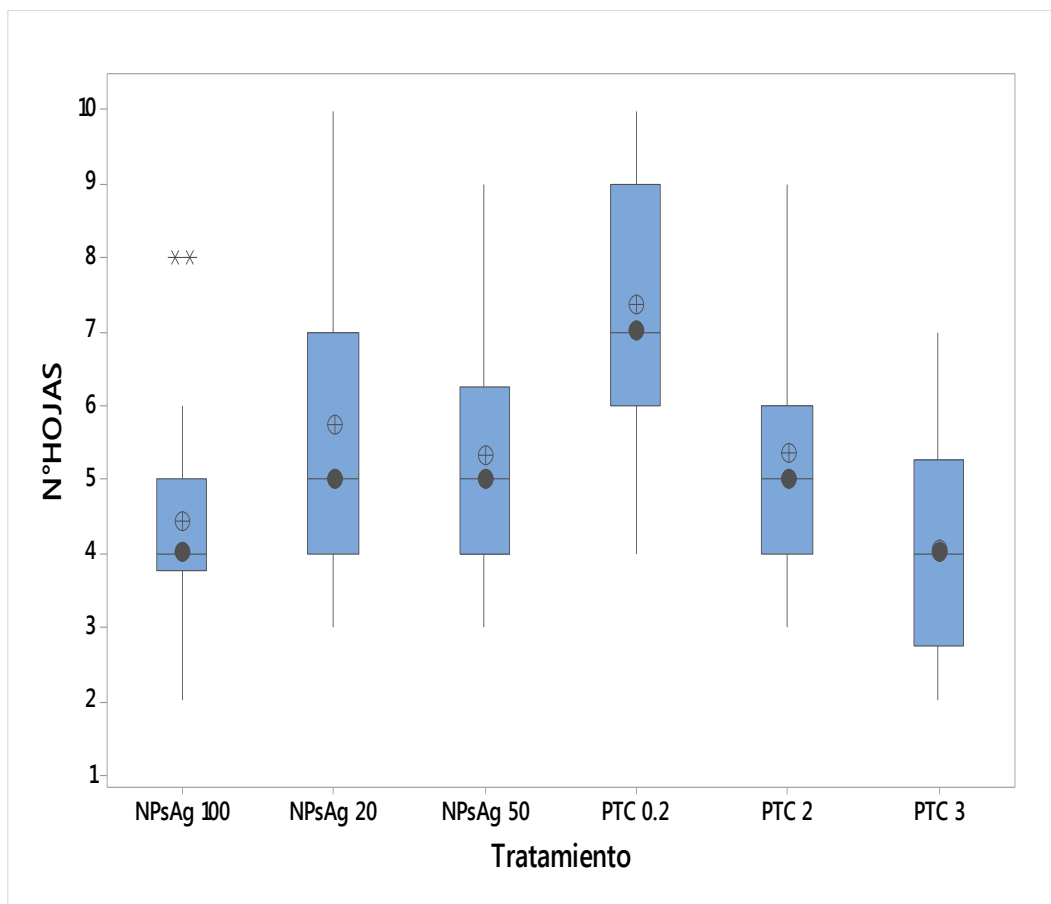


Figura 22. Número promedio de hojas por tratamiento (NPsAg y PTC³™) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

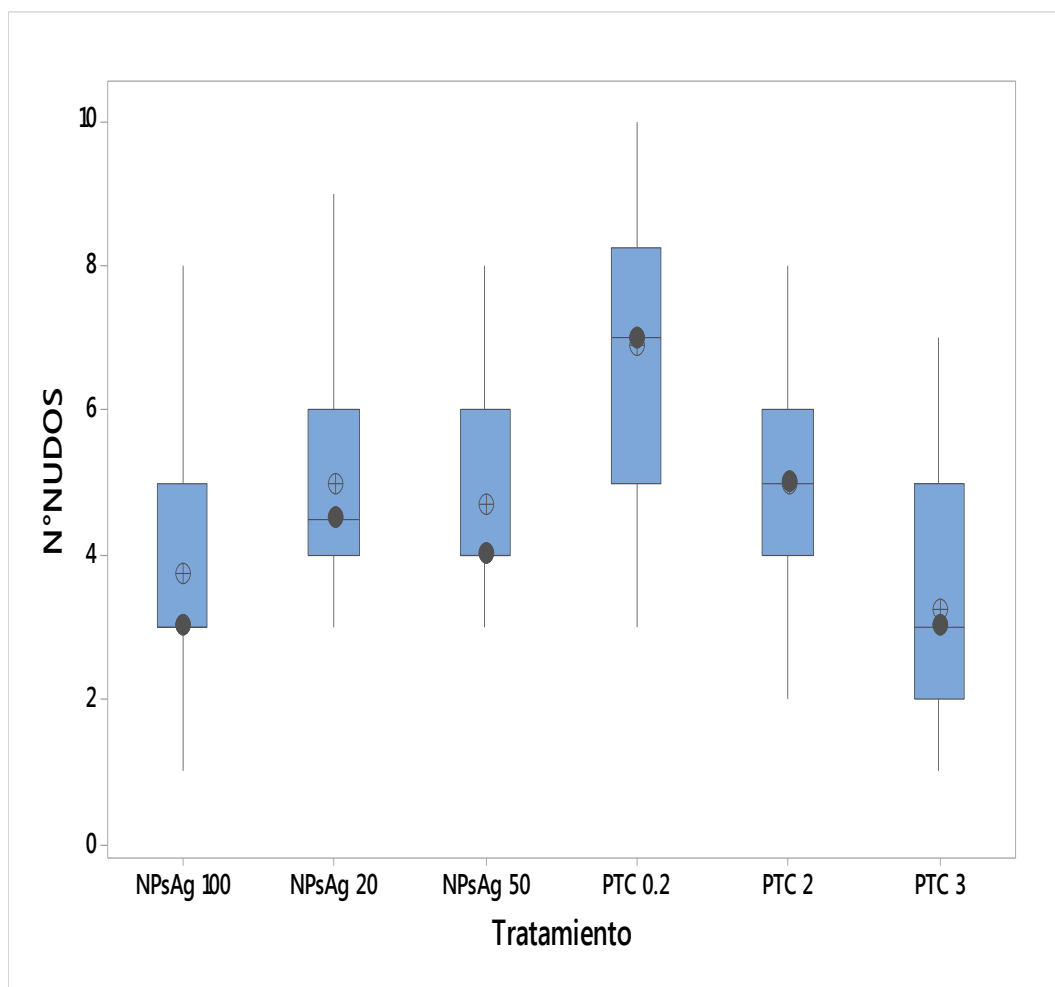


Figura 23. Número promedio de nudos por tratamiento (NPsAg y PTC³™) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semanas 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

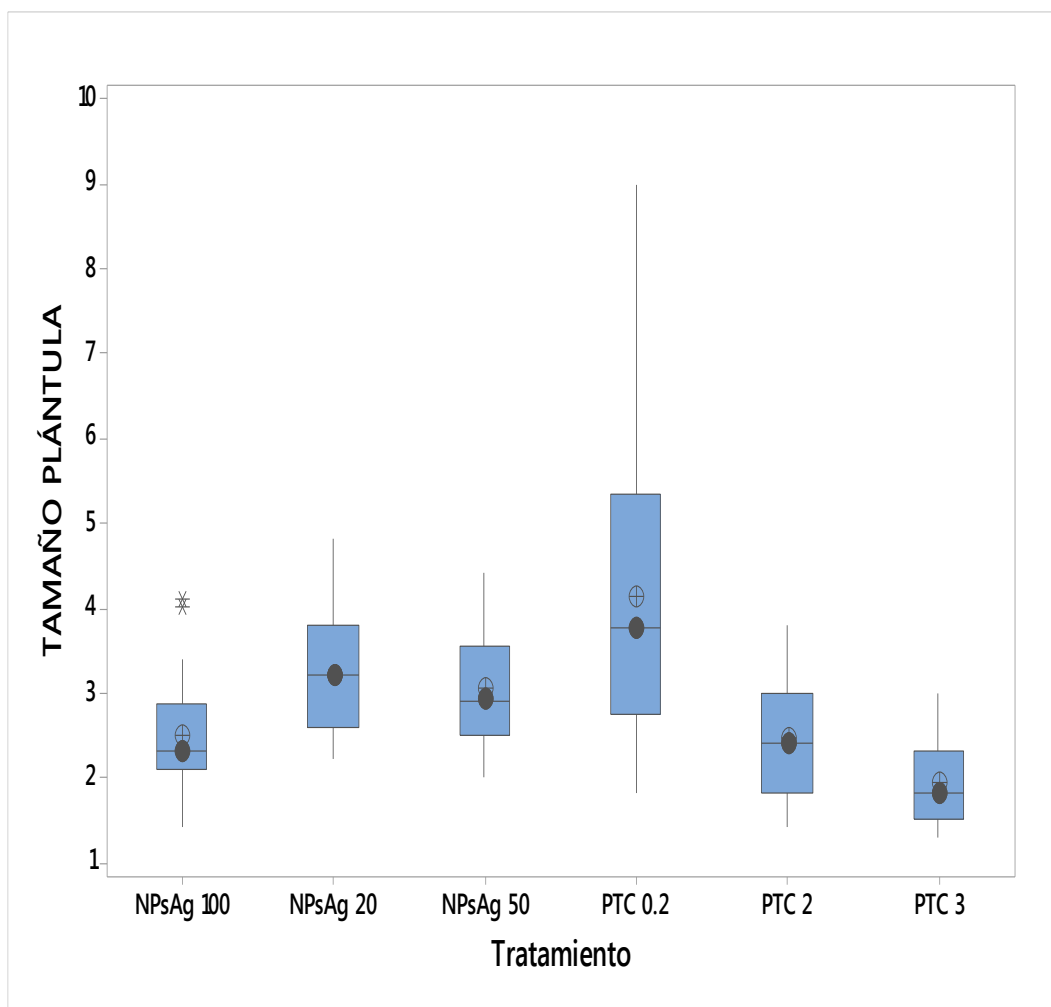


Figura 24. Tamaño promedio de plántulas por tratamiento (NPsAg y PTC³™) en *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

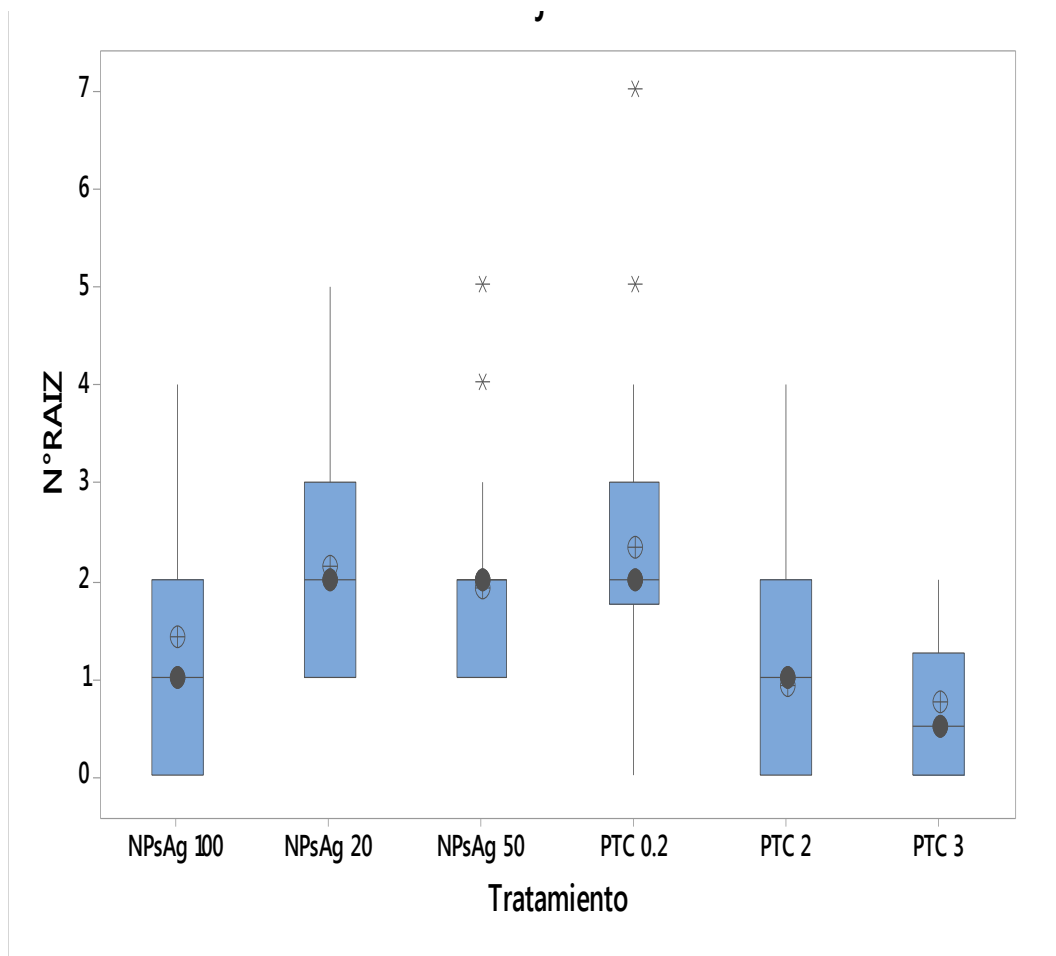


Figura 25. Número promedio de raíces por tratamiento (NPsAg y PTC³™) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

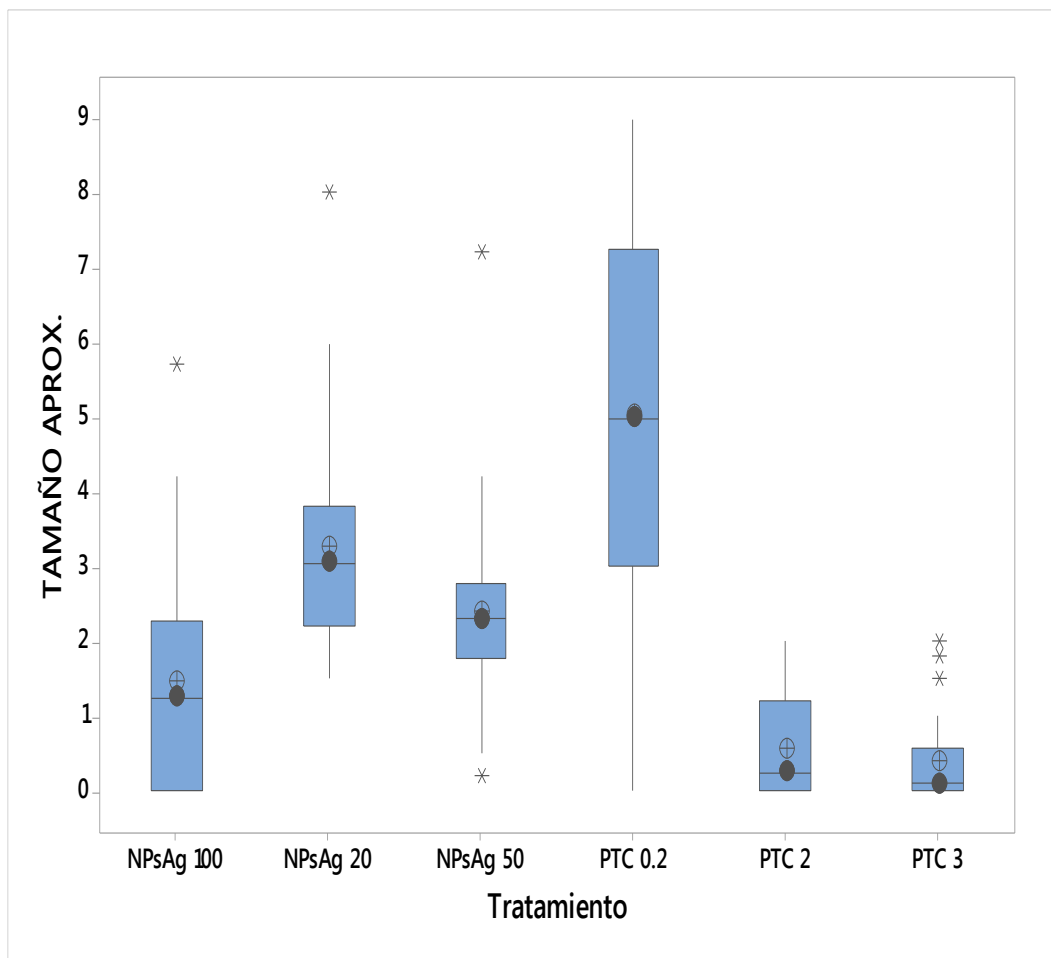


Figura 26. Tamaño promedio de raíces por tratamiento (NPsAg y PTC³™) en plántulas de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” en la semana 4 de la micropropagación. Obtenido con la prueba de Kruskal - Wallis α : 0,05. Laboratorio de Biología Celular y Molecular 2017.

IV. DISCUSIÓN

Efecto antimicrobiano *in vitro* de las NPsAg y PTC³™ en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”

Existen muchas metodologías por las cuales se puede eliminar patógenos de una planta, dentro de las cuales encontramos el uso de productos como las NPsAg y el PTC³, que a pesar de no ser muy utilizados, resultan ser muy efectivos y lo demuestran varios autores^{4,5,6,7,8}, sin embargo no existe un protocolo que especifique la concentración óptima o adecuada para el cultivo de tejidos vegetales de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”, en el cual se debe aplicar esta técnica para ambos productos.

La hipótesis que se maneja acerca del mecanismo de acción de estos productos sobre los microorganismos no han sido completamente dilucidados, aunque se han presentado varios postulados. Entre éstos se pueden mencionar perturbaciones en las funciones de la membrana celular (las cuales alteran la permeabilidad y la respiración celular), el ingreso de estos productos a la célula, lo que genera una alteración en las funciones de las proteínas y el ADN, o la producción de especies oxidativas debido a la presencia de nanopartículas en el interior de la célula en el caso de las NPsAg¹³. No es sencillo realizar un análisis comparativo de los datos de la bibliografía ya que la acción bactericida dependerá de una amplia variedad de factores entre los que se pueden mencionar: el tamaño, forma, composición química, el recubrimiento y su carga superficial potencial y la concentración de los productos antimicrobianos utilizados²⁸.

En la tabla 1 y 2, se muestra el seguimiento de los tratamientos (NPsAg y del PTC³™) durante las semanas 1, 2, 3 y 4 para probar el efecto antimicrobiano de ambos productos, sobre los medios de cultivo y las plántulas desarrolladas, los cuales mostrarán efectividad, con ausencia de microorganismos tanto hongos

como bacterias. Estos medios de cultivo utilizados para el cultivo de tejidos vegetales son muy ricos en carbohidratos, lo que los hace ideales para el desarrollo de cualquier microorganismo³⁹, a pesar de ello no se observó algún tipo de crecimiento microbiano en el medio de cultivo ni en las plántulas en desarrollo. Para ambos casos esta inhibición se podría atribuir a que tanto las NPsAg y el PTC³™ se encuentran distribuidas y dispersos en todo el medio de cultivo lo que hace casi imposible algún desarrollo microbiano, por lo que también protegen a los explantes o plántulas desarrolladas en este medio.

En el caso de las NPsAg las concentraciones que se trabajaron en el presente trabajo se tomaron como referencias trabajos realizados en otras especies vegetales como “oliva” y “estevia”^{3,5}, se tomó como punto de partida la mayor concentración máxima que fue 100 ppm y se fue disminuyendo esta concentración, además en ambos trabajos se utilizó una metodología diferente a la que se realizó en este trabajo, como fue sumergiendo los explantes durante tiempos determinados o usando las NPsAg con otro producto antimicrobiano, obteniendo buenos resultados en cuanto a inhibición del crecimiento microbiano, pero también inhibiendo el crecimiento de las plántulas, para lo cual se determinó que el crecimiento y porcentaje de supervivencia de las plántulas depende de la concentración de NPsAg al igual que estos autores.

Para el caso del PTC³™, los antecedentes muestran trabajos en “papaya” y “black velvet”^{7,8} ambos trabajos no muestran a este producto como el único antimicrobiano utilizado para contrarrestar la contaminación, sino que buscan una acción sinérgica con antibióticos como kanamicina, productos desinfectantes como hipoclorito de sodio o la termoterapia, a pesar de ello no se obtienen buenos resultados en cuanto la inhibición microbiana, en nuestro caso obtuvimos buenos resultados a pesar de aplicar una metodología diferente y únicamente usando este producto.

De esta manera con el presente trabajo estaríamos cumpliendo con uno de los principios básicos para el cultivo de tejidos vegetales los cuales son: la elección del explante; la elección del medio y condiciones de cultivo; y las condiciones asépticas que es lo que nos atañe resaltar donde se menciona que para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier tipo de organismo contaminante, esto resulta particularmente difícil debido a que los medios de cultivo empleados contienen nutrientes óptimos y adecuados para muchos microorganismos

Plántulas desarrolladas en medio de cultivo ms suplementado con NPsAg

En las Figura 2, Figura 4, Figura 6, Figura 8 y Figura 10 se muestran las evaluaciones de las características biométricas, para todos los tratamientos hubo inhibición de la contaminación, la diferencia se evidenció, que el crecimiento o desarrollo es mejor para la concentración de 20 ppm, seguido de 50 ppm y el que muestra un deficiente desarrollo es la concentración 100 ppm. También se muestra las comparaciones realizadas entre los tratamientos 20, 50 y 100 ppm, para lo cual podemos afirmar que entre las concentraciones 20 y 100 ppm existe una diferencia significativa en todas las evaluaciones de las características biométricas de las plántulas, no es el caso para la comparación de las concentraciones 50 ppm y 100 ppm las cuales muestran una clara cercanía en las características biométricas que corresponden al número de hojas y número de nudos, pero esta aproximación no es tan cercana para las características biométricas del tamaño de plántula, número de raíz y tamaño de raíces.

Plántulas desarrolladas en medio de cultivo ms suplementado con PTC³™.

En las Figura 12, Figura 14, Figura 16, Figura 18 y Figura 20 se muestran las evaluaciones de las características biométricas, para todos los tratamientos hubo inhibición de la contaminación en un 100%, la diferencia se evidencia en que el crecimiento o desarrollo es mejor para la concentración de 0.2 ppm, seguido de 2.0 ppm y el que muestra un deficiente desarrollo es la concentración 3.0 ppm. Para el caso de los medios de cultivo de MS con PTC³™, se muestran comparaciones entre las concentraciones 0.2 ppm, 2.0 ppm, 3.0 ppm, donde entre las concentraciones 0.2 ppm y 3.0 ppm se puede observar una clara diferencia entre las características biométricas de número de raíces y tamaño de raíces, por otro lado no existe tanta proximidad de las concentraciones.

Comparación de los tratamientos (NPsAg y PTC³)

En las Figuras 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 26, se muestra las comparaciones del desarrollo de las características biométricas de ambos tratamientos sometidos a experimentación, en donde se muestra que el mejor tratamiento fue el PTC³ con la concentración 0.2 ppm, todas las plántulas que crecieron a con este producto y a esta concentración, mostraron buenas características biométricas. En segundo lugar con un menor desarrollo se encuentran el tratamiento con NPsAg a 20 ppm, 50 ppm y PTC³ a 2.0 ppm, y en el último lugar se muestra al tratamiento con NPsAg a 100 ppm y PTC³ a 3.0

ppm no mostrando un desarrollo óptimo de las plántulas, reducido tamaño, no presentaron raíces y se necrosaron.

Según los resultados obtenidos, se pudo concluir, que tanto las nanopartículas de plata así como el PTC³™, pueden ser empleados eficientemente en la esterilización química de los medios de cultivos sólidos para la micropropagación *in vitro* de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav., debido a que no solo fue capaz de controlar los contaminantes, sino que la aplicación de estos productos trajo consigo una serie de ventajas, como fue la posibilidad de utilizar ambos productos como conservadores de plántulas en medios de cultivo *in vitro*, debido a que se observó que a mayor concentración de ambos productos retarda el crecimiento de las plántulas mas no las mata, estas mismas al ser subcultivadas en un medio de cultivo sin estos productos (NPsAg y PTC³) mostraron un desarrollo normal sin algún retardo en el crecimiento por lo que se evidencia que este retardo no es definitivo. Por otro lado se simplificó el proceso de autoclavado, no se requirió en lo absoluto este equipo, por lo que se ahorró tiempo, debido a que inmediatamente después de la preparación del medio de cultivo suplementado con estos productos se puede iniciar el proceso de la micropropagación, además se pudo realizar en condiciones no estériles.

Adicionalmente las Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 se muestra que a medida que se incrementa la concentración de NPsAg y PTC³ es mayor el retardo del crecimiento normal de las plántulas, ya no existe desarrollo de las raíces por lo que posteriormente el explante muere, entonces se puede afirmar para nuestro experimento que al trabajar con concentraciones superiores a 50 ppm de NPsAg y 0.2 ppm de PTC³, no obtendremos buenos resultados, sin embargo esto no se puede generalizar para otros cultivos sin previos estudios.

La presencia de bacterias endógenas hace que resulte de mayor importancia someter los explantes a un pretratamiento y aplicar antibióticos al medio de cultivo. Un tratamiento con fungicidas y bactericidas previos al cultivo puede ayudar de manera significativa a reducir la contaminación por parte de estos patógenos.²⁴ Sin embargo en el presente trabajo no se evidenció algún tipo de contaminación por microorganismo durante las 4 semanas a la micropropagación por lo que este comportamiento nos permitió afirmar que estos productos tanto las NPsAg como el PTC³ actúan también frente a los microorganismos denominados endógenos, por lo que no quedo algún remanente de contaminación microbiana.

Los antibióticos se usan para reducir, eliminar o controlar los microorganismos que causan contaminación en los explantes *in vitro*. Sin embargo no existe antibiótico que sea capaz de actuar sobre todo tipo de microorganismos, por lo cual es de suma importancia seleccionar con aditivo antimicrobiano que se vaya a aplicar. También se tiene que considerar que el antibiótico a utilizar sea soluble en el medio de cultivo, no se vea afectado por cambios en el pH.²³

El porcentaje de necrosamiento en los tratamientos 100 ppm de NPsAg y 3 ppm de PTC³ fue alta por lo que se podría afirmar que existen diferencias significativas entre tratamientos.

El alto necrosamiento de los explantes puede deberse a las altas concentraciones de ambos productos, una mala introducción dentro del medio de cultivo, oxidación espontanea o heridas previas del explante ²⁴. La viabilidad de los explantes está directamente relacionada con el necrosamiento, ya que la viabilidad se evalúa en los explantes que no se encuentran contaminados. Por lo tanto mientras más bajo sea el porcentaje de necrosamiento, mayor será la viabilidad de los explantes. Todo el trabajo realizado tiene la finalidad de eliminar los microorganismos del explante, sin embargo también tiene que garantizar la viabilidad del tejido y su capacidad de regeneración que por lo general son afectados por factores como la temperatura, la concentración y tiempo de exposición al agente desinfectante. ²⁵

La micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua” evidencia mayores ventajas frente a las técnicas convencionales de propagación debido a que se puede multiplicar plantas libre de contaminantes, como sabemos las enfermedades de las plantas reducen el rendimiento y la calidad de las mismas, llevando en algunos casos a la muerte de la planta. Curar a la planta toma mucho tiempo en muchos casos y es difícil por lo que es preferible tener un cultivo limpio desde el inicio, de esta manera podemos obtener semillas de mashua libres de patógenos para distribuirlos a aquellos productores de este tubérculo. También podemos mencionar que gracias a la micropropagación podremos tener a nuestra disposición durante todo el año grandes cantidades de plántulas de mashua para realizar diferentes experimentos con esta especie.

VI. CONCLUSIONES

1. Las nanopartículas de plata a concentraciones de 20, 50 y 100 ppm y el inhibidor químico de contaminación PTC³™ a concentraciones de 0.2, 2.0 y 3.0 ppm, suplementados en el medio de cultivo (MS), presentaron un potente efecto antimicrobiano en la micropropagación de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav “mashua”.
2. No se observó algún crecimiento microbiano de bacterias y/o hongos en el medio de cultivo (MS) para la micropropagación de la “mashua” durante las cuatro semanas de evaluación subsiguientes a la micropropagación de “mashua”.
3. Las concentraciones de 20 ppm de NPsAg y 0.2 ppm de PTC³™ suplementado en el medio de cultivo MS para la micropropagación de “mashua”, mostraron las mejores características biométricas en el desarrollo de las plántulas.
4. En la micropropagación de la “mashua”, los medios de cultivo MS suplementado con PTC³™, muestran un mejor desarrollo de sus plántulas, respecto a los medios de cultivo MS suplementados con NPsAg.

VII. RECOMENDACIONES

1. La técnica de la micropropagación *in vitro*, es una técnica ya estandarizada en forma general, por lo que se debería hacer algunos ensayos previos para la modificación de algunos puntos en el protocolo existente, debido a que todas las plantas presentan diferentes tipos de microorganismos de acuerdo del lugar de donde provienen.
2. El presente trabajo de investigación permitió determinar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y el PTC³™, la cual existe indudablemente en todas las concentraciones sometidas a experimentación, pero se debe tener en cuenta que a mayor concentración inhibe el buen desarrollo de las plántulas, por lo que se debe experimentar a concentraciones inferiores a 20 ppm y 0.2 ppm de nanopartículas de plata y del PTC³™ respectivamente.
3. Realizar pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad antes de llevar estas plántulas a campo para fines de consumo humano.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Down C, Facchini M, Cavalli F, Ceburnis D, Mircea M, Decesari S, Fuzzi S, Jun Yoon Y y Putaud J. Biogenically driven organic contribution to marine aerosol. *Nature*. 2004; 43: 676-680.
2. Oberdörster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental and Health Perspectives*. 2005; 113: 823-839.
3. Rostami A and Shahsavari A. Nano-Silver particles eliminate *in vitro* contaminations of olive 'mission' explants. *Asian J. Plant Sci*. 2009; 30, 709-714.
4. Paredes D. Estudio del efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis de pregrado]. Santander: Facultad de ciencias de la Universidad Industrial de Santander; 2011.
5. Spinoso J y Bello J. Establecimiento de un protocolo de desinfección para el cultivo *in vitro* de estevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) mediante el uso de nanopartículas de plata (NPsAg). [Tesis magistral]. México: Colegio de postgraduados-Campus Córdoba; 2015.
6. Sanchez J. Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano por cobre nanoestructurado obtenido de minerales de la región Marañón: comparación con cobre comercial. *Rev. peru. biol.* 23(3): 305 – 310.
7. Patel A, Patel C y Patel K. *In vitro* micro propagation of papaya var. Red Lady. *International Journal of Plant Protection*. 2016; 6(2): 449–456.
8. Ureta A. Desarrollo de un protocolo para el establecimiento *in vitro* de la Flor de verano *Delphinium elatum* "black velvet". [Tesis de pregrado]. Colombia: Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias; 2016.
9. Cassells A. Problem in tissue culture: culture contamination. (2nd. ed.). Bélgica: Debergh P. y Zimmerman RH.; 1991. p. 31-45.
10. Fiore S y del Gallo M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. Vol 3. (2nd. ed.). Berlín: Springer-Verlag Heidelberg; 1995.
11. Van Peer R, Punte H, De Wega L and Schippers B. Characterization of root surface and endorhizosphere Pseudomonads in relation to their colonization of root. *Appl. Env. Microbiol.* 1990; 137(1): 81-85.
12. George E. Plant propagation by tissue culture. (2nd ed.). Bélgica: Exegetics Ltd.; 1993: p. 130-143.
13. Leifer C and Cassells A. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell Dev. Biol Plant*. 2001; 37(2): 133-138.
14. Jiménez E. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). [Tesis de Doctorado]. Cuba: UCLV Santa Clara; 1995.
15. Leifert C, Camotta H and Waites W. Effect of antibiotics on micropropagated plants. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 1992; 29 (1): 153-160.
16. Herman E. Toward control of micropropagation contamination. *Agricell Report*. 1987; 9(1): 33-35.
17. Leifert, C y Woodward S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998; 52(1): 83-88.
18. Weller R. Microbial communities on human tissues; an important source of contaminants in plant tissue cultures. Vol 1. (2nd ed.). Berlín: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 245-257.
19. Pye J, Everaert K and Debergh P. Contamination by micro-arthropods in tissue cultures. Vol 1. (2nd. ed.). New York: Plant Tissue Cultures, University College, Cork. 1996.

20. Beattie G and Lindow S. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol.* 1995; 33 (1): 145-172.
21. Chanway C. Bacterial endophytic: Ecological and practical implications. *Sydowia.* 1998; 50(2): 149-170.
22. Parkinson M, Predergast M and Sayegh AJ. Sterilisation of explants and cultures with sodium dichloroisocyanurate. *Plant Growth Regulation.* 1996; 20 (1): 61- 66.
23. Stead D, Hennessy J and Wilson J. Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1998; 52(1): 17- 2.
24. George E. Plant propagation by tissue culture. Vol 5. (2nd.ed.). Washington D.C.: Exegetics Ltd.; 1993.p. 130-143.
25. Cornu D and Michel M. Bacterial contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. choice and phytotoxicity of antibiotics. *Acta Horticulturae.* 1987; 212(1): 413-86.
26. Carrillo R y González C. La nanotecnología en la agricultura y rehabilitación de suelos contaminados. *Mundo Nano.* 2006; 2(2):50-63.
27. Akbarzadeh A, Davod Z, Farhangi, A, Mehrabi M, Norouzian and Tangestaninejad S. *American Journal of Applied Sciences.* 2009; 6 (4): 691-695.
28. Delgado G. Nanotecnología: Avances y retos. *Ciencia y Desarrollo.* 2007; 33(206):19-23.
29. Ponmurugan R, Chistopher T. *Essential Perennials: The Complete Reference to 2700 Perenniales for the Home Garden.* 3ª ed. London: Timber Press; 2014.
30. PhytoTechnology Laboratories. [Internet]. USA: PTC³. 2016 [citado 27 de junio 2016]. Disponible en : <http://phytotechlab.com/index.php/ptc-sup-3-sup.html>
31. González O, Silveira A, Medina R, Machado R, Delgado María S, y Castañedo N. Concentración inhibitoria mínima del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias y levaduras del género *Candida*.. Centro de Bioactivos Químicos. Cuba: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. 2003.
32. Smith J. *Biotechnology.* Vol 4. (2nd.ed.). New York: Cambridge University Press; 2004.p. 271.
33. Russell A y Hugo B. La actividad antimicrobiana y la acción de la plata. *Prog Medicina Chem.*1994; 31(1): 351-370.
34. Raymond Wai, Yin-Sol, Rong Chen, Nancy P, Chung, Chi-Ming Ho y Chi-Ming Che. Nanopartículas de plata fabricados en tampón Hepes muestran actividades citoprotectores hacia el VIH-1 en las células infectadas. 5059 – 5061.
35. Rosmarie A. 1992. Resumen de la toxicidad para la plata. Reserva de Oak Ridge programa de restauración del medio ambiente.
36. Grant W. El estado actual de mayor bioensayo planta para la detección de mutágenos ambientales. *Mutat. Res.*1994; 310(1): 175-185.
37. Fiskesjo G. La prueba de *Allium* como un estándar en el monitoreo ambiental. *Hereditas* 1985; 108: 99-102.
38. Ramos J. Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. [Tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 2014.
39. Felices M, Peña G. Caracterización morfológica de 40 morfotipos de tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* “mashua”. En: Ponencia presentada en el XX Congreso Nacional de Biología. Perú: Universidad Nacional del Altiplano; 2016.

40. Sparre, B and Andersson B. 1991. A taxonomic revision of the Tropaeolaceae. Opera Bot. 108: 1-139.
41. Murashige T And Skoog. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol. Plantarum*. 1962; 15(1):473-497.
42. R version 3.4.3 (2017-11-30) -- "Kite-Eating Tree" Copyright (C) 2017 The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit)

ANEXOS

Anexo 1. Pruebas de normalidad para los tratamientos de MS suplementado con NPsAg.

PRUEBAS DE NORMALIDAD							
CONCENTRACIÓN		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	PPM	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
N° HOJAS	20 ppm	,225	30	,000	,908	30	,013
	50 ppm	,236	30	,000	,895	30	,006
	100 ppm	,205	30	,002	,918	30	,024
N° NUDOS	20 ppm	,219	30	,001	,902	30	,009
	50 ppm	,314	30	,000	,824	30	,000
	100 ppm	,277	30	,000	,837	30	,000
TAMAÑO PLÁNTULA	20 ppm	,125	30	,200*	,947	30	,144
A	50 ppm	,142	30	,129	,950	30	,166
	100 ppm	,180	30	,014	,945	30	,126
N° RAIZ	20 ppm	,283	30	,000	,843	30	,000
	50 ppm	,292	30	,000	,783	30	,000
	100 ppm	,180	30	,014	,886	30	,004
TAMAÑO APROX.	20 ppm	,184	30	,011	,886	30	,004
	50 ppm	,201	30	,003	,868	30	,001
	100 ppm	,159	30	,051	,881	30	,003
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.							
a. Corrección de significación de Lilliefors							

Anexo 2: Prueba de ANOVA para el tamaño de plántulas que crecieron en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	7,845	2	3,922	8,951	,000
Intra- grupos	38,124	87	,438		
Total	45,969	89			

Anexo 3. Comparaciones múltiples entre tratamientos para el tamaño de plántulas que crecieron en medio de cultivo MS suplementado con NPsAg.

TUKEY			
HSD de Tukey ^a			
CONCENTRACIÓN PPM	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
100 ppm	30	2,4933	
50 ppm	30		3,0400
20 ppm	30		3,1767
Sig.		1,000	,704
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.			

Anexo 4. Pruebas no paramétricas de las características biométricas que no poseen normalidad en los tratamientos con NPsAg.

PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
N° HOJAS	20 ppm	30	53,75
	50 ppm	30	48,05
	100 ppm	30	34,70
	Total	90	
N° NUDOS	20 ppm	30	53,38
	50 ppm	30	50,22
	100 ppm	30	32,90
	Total	90	
N° RAIZ	20 ppm	30	52,22
	50 ppm	30	47,23
	100 ppm	30	37,05
	Total	90	
TAMAÑO APROX.	20 ppm	30	61,38
	50 ppm	30	45,58
	100 ppm	30	29,53
	Total	90	

Anexo 5. Estadísticos de contraste^{a,b} de aquellas características biométricas sin normalidad en los tratamientos con NPsAg.

KRUSKAL-WALLIS				
	N° HOJAS	N° NUDOS	N° RAIZ	TAMAÑO APROX.
Chi-cuadrado	8,791	11,298	5,769	22,363
gl	2	2	2	2
Sig. asintót.	,012	,004	,056	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACIÓN PPM

Anexo 6. Prueba de kruskall Wallis del número de hojas del tratamiento con NPsAg.

Rangos			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
N° HOJAS	20 ppm	30	53,75
	50 ppm	30	48,05
	100 ppm	30	34,70
	Total	90	

Anexo 7. Estadísticos de prueba^{a,b} del número de hojas en los tratamientos con NPsAg.

KRUSKAL-WALLIS	
Chi-cuadrado	8,791
gl	2
Sig. asintótica	,012

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:
CONCENTRACIÓN PPM

Anexo 8. Prueba de Bonferroni del número de hojas en los tratamientos con NPsAg.

\$comparison					
	Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
20 - 50	5.70	1.0000		-9.759415	21.15941
20 - 100	19.05	0.0103	*	3.590585	34.50941
50 - 100	13.35	0.1137		-2.109415	28.80941

Anexo 9. Prueba de kruskal Wallis del número de nudos en los tratamientos con NPsAg.

Rangos			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
N° NUDOS	20 ppm	30	53,38
	50 ppm	30	50,22
	100 ppm	30	32,90
	Total	90	

Anexo 10. Estadísticos de prueba^{a,b} para el número de nudos en los tratamientos con NPsAg.

KRUSKAL-WALLIS	
prueba ^{a,b}	
Chi-cuadrado	11,298
gl	2
Sig. asintótica	,004
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación:	
CONCENTRACIÓN PPM	

Anexo 11. Prueba de Bonferroni para el número de nudos en los tratamientos con NPsAg.

\$comparison					
	Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
20 - 50	3.166667	1.0000		-11.969171	18.30250
20 - 100	20.483333	0.0042	**	5.347495	35.61917
50 - 100	17.316667	0.0193	*	2.180829	32.45250

Anexo 12. Prueba de kruskall Wallis del número de raíces en los tratamientos con NPsAg.

Rangos			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
N°	20 ppm	30	52,22
	50 ppm	30	47,23
	100 ppm	30	37,05
	Total	90	

Anexo 13. Estadísticos de prueba^{a,b} para el número de raíz en los tratamientos con NPsAg.

KRUSKAL-WALLIS	
Chi-cuadrado	5,769
gl	2
Sig. asintótica	,056
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación:	
CONCENTRACIÓN PPM	

Anexo 14. Prueba de Bonferroni para el número de raíz en los tratamientos con NPsAg.

\$comparison					
	Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
20 - 50	4.983333	1.0000		-10.3869930	20.35366
20 - 100	15.166667	0.0543	.	-0.2036597	30.53699
50 - 100	10.183333	0.3283		-5.1869930	25.55366

Anexo 15. Prueba de kruskall Wallis el tamaño de raíces en los tratamientos con NPsAg.

Rangos			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
TAMAÑO APROX.	20 ppm	30	61,38
	50 ppm	30	45,58
	100 ppm	30	29,53
	Total	90	

Anexo 16. Estadísticos de prueba^{a,b} del tamaño aproximado de las raíces en los tratamientos con NPsAg.

KRUSKAL WALLIS	
Chi-cuadrado	22,363
gl	2
Sig. asintótica	,000
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación:	
CONCENTRACIÓN PPM	

Anexo 17. Prueba de Bonferroni del tamaño aproximado de las raíces en los tratamientos con NPsAg.

\$comparison				
Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
20 - 50	15.80 0.0264	*	1.410806	30.18919
20 - 100	31.85 0.0000	***	17.460806	46.23919
50 - 100	16.05 0.0235	*	1.660806	30.43919

Anexo 18. Pruebas de normalidad realizadas a los datos obtenidos en los tratamientos con PTC³.

Pruebas de normalidad							
	CONCENTRACIÓN PPM	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NºHOJAS	,20	,143	30	,122	,932	30	,056
	2,00	,159	30	,050	,942	30	,103
	3,00	,176	30	,019	,897	30	,007
NºNUDOS	,20	,156	30	,061	,944	30	,120
	2,00	,157	30	,056	,951	30	,181
	3,00	,167	30	,033	,928	30	,044
TAMAÑO PLÁNTULA	,20	,121	30	,200*	,938	30	,082
	2,00	,144	30	,114	,950	30	,165
	3,00	,170	30	,027	,929	30	,046
NºRAIZ	,20	,197	30	,004	,902	30	,010
	2,00	,251	30	,000	,801	30	,000
	3,00	,312	30	,000	,753	30	,000
TAMAÑO APROX.	,20	,195	30	,005	,903	30	,010
	2,00	,241	30	,000	,814	30	,000
	3,00	,263	30	,000	,746	30	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

Anexo 19. ANOVA de un factor para el número de hojas en los tratamientos con PTC³.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	169,356	2	84,678	31,672	,000
Intra- grupos	232,600	87	2,674		
Total	401,956	89			

Anexo 20. Comparaciones múltiples para el número de hojas en los tratamientos con PTC³.

N°HOJAS				
HSD de Tukey^a				
CONCENTRACIÓN PPM	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3,00	30	4,0333		
2,00	30		5,3333	
,20	30			7,3667
Sig.		1,000	1,000	1,000
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.				

Anexo 21. ANOVA de un factor para el número de hojas en los tratamientos con PTC³.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	201,867	2	100,933	35,837	,000
Intra- grupos	245,033	87	2,816		
Total	446,900	89			

Anexo 22. Comparaciones múltiples entre tratamientos para el número de hojas en los tratamientos con PTC³.

NºNUDOS				
HSD de Tukey ^a				
CONCENTRACIÓN PPM	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
3,00	30	3,2333		
2,00	30		4,9667	
,20	30			6,9000
Sig.		1,000	1,000	1,000
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.				

Anexo 23. ANOVA de un factor para el tamaño de plántula en los tratamientos con PTC³.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	80,761	2	40,380	32,291	,000
Intra- grupos	108,795	87	1,251		
Total	189,556	89			

Anexo 24. Comparaciones múltiples entre tratamientos para el tamaño de plántulas en los tratamientos con PTC³.

TAMAÑO PLÁNTULA			
HSD de Tukey ^a			
CONCENTRACIÓN PPM	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3,00	30	1,9067	
2,00	30	2,4433	
,20	30		4,1300
Sig.		,157	1,000
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.			

Anexo 25. Prueba de Kruskal Wallis del número de raíces en los tratamientos con PTC³.

Rangos			
	CONCENTRACIÓN PPM	N	Rango promedio
NºRAIZ	0.2 ppm	29	63,16
	2.00 ppm	30	37,82
	3.00 ppm	30	34,63
	Total	89	

Anexo 26. Estadísticos de contraste^{a,b} del número de raíces en los tratamientos con PTC³.

Nº RAIZ	
Chi-cuadrado	23,288
gl	2
Sig. asintót.	,000
a. Prueba de Kruskal-Wallis	
b. Variable de agrupación:	
CONCENTRACIÓN PPM	

Anexo 27. Prueba de Bonferroni del número de raíces en los tratamientos con PTC³.

\$comparison					
	Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
0.2 - 2	20.69425	3e-04	***	8.305454	33.08305
0.2 - 3	41.09425	0e+00	***	28.705454	53.48305
2 - 3	20.40000	3e-04	***	8.116640	32.68336

Anexo 28. Prueba de Kruskal Wallis para el tamaño de raíces en los tratamientos con PTC³.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter- grupos	414,180	2	207,090	76,191	,000
Intra- grupos	236,470	87	2,718		
Total	650,650	89			

Anexo 29. Estadísticos de contraste^{a,b} del tamaño de raíces en los tratamientos con PTC³.

TAMAÑO APROX.			
HSD de Tukey ^a			
CONCENTRACIÓN PPM	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3,00	30	,4000	
2,00	30	,5700	
,20	30		5,0333
Sig.		,916	1,000
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 30.000.			

Anexo 30. Prueba de Bonferroni del número de raíces en los tratamientos con PTC³.

\$comparison					
	Difference	pvalue	sig.	LCL	UCL
0.2 - 2	32.952874	0	***	20.73865	45.16709
0.2 - 3	37.019540	0	***	24.80532	49.23376
2 - 3	4.066667	1		-8.04360	16.17693

Anexo 31. Sonicador utilizado para para disolver las Nanopartículas de plata en el medio de cultivo MS.



Anexo 32: Composición y preparación del Medio Murashige Y Skoog.

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO MURASHIGE Y SKOOG Constituyente	Concentración de la Solución madre (g/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	16,5
KNO ₃	19
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7
KH ₂ PO ₄	1,7
Micronutrientes	
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
H ₃ BO ₃	0,62
KI	0,083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	
10 ml de solución 25 mg/100 ml	
CoCl ₂ .6H ₂ O	
10 ml de solución 25 mg/100 ml	
Fuente de hierro	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,00556
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,00746
Vitaminas	
Inosol	10
Nicotínico	0,05
HCl-Piridoxina	0,05
Glicina	0,2
HCl-Tiamina	0,01

Agregar 3% de sacarosa y 0.7% de agar agar.

Anexo 33: Planta de *Tropaeolum tuberosum* “mashua”.



Anexo 34: Plántulas de *Tropaeolum tuberosum* “mashua” *in vitro* en medio de cultivo MS suplementado con nanopartículas de plata a 20 ppm.



Anexos 35. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de nanopartículas de plata e inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” – Ayacucho 2016.	¿Cuál será el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de nanopartículas de plata e inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua”?	Objetivo general: Determinar el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de nanopartículas de plata e inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” – Ayacucho 2016. Objetivos específicos - Determinar la concentración optima de nanopartículas de plata en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” - Determinar la concentración optima del inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ de micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” - Comparar de la capacidad antimicrobiana de los métodos sometidos a estudio -Evaluar la influencia de nanopartículas de plata y del inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ en las características biométricas de las plántulas obtenidas <i>in vitro</i> .	- Antecedentes - Nanopartículas con capacidad microbiocida - Nanopartículas de plata - Inhibidor químico de neutralización PTC ³ (Plant tissue culture control - Influencia de las nanopartículas de plata en la mitosis - Descripción botánica de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” morfotipo MAC 003	Ho: Las nanopartículas de plata y el inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™, disminuyen significativamente la contaminación durante la micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” y mejoran las características biométricas. H ₁ : No existe efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de nanopartículas de plata e inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ en la micropropagación de <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua”	Variable independiente - Concentración de Nano partículas de plata -Concentración del inhibidor químico de contaminación PTC ³ ™ Variable dependiente -Porcentaje de contaminación. -Características biométricas	Población: <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pav “mashua” Tipo de investigación: Básica – experimental Análisis estadístico. El diseño experimental será aleatorio con diez explantes por tratamiento y treinta repeticiones, con los datos se realizaran un análisis de varianza (ANVA) con arreglo factorial y una comparación de medias con la prueba de Tukey (p≤0.05) utilizando el programa estadístico SPSSv.11.5.