

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



**"PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS MORFOTIPOS DE KUYACSA
(*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) DE LA REGIÓN
HUÁNUCO "**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

TESISTA:

Bach. ANABEL BRISEIDA FLORES AMADO

ASESORA:

Dra. MILKA TELLO VILLAVICENCIO

HUÁNUCO – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres, que a pesar de las dificultades siempre me guiaron para ser una persona de bien, por los consejos, la paciencia y el apoyo incondicional a lo largo de todos estos años. Por creer en mí, enseñarme el significado de la perseverancia y no rendirme ante las adversidades.

AGRADECIMIENTO

A mis padres por ser mi pilar fundamental y haberme apoyado incondicionalmente, pese a las adversidades e inconvenientes que se presentaron. No tengo palabras para agradecerles las incontables veces que me brindaron su apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, unas buenas, otras malas, otras locas. Gracias por darme la libertad de desenvolverme como ser humano.

Agradezco de manera especial a mi asesora de tesis la Dra. Milka Nelly Tello Villavicencio quien con su experiencia, conocimiento y motivación me oriento en la investigación, también por las enseñanzas y el apoyo brindado durante todo el desarrollo de mi carrera profesional.

Agradezco a los todos docentes que, con su sabiduría, conocimiento y apoyo, motivaron a desarrollarme como persona y profesional en la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica.

PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS MORFOTIPOS DE KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.), DE LA REGIÓN HUÁNUCO

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta a la micro propagación *in vitro* de dos morfotipos de kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruíz & Pav.] Standl.) de la región Huánuco, para lo cual se desarrollaron ensayos previos de establecimiento *in vitro*. Se tomaron explantes de 5 y 10 mm, se esterilizaron en condiciones asépticas y fueron sembradas en un medio Murashigue and Skoog. Las plántulas obtenidas fueron multiplicadas en medio de cultivo con MS + 0.01 mg L⁻¹ de ANA + 0.03mg L⁻¹ de AIB y MS + 0,02 mg L⁻¹ de ANA + 0,03 mg L⁻¹ de BAP. Muchas de las plántulas desarrollaron raíces en los medios de multiplicación empleados. Los resultados muestran que las yemas apicales son los mejores explantes para realizar el establecimiento *in vitro*, también el medio de multiplicación suplementado con MS + 0.01 mg L⁻¹ de ANA + 0.03mg L⁻¹ de AIB muestra mayor número, longitud de brotes y mayor desarrollo radicular (número de raíces). Así mismo el morfotipo morado mostró ser más resistente y rústico frente al morfotipo blanco que es más delicado.

Palabras clave: *Mirabilis expansa*, *in vitro*, morfotipo, Huánuco, Murashigue and Skoog.

***In vitro* PROPAGATION OF TWO MORPHOTYPES OF KUYACSA
(*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.), FROM THE HUÁNUCO REGION**

ABSTRACT

The present research was carried out with the objective of evaluating the response to *in vitro* micropropagation of two morphotypes of kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruíz & Pav.] Standl.) from the Huánuco region, for which previous *in vitro* establishment trials were developed. Explants of 5 and 10 mm were taken, sterilized under aseptic conditions and sown in Murashigue and Skoog medium. The obtained seedlings were multiplied in culture medium with MS + 0.01 mg L⁻¹ of ANA + 0.03 mg L⁻¹ of AIB and MS + 0.02 mg L⁻¹ of ANA + 0.03 mg L⁻¹ of BAP. Many of the seedlings developed roots on the multiplication media used. The results show that the apical buds are the best explants for *in vitro* establishment, also the multiplication medium supplemented with MS + 0.01 mg L⁻¹ of ANA + 0.03 mg L⁻¹ of AIB shows greater number, length of shoots and greater root development (number of roots). Likewise, the purple morphotype showed to be more resistant and hardier compared to the white morphotype, which is more delicate.

Keyword: *Mirabilis expansa*, *in vitro*, morphotype, Huánuco, Murashigue and Skoog.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	13
II.	MARCO TEÓRICO	15
	2.1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	15
	2.1.1. Origen y distribución	15
	2.1.2. Nombres indígenas	15
	2.1.3. Clasificación taxonómica	16
	2.1.4. Descripción botánica de <i>Mirabilis</i> sp.	17
	2.1.5. Ecología y distribución geográfica	19
	2.1.6. Aspectos agronómicos	21
	2.1.7. Composición química de la parte comestible	23
	2.1.8. Cultivo in vitro	24
	2.1.9. Composición del medio de cultivo	29
	2.2. ANTECEDENTES	34
	2.3. HIPÓTESIS	36
	2.4. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	36
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	38
	3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	38
	3.2. LUGAR DE EJECUCIÓN	38
	3.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS	39
	3.4. ETAPAS DE ESTUDIO	39
	3.5. PRUEBA DE HIPÓTESIS	45
	3.5.1. Diseño de la investigación	45
	3.5.2. Datos a registrar	47
	3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información	48
	3.6. MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS	49
	3.7. CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	51
	3.7.1. Selección del material vegetal	51
	3.7.2. Fase de laboratorio	54

IV. RESULTADOS	60
4.1. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO IN VITRO	60
4.1.1. Ensayos previos a la introducción in vitro	60
4.2. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	70
4.2.1. Número de brotes	70
4.2.2. Longitud de brotes	73
4.2.3. Número de raíces	76
4.2.4. Comparación de promedios generales para determinar el mejor tipo de explante y medio de multiplicación.	79
4.2.5. Vías de regeneración morfogénica de los dos morfotipos de kuyacsa.	80
V. DISCUSIÓN	82
5.1. ESTABLECIMIENTO IN VITRO	82
5.1.1. Supervivencia de explantes	82
5.2. MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO	83
VI. CONCLUSIONES	85
VII. RECOMENDACIONES	87
VIII. LITERATURA CITADA	88

INDICE DE CUADROS

Cuadro 01. Distribución de <i>Mirabilis expansa</i> silvestre y cultivado según diferentes autores.	20
Cuadro 02. Procedimiento de la etapa de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar	40
Cuadro 03. Ensayo 01 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.	40
Cuadro 04. Ensayo 02 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.	41
Cuadro 05. Ensayo 03 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.	42
Cuadro 06. Descripción de tratamientos de introducción	44
Cuadro 07. Descripción de los tratamientos de medios de multiplicación	45
Cuadro 08. ANOVA para el Diseño Completamente al Azar	47
Cuadro 09. Análisis de Varianza para el número de brotes (10 días)	70
Cuadro 10. Análisis de Varianza para el número de brotes (20 días)	71
Cuadro 11. Análisis de Varianza para el número de brotes (30 días)	72
Cuadro 12. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (10 días)	73
Cuadro 13. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (20 días)	74
Cuadro 14. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (30 días)	75
Cuadro 15. Análisis de Varianza para el número de raíces (10 días)	76
Cuadro 16. Análisis de Varianza para el número de raíces (20 días)	77

Cuadro 17. Análisis de Varianza para el número de raíces (30 días)	78
Cuadro 18. Comparación de promedios generales para determinar el mejor explante y medio de cultivo.	80
Cuadro 19: Registro de datos 10 días después de la multiplicación in vitro.	97
Cuadro 20: Registro de datos 20 días después de la multiplicación in vitro.	98
Cuadro 21: Registro de datos 30 días después de la multiplicación in vitro.	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 01. <i>Mirabilis expansa</i> (Ruíz y Pav.) Standl. A: Calixhymenia expansa B: Calixhymenia ovata C: Calixhymenia profrata.	17
Figura 02. Tallos, hojas y nudos del morfotipo blanco y rojo de kuyacsa.	51
Figura 03. Flores del morfotipo rojo en el jardín de colecta – Mitocucho, Kichki.	52
Figura 04. Flores del morfotipo blanco en el jardín de colecta – Mitocucho, Kichki.	52
Figura 05. Vista microscópica de las flores del morfotipo blanco y rojo de kuyacsa.	53
Figura 06. Muestras de los morfotipos blanco y rojo, con la rotulación respectiva.	53
Figura 07. Lavado y esterilización de materiales contaminados	57
Figura 08. Preparación de ambientes, material vegetal y siembra.	58
Figura 9. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el primer ensayo. (Blanco y Rojo).	60
Figura 10. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el segundo ensayo. (Blanco y rojo).	61
Figura 11. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el tercer ensayo. (Blanco y rojo).	62
Figura 12. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).	62
Figura 13. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).	63
Figura 14. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).	63

Figura 15. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).	64
Figura 16. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).	65
Figura 17. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).	65
Figura 18. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).	66
Figura 19. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).	67
Figura 20. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).	67
Figura 21. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.	68
Figura 22. Respuesta en porcentaje de contaminación de hongos en los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.	69
Figura 23. Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana en los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.	69
Figura 24. Respuesta en número de brotes por tratamiento.	71
Figura 25. Respuesta en número de brotes por tratamiento.	72
Figura 26. Respuesta en número de brotes por tratamiento.	73
Figura 27. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.	74
Figura 28. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.	75
Figura 29. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.	76
Figura 30. Respuesta en número de raíces por tratamiento.	77

Figura 31. Respuesta en número de raíces por tratamiento.	78
Figura 32. Respuesta en número de raíces por tratamiento.	79
Figura 33. En la imagen A se observa una plántula del morfotipo blanco sin la presencia de callos, en la imagen B se observa el callo desarrollado. En la imagen C el morfotipo rojo tiene una raíz en desarrollo y en la imagen D se muestra el sistema radicular desarrollado.	81
Figura 34. Preparación de medio de cultivo de introducción.	95
Figura 35. Instalación de las plántulas in vitro del morfotipo rojo.	95
Figura 36. Instalación de las plántulas in vitro del morfotipo blanco.	95
Figura 37. Desarrollo radicular en plántulas del morfotipo rojo.	96
Figura 38. Desarrollo de las plántulas, morfotipo rojo.	96
Figura 39. Desarrollo de las plántulas, morfotipo blanco.	96

I. INTRODUCCIÓN

Mirabilis expansa (Ruiz & Pav.) Standl., es una tuberosa perteneciente a la familia de las nictagináceas que se distribuye en gran parte del territorio Sudamericano. Su cultivo se concentra en las zonas alto andinas de Bolivia, Ecuador y Perú, donde es conocido como “mauka”, “miso” y “chago”, respectivamente. Sin embargo, también se encontró en Venezuela y Chile. Es una de las especies más relegadas dentro del grupo de raíces y tubérculos andinos (Vivanco, JM; Savary, BJ y Flores, HE. 1999). Recientemente gracias al trabajo de investigación realizado por Gendall (2017) se evidenció la existencia de *M. expansa* en los departamentos de Ancash, Huánuco, Puno y Amazonas.

Es una planta con ricas propiedades nutricionales. Si es comparado con los otros cultivos andinos de raíces y tubérculos, tiene la mayor cantidad de calcio y fósforo. Este hecho es especialmente importante para los campesinos de las tierras altas cuya dieta es muy desequilibrada con una falta significativa de proteína, fósforo y calcio debido a que perciben bajos ingresos económicos. Por el contrario, mauka contiene una pequeña cantidad de sodio, por lo que es muy alimento adecuado para personas con una dieta baja en sodio (Montenegro y Franco 1988).

El cultivo de raíces y tubérculos tiene una larga tradición e historia en la región andina. Sin embargo, los efectos del calentamiento global, la deforestación, cambios en el estilo de vida, especialmente en la dieta alimenticia, carencia de mano de obra en el campo, debido a la salida de los jóvenes de las fincas o chacras, inquietudes sobre el comercio internacional de semillas además de la tendencia a la uniformidad, la erosión genética de varias especies andinas que antes formaban parte de los cultivos ancestrales y de la dieta andina, se está convirtiendo en un problema cada vez mayor (Klášková y Fernández 2011).

Ésta es una especie en estado vulnerable, por los motivos expuestos; por tanto, es importante estudiar una estrategia de conservación *ex situ*, usando la técnica del cultivo *in vitro*. Este tipo de plantas son más complicadas

de obtener, sin embargo, su desarrollo en campo es más rápido y uniforme que el de plantas convencionales, y por lo general producen cosechas mayores y más tempranas (Bushway *et al.* 2008).

Objetivo general

Evaluar la respuesta a la micro propagación *in vitro* de dos morfotipos de kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruíz & Pav.] Standl.) de la región Huánuco.

Objetivos específicos

- a) Precisar el explante ideal para cada morfotipo de kuyacsa en cada etapa del cultivo de tejidos.
- b) Determinar el protocolo de desinfección adecuado para la etapa de establecimiento *in vitro* en los dos morfotipos de kuyacsa.
- c) Evaluar la tasa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de los morfotipos morado y blanco.
- d) Conocer la vía morfogenética de regeneración en cada morfotipo de kuyacsa.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentación teórica

2.1.1. Origen y distribución

Rea (1982) estudió el cultivo en Perú, Bolivia y Ecuador. Según Rea la región de Cajamarca, en Perú, es el centro de distribución y el lugar de origen de mauka para Bolivia y Ecuador, propagada por la migración durante el imperio inca.

Después de estudios de varios cultivos de raíces tradicionales durante la década de 1980, se amplió la teoría del origen de *M. expansa*. El lugar de origen de mauka en Perú puede incorporar una región que incluye Ancash, La Libertad, Cajamarca y Amazonas (Seminario 2000).

Durante el 2015, el profesor Saturnino Castillo del Colegio Simón Bolívar, Huaraz, registro algunos sitios de cultivo de mauka en Ancash. Poco después, se registraron otras 26 localidades en Ancash, Huánuco y Puno. Posteriormente en 2017, Seminario registró dos localidades más en Cajamarca y Huánuco. Por lo tanto, aunque la teoría de que el norte de Perú es la cuna de la domesticación del mauka tiene peso, también podría haberse originado en el sur de Perú / norte de Bolivia antes de moverse hacia el norte, o que la domesticación podría haber ocurrido de forma independiente en el norte y el sur (Gendall 2017).

2.1.2. Nombres indígenas

M. expansa es conocida por numerosos nombres indígenas, entre ellos: miso y taza en Ecuador; mauka en Bolivia y Perú; y achagu, chago, chagos, chaco, shago, cushpe, cushpín, cushpenes, siguas, arricón, arracacha de toro, yuca inca, yuquilla, camotillo, pega-pega, rabanito, shalca yuca y yuca de jalca, en una variedad de idiomas y dialectos indígenas. En el norte de Perú, a la mauka salvaje se le conoce como camotillo, pega, pegajera o papelilla. Mientras que, en Ecuador, es llamada moradilla o pega. Los

nombres de *M. expansa* varían con grupos étnicos y poblaciones particulares (Seminario 2004).

Gendall (2017), registró otros nombres vernaculares, siendo mauka la denominación para *M. expansa* cultivada que se usa en el sur de Perú, en Huánuco la planta es conocida comúnmente como kuyacsa (aunque también se le llama superracacha y ooshpica). En Cusco es conocida como moqo, en Cajamarca y la Libertad como chagos, chaco, achagu, yuca de jalca, arricón, cushpe, cushpenes, yuca Inca, camotillo, arracacha de toro, rábano, rabanito, pega, yuquilla, kashpa yuca. En Amazonas es conocida como shalca, shalca yuca, shaggchya rumo. En Ancash, Quishpi yuca, coshpi yuca, cospiyá, allja yuca, yuca de la sierra, pishpi yuca, ñatin jora.

2.1.3. Clasificación taxonómica

Wild *Mirabilis expansa* fue caracterizado por primera vez por Ruíz y Pavón como parte de una expedición dirigida por la Corona española. Los dos botánicos nombraron a la planta como *Calyxhymenia expansa* Ruíz & Pav. Casi un siglo y medio después, el botánico estadounidense Standley volvió a caracterizar la planta como *Mirabilis expansa* (Ruíz y Pav.) Standley, siendo considerado dentro de la familia Nyctaginaceae y el género *Mirabilis* (Gendall 2017).

Según Rea (1982), la clasificación taxonómica de kuyacsa se detalla de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Nyctaginaceae

Género: *Mirabilis*

Especie: *Mirabilis Expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.



Figura 01. *Mirabilis expansa* (Ruíz y Pav.) Standl. A: *Calyxhymenia expansa* | B: *Calixhymenia ovata* | C: *Calixhymenia profrata*.

Fuente: Tomada de Ruiz López, H., Pavon, J., *Flora Peruviana, et Chilensis*, Láminas 1-152, vol. 1: pág. 45, t. 75, fig. a (1798-1802)

2.1.4. Descripción botánica de *Mirabilis sp.*

Raíz

Según Barrera *et al.* (2004), indica que la raíz es la parte primaria comestible, son un grupo denso de raíces, con pesos superiores a 2.3 kg, la coloración varía de acuerdo al morfotipo. Sin embargo, bajo tierra, son de colores salmón, a planadas y carnosas, pueden medir hasta 50 cm de largo y 5 cm de diámetro.

Seminario (citado por Gendall 2017) menciona que la forma de la raíz es fusiforme, claviforme o cilíndrica, grande y redondeado en la punta y afilado en la parte inferior. La raíz primaria es dominante sobre las raíces laterales.

La epidermis de las raíces puede presentar diversas coloraciones como indican Seminario y Valderrama (2012), donde mencionan que pueden ser blancas, pardo amarillo, gris anaranjado brillante, gris anaranjado, también la corteza de la raíz presenta diversas coloraciones como blanco, amarillo, amarillo anaranjado, pulpa de raíz blanca, naranja blanca y naranja amarilla.

Tallo

Son cilíndricos y muy frágiles, se encuentran divididos por nudos y presentan una coloración de verde claro a verde oscuro (Barrera *et al.* 2004).

Seminario y Valderrama (2012), indican que el color principal es verde amarillo, verde, rojo púrpura; a veces con pigmentación secundaria de color rojo púrpura.

Hojas

La hoja es ovada o cordada; con la base cordada, subcordada o cuneada y el ápice bastante agudo. Color predominante de la hoja amarillo verdoso, verde amarillo o verde; con pigmentación de color secundaria presente o ausente (rojo - púrpura) (Seminario y Valderrama 2012).

Barrera *et al.* 2004, indican que las hojas inicialmente son cordadas, a partir de la floración cambian de estructura morfológica a ovadas, miden entre 3 a 8 cm de largo y de 2 a 5 cm de ancho, son de color verde oscuro, con nervios y bordes rojizos.

Centro Internacional de la papa (CIP 1998) reporta que, las hojas son opuestas, cordadas u ovadas, de color verde oscuro a verde claro, con o sin pigmentaciones purpuras.

Inflorescencia

Barrera *et al.* (2004) reporta que, es de tipo cima, ubicadas en las ramas terminales y miden entre 3 a 6 cm de longitud.

La inflorescencia es cimosa/paniculada termina en 3 - 4 flores agrupadas. Flores de 3 - 4 mm de largo, 3 - 4 mm de ancho cuando están 7 abiertas. Cáliz en forma de copa con 5 divisiones en la parte superior, persistente y en crecimiento. Corola delgada en la base, en forma de tubo, que se abre hacia arriba en 5 lóbulos. 3 estambres, pistilo formado por ovario inferior, esférico, que termina en un estilo curvo, ligeramente más largo que los estambres. Aproximadamente 25 - 30 días entre la aparición de las primeras flores y la antesis (Seminario 1988).

2.1.5. Ecología y distribución geográfica

En Perú, los hallazgos en Puno se han producido entre los 2 900 y 3 300 m y en el norte de este país, se ha determinado su presencia en altitudes que oscilan entre 2 500 a 3 400 m. Estas últimas altitudes corresponden a la región Quechua (2 300-3 500 m), con una temperatura promedio entre 13-14 °C, temperatura máxima de 25 °C, mínima de 5 °C y precipitación pluvial promedio anual de 680 mm. (Seminario 2004).

El rango altitudinal para los sitios de cultivo de mauka fue de 2 769 – 3 369 msnm, con el punto más bajo en San Pablo de Pillao (Huánuco) y el más alto en Churubamba (Huánuco), el rango conocido se amplía a 2 300 – 3 450 msnm, con el valor máximo correspondiente a Chullín (Bolivia) y la mínima a Namora (Cajamarca) (Gendall 2017).

Todos los morfotipos ocupan el rango altitudinal propio de la región Quechua, desde los 2300 m de altitud (Namora, Cajamarca), hasta los 3400 m (Huayllapampa, Cajamarca). La entrada 42 (M-IV) fue colectado a 3000 m, Limbani (Puno). Las colectas fueron realizadas dentro de los límites latitudinales: 6°23' y 7°51'S en el norte, hasta los 14°6'S en el sur del Perú. El 92% de las entradas proceden de cuencas que tributan a la vertiente del Atlántico (Seminario y Valderrama 2012).

Prefiere suelos de pH cercano al neutro, de textura media, profundos, con buena provisión de materia orgánica (Chota). También prospera en suelos de color claro, de textura franco arenosa, con buena provisión de materia orgánica (Huamachuco). No resiste las bajas temperaturas, pero al parecer las tolera mejor que la achira y el yacón. Además, tiene capacidad de

regeneración a partir de yemas basales. En las asociaciones se muestra muy competitiva, de manera que, en suelos pobres, los campesinos prefieren no sembrarla asociada al maíz porque disminuye las posibilidades de crecimiento. Puede ser ésta una razón para la disminución del área cultivada. La distribución como planta cultivada se restringe a Bolivia, Perú y Ecuador. En el norte del Perú se distribuye con mayor amplitud, hasta en tres morfotipos de planta (Seminario 2004).

El cultivo se mantiene en pequeñas huertas y en forma marginal en altitudes entre los 2 600 y 3 500 msnm; es muy apreciado en las comunidades de valles templados, para la alimentación humana y animal. Se cultiva asociado con el maíz, cucúrbitas u otras plantas (National Research Council citado 1989).

Cuadro 01. Distribución de *Mirabilis expansa* silvestre y cultivado según diferentes autores.

Silvestre
<p>Standley (1931): Venezuela: Mucurubá. Ecuador: Alausí (Chimborazo), Ambato. Chile: Valparaíso. Perú: Sin especificar.</p> <p>Macbride (1937): Perú: Cusco (San Sebastián). Junín (Tarma). Lima (Chancay, Amancaes, Río Blanco).</p> <p>López (1995): Perú: La Libertad (Otuzco: Agallpampa).</p> <p>Seminario y Valderrama (1998): Perú: La Libertad (Otuzco: Cerro Cholocday).</p>
Cultivado
<p>Rea (1965): Bolivia: Camacho, Muñecas, Bautista, Larecaja, Inquisivi.</p> <p>Rea (1982), Tapia et al. (1996): Ecuador: Pichincha, Cotopaxi.</p> <p>Vallenas (1996): Perú: Puno: Limbani (prov. Sandía), Phusca (Usicayos, prov. Carabaya).</p> <p>Franco et al. (1989), Seminario y Seminario (1995):</p>

Perú: Amazonas, Cajamarca, La Libertad (Huamachuco, Santiago de Chuco), Ancash (Siguanas).

Blas (2012) (Comunicación personal):

Perú: Huánuco.

Fuente: Tomada de Seminario J. y Valderrama M. 2012

2.1.6. Aspectos agronómicos

Aunque biológicamente es una planta perenne, por su utilización es una planta anual. La propagación puede ser asexual y sexual. En la forma asexual (la más común), se pueden utilizar los tallos subterráneos engrosados. También se pueden usar brotes tiernos desprendidos de la corona, o porciones de tallo (esquejes). Una práctica campesina consiste en cosechar las raíces y dejar las coronas enterradas en el campo. Otra alternativa es recoger las coronas y ponerlas en pozos cubiertos con tierra. Cuando se utiliza tallos subterráneos la emergencia se produce entre los 20-30 días (Seminario 2004).

Prospera en terrenos de textura franco arenoso o franco limoso y cuando llegan a la madurez fisiológica empiezan a caer las flores y, las hojas se tornan amarillentas, indicando el periodo de cosecha (Seminario y Valderrama 2012).

La Kuyacsa se propaga clonalmente al sembrar los brotes basales, pedazos de tallo o hijuelos. Se plantan en surcos o mejor en hoyos separados entre sí a una distancia de 80 cm a 100 cm. Los aporques deben ser cuidadosos, porque las plantas son delicadas. También se multiplica por semilla. Las plantas desarrolladas de brotes basales y semillas serían utilizables en aproximadamente un año; este período se prolongaría un poco más si se hace la multiplicación por hijuelos. En general, el ciclo productivo es de un año. El rendimiento promedio de este cultivo es de 20 t/ha, aunque se ha registrado una producción máxima de 40 t/ha (Seminario 1993).

La semilla botánica es ortodoxa, pudiendo almacenarse por varios años sin pérdida considerable de su poder germinativo. Semillas almacenadas durante varios años a temperatura de 18 °C, perdieron su poder germinativo a un ritmo de 4 % por año (Seminario 1993). Las plántulas provenientes de

semilla botánica generan durante los primeros meses una raíz pivotante engrosada. Posteriormente, con el aporque, se generan otras raíces tuberizantes, desde la corona. Sin embargo, éstas últimas no llegan a ser tan abundantes como las generadas por semilla asexual (Seminario 2012).

Una forma de siembra natural consiste en que la semilla cae al suelo y germina con las primeras lluvias, formando almácigos que son raleados posteriormente. La semilla se traslada también fácilmente con el agua de riego o a través de los animales y el hombre, por la pegajosidad de sus cubiertas. Las formas de cultivo más comunes son: pocas plantas alrededor de otros cultivos o en asociación con el maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabaza (*Cucurbita ficifolia*) y otros cultivos. También se asocia con la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y el yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y en ocasiones sale espontáneamente en campos de trigo (*Triticum vulgare*). En pocas ocasiones se encuentran parcelas de monocultivo. En los huertos familiares está asociado a diversas hortalizas. En Puno, se encontró cultivada en huertos familiares junto con arracacha, yacón, maíz, papa, tarwi (*Lupinus mutabilis*) y varias hortalizas exóticas (Seminario 2012).

El primer deshierbo y primer aporque se realizan entre los 2-2.5 meses después de la siembra. Un segundo aporque se realiza a los cuatro meses. Por la fragilidad de los tallos, la labor de aporque requiere cuidado (CIPOTATO 2014).

La cosecha puede realizarse desde los 7.5 meses de edad, de acuerdo a las necesidades de consumo. Según los campesinos, un indicador de la época de cosecha es cuando empiezan a caer las flores. Cuando se siembra asociado, en los meses de mayo a junio se cosecha el maíz, el frijol y los otros cultivos. El chago, queda en campo, para ser cosechado en los meses de preparación de terreno para las nuevas siembras (julio a agosto). En algunos casos, los campesinos cosechan cuando las plantas tienen dos años de edad, sin observar cambios considerables en la calidad de las raíces; por el contrario, se incrementa el rendimiento de éstas. La cosecha requiere remover el suelo con cuidado para evitar quebrar o cortar las raíces, dada su disposición irregular alrededor de la corona o cepa (Seminario 2014).

Los rendimientos están condicionados por varios factores. Las diversas comprobaciones en Perú y Bolivia indican variaciones entre 0.5-5.5 kg de raíces tuberizantes/planta. En el valle de Cajamarca, en siembras de varias entradas, en suelos de textura y fertilidad media, sin usar fertilizante, a densidades de 0.80 cm x 0.50 cm (25 000 plantas/ha) y cosechadas a los 12 meses de edad, se registraron pesos de 1.8-5.5 kg de raíces/planta. Esto significa rendimientos de 45 000-137 000 kg/ha. Además, el rendimiento de forraje fue de hasta 5.5 kg/planta. En otros casos se ha informado de rendimientos de forraje de hasta 7 kg/planta (Seminario 2014).

2.1.7. Composición química de la parte comestible

Las raíces contienen 4.81% de proteína en muestra fresca y 13.09 % en muestra seca; carbohidratos de hasta 36,15% en muestra fresca; 283 mg de calcio; 111 mg de fósforo por cada 100 g de parte comestible y menos de 0.01 mg/100 g de sodio, lo que superior a cualquiera de las raíces tuberosas y tubérculos andinos a excepción de la papa (Hidalgo 2003, Seminario 1988 citados por Zapana *et al.* 2017).

Análisis bromatológicos determinan que 100 g de materia seca de raíz contienen 7,4 % de proteína, 4,8 % de fibra, 4,4 % de ceniza y 80 % de carbohidratos, y es el almidón el principal componente (NRC, 1989); el miso es más rico que otras raíces y tubérculos andinos en calcio, fósforo y potasio. Las partes utilizables de esta planta son los tallos y las raíces tuberosas. Los primeros, cuando están bajo tierra, son de color salmón, con los entrenudos sin hojas. Por lo general, son aplanados, considera entre las más despreciables de las fuentes carnosos, y miden hasta 5 cm de ancho y 50 cm de largo (FAO, 1992). Este cultivo es muy apreciado en las comunidades de valles templados, para la alimentación humana y animal.

Se ha informado que las hojas de *M. expansa* contienen hasta un 17% de proteínas y esta proteína se vegetales que crecen en las tierras altas andinas. (Flores *et al.* 2003). Las hojas se han utilizado como alimento para conejos en Perú, lo que proporciona un aumento de peso superior en comparación con una mezcla de pasto de centeno (*Lolium multiflorum*) y trébol

(*Trifolium repens*), y lo mismo ocurre con las plantas enteras que se alimentan de vicuña, según lo informado por (Rea 1992 y Seminario 2004).

2.1.8. Cultivo *in vitro*

En primer término, el cultivo de tejidos *in vitro* comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, celular, tejidos, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Stewart 1983 citado por Roca y Mroginski 1993).

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como al conjunto de técnicas de cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles de porciones de una planta madre, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos, cuya finalidad es el establecimiento de protocolos de micropropagación de especies vegetativas a gran escala (Pierik 2007).

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste especialmente en aislar una porción de planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca y Moroginski 1993).

Además, el cultivo de tejidos puede acelerar el establecimiento de nuevos cultivos a partir de la flora silvestre, y la disponibilidad de semillas híbridas se puede incrementar por el clonaje de las plantas originales. La micropropagación es la técnica de cultivo de tejidos económicamente más utilizada debido a su impacto en la producción comercial de plantas. Inclusive varias compañías tienen una unidad de micropropagación y emplean suficientes trabajadores como investigadores y otros como personal operativo (Pedroza, 2008).

El desarrollo de las diferentes vías del cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células vegetales para regenerar una planta completa

idéntica a la original. Esto permite obtener numerosos cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos mediante el empleo de reguladores de crecimiento, como auxinas, giberelinas y poliaminas, los cuales originan una serie de reacciones en las células vegetales que alteran procesos metabólicos y posibilitan obtener resultados de interés (Perea y Tirado 2011).

2.1.8.1. Micropropagación vegetal

La micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo es una herramienta para el mejoramiento ya que se producen plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación limitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a estímulos adecuados. Así las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciba (Moreno y Oropeza 2017).

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. 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 ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de nuevo y embriogénesis somática (Moreno y Oropeza 2017).

e) Propagación a partir de yemas axilares

El método más común consiste en extirpar los brotes laterales o apicales que contengan meristemo y cultivarlos en un medio que suprima la dominancia apical para estimular el desarrollo precoz de los brotes axilares. Esto suele llevarse a cabo añadiendo citoquininas al medio y conduce a la producción de sistemas de tallos altamente ramificados que carecen de raíces. Tras 3-6 semanas de cultivo, los tallos individuales se separan y se sub cultivan en el mismo medio para su multiplicación. Esto puede repetirse muchas veces o pueden transferirse los brotes a condiciones de enraizamiento, según se requiera.

f) Propagación a partir de segmentos nodales

En muchos casos la adición de citoquininas no induce el brote múltiple de manera inmediata y la multiplicación se consigue más fácilmente con el sub cultivo seriado de nudos del tallo. Se acortan los nudos individuales, repitiéndose el proceso. Este procedimiento se emplea normalmente en patata. Pueden emplearse normalmente en otros explantes (por ejemplo, las inflorescencias, los tallos y las hojas jóvenes), pudiendo alcanzar la multiplicación también por organogénesis o embriogénesis directa en todos los explantes.

2.1.8.2. Ventajas

Lindsey y Jones (1989) mencionan las ventajas:

a) Pequeña necesidad de espacio. La manipulación de vástagos puede conseguirse en un espacio reducido porque se multiplican vástagos pequeños.

b) Esterilidad. La propagación se lleva a cabo en condiciones estériles. No debería producirse por plaga o enfermedad y las plántulas producidas finalmente deberían estar libres de bacterias, hongos y nematodos.

c) Certificación de ausencia de virus. Si se utilizó material ausente de virus para iniciar los cultivos, pueden producirse grandes cantidades de plantas libres de virus.

d) Condiciones controladas. Las condiciones controladas para la multiplicación *in vitro* pueden controlarse estrictamente: luz, composición del medio, niveles de reguladores del crecimiento, la temperatura, etc. pueden conseguirse reproduciblemente altas tasas de propagación.

e) Trabajo. No se necesita atenciones entre los subcultivos (como riego, eliminación de malas hierbas, fumigación).

f) Espacio de invernadero. El espacio de invernadero requerido es menor.

g) Plantas en stock. Las plantas en stock pueden almacenarse *in vitro*.

h) Espectro de especies. Algunas plantas propagadas *in vitro* son difíciles o imposibles de propagar *in vitro*.

i) Mecanización. Se puede automatizar los procesos de propagación de algunas especies para reducir el trabajo necesario.

Dentro de las ventajas se permite propagar un gran número de especies difíciles de multiplicar, a menudo por los métodos clásicos puede realizarse con un nivel de proliferación elevado en un estado precoz de desarrollo, con frecuencia esta propagación *in vitro* se une a la lucha fitosanitaria, ya que las plantas obtenidas, son usualmente libres de virus, bacterias, hongos parásitos, y constituyen un material de calidad.

Por su parte, Boutherin y Bron (1994), señalan otras ventajas como mejorar la selección, ya que a partir de un individuo notable, se puede comercializar rápidamente un clon interesante, garantía de homogeneidad, además limita o suprime los pies madre y por consiguiente libera superficies de invernadero y permite la programación de cultivos a lo largo de todo el año, o la producción en períodos muy precisos, sin que el número de pies madre o su estado por reposo vegetativo tengan influencia y por último, la formación

de un “banco de genes” que podrán conservar especies o cultivares que ofrezcan un interés agronómico, hortícola, industrial, ecológico, etc.

2.1.8.3. Desventajas

Lindsey y Jones (1989) mencionan las desventajas:

a) Instalaciones muy especializadas. Se necesitan instalaciones altamente especializadas (habitaciones de cultivo, cabinas de flujo laminar, etc.)

b) Trabajadores especializados. Los trabajadores deberán ser capaces de trabajar en condiciones estériles y de decidir donde dividir los distintos cultivos.

c) Contaminación. Si se produce contaminación bacteriana o fúngica en las fases tempranas de multiplicación pueden perderse muchos propágulos potenciales.

d) Condiciones de micropropagación. Pueden ser necesario para desarrollar métodos específicos para cada especie con el fin de conseguir una micropropagación eficaz, incluyendo las condiciones de enraizamiento y de establecimiento de las plántulas.

e) Tamaño de plántulas. Las plántulas producidas inicialmente son pequeñas. Estabilidad genética. Las técnicas de propagación no deben introducir estabilidad genética.

f) Dado que las instalaciones requeridas y los procedimientos suponen un intenso trabajo, el coste de las plántulas es relativamente alto y deben compensarse por tanto con una producción a gran escala y con un valor añadido elevado de las plántulas producidas.

En cuanto a las desventajas se puede obtener “variantes” distintas a la planta madre por su morfología o fisiología, la necesidad de usar determinados tejidos para una especie dada, ya que se debe acudir a los tejidos aptos para sintetizarlos en forma natural. Por su parte Bouterin y Bron (1994), mencionan el costo como desventaja ya que en una planta *in vitro* es más elevado que el de aquella multiplicada por métodos tradicionales. Sin

embargo, este inconveniente se compensa con frecuencia con una ganancia de productividad, el riesgo de mutación porque la tasa de variabilidad es más elevada, por último, las dificultades de éxito, cierto número de vegetales se multiplican fácilmente *in vitro*, otros permanecen rebeldes a esta técnica, en especial en las especies leñosas.

2.1.9. Composición del medio de cultivo

García (2010:21) ilustra que un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. De acuerdo con Gamborg *et al.* (1976) citado por Roca y Mroginski el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

a) Fuentes de carbono

García (2010) indica que la prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa.

b) Nutrientes minerales

En los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na₂EDTA), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH (García 2010).

Los macronutrientes son indispensables para el crecimiento de la planta y están constituidos por seis elementos principales: nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y azufre (S); dentro de

este grupo también son considerados los iones de sodio (Na) y cloro (Cl), aunque el rol de estos iones en la planta es poco conocido.

Los micronutrientes se usan como sales de iodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y cobalto (Co). Son componentes de la célula de la planta, y son importantes para el metabolismo y su fisiología (CIP 1999).

c) Sustancias reguladoras de crecimiento

García (2010) indica que en la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas y/o citocininas. Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemos o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos.

El CIP (1999), indica que existen varias clases de sustancias reguladoras de crecimiento:

Auxinas

Son ampliamente usadas en trabajos de micropropagación y son añadidos al medio de cultivo para estimular el crecimiento de callos, suspensión de células u órganos (meristemos, tallos o ápices de raíces) y para regular la morfogénesis, especialmente en interacción con citoquininas.

El ANA (ácido naftalenacético), es la auxina más empleada en el cultivo de tejidos, concentraciones altas de esta favorecen el crecimiento de callos. El 2.4 – D es la auxina más fuerte, induce a la formación de callos, tiende a suprimir la organogénesis en muchas dicotiledóneas y actúa antagónicamente en el desarrollo. También puede causar el rápido incremento de ploidía y pérdida de cromosomas resultando en aneuploidía.

Citoquininas

Con compuestos que intervienen como regulador de crecimiento, desarrollo, muy importantes para regular el crecimiento y morfogénesis en el cultivo de tejidos. Al igual que las auxinas existen compuestos naturales y sus análogos sintéticos.

Las citoquininas con constituyentes del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), y tiene interacción sinérgica con las auxinas. Cuando la proporción citoquinina/auxina es alta favorece la formación de tallos y si es baja favorece el enraizamiento.

Giberelinas

Muchas giberelinas se han sintetizado a partir de la planta, pero solamente dos o tres compuestos activos se encuentran disponibles en el mercado. El ácido giberelico (AG3) es el producto más empleado en el cultivo *in vitro*.

Las giberelinas influyen en el crecimiento y desarrollo de diferentes maneras, por ejemplo: promover el crecimiento de entrenudos, estimular y acelerar la floración, inducir la fructificación y partenocarpia de estos. Sin embargo, inhibe el crecimiento de raíces y tallos en los callos.

Ácido abscísico

El ABA, es otra sustancia reguladora del crecimiento de las plantas y es sintetizado en plastidios o cloroplastos. El ABA actúa como inhibidor de crecimiento y por ende bloquea el efecto de las giberelinas y citoquininas, promueve la dormancia, estimula la abscisión de las hojas e inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN), pero no la del ácido desoxirribonucleico (ADN). También promueve el cierre de estomas, tiene efecto sinérgico con auxinas en el enraizamiento de esquejes.

Etileno

La presencia del gas etileno (C₂H₄) en la atmósfera causa anomalías en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, se ha descubierto que el etileno es producido por la misma planta y se cree que puede actuar como una sustancia de crecimiento con algunas funciones reguladoras.

d) Agente gelificante

García (2010:22) indica que el agente gelificante se usa en el caso de medios semisólidos. El agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel» (2,0-2,60%), «Phytigel» (0,25- 0,40%), agarosa (0,80-0,90%) y «Gelrite» (0,10-0,20%).

Hay reportes sobre la utilización de almidones de distintas fuentes, como agentes gelificantes en medios de cultivo para proliferación vegetal. Se ha micropropagado segmentos nodales de papa (*Solanum tuberosum*) en medios gelificados con almidón de yuca (Kuria *et al.* 2008), sagú (Naik y Sarkar, 2001); banana (*Musa*) en medios con almidón de papa y yuca (Kodyn y Zapata, 2001); manzana (*Malus domestica Borkh*) en medios solidificados con almidón de maíz (Zimmerman *et al.* 1995) (Martin *et al.* 2012).

2.1.9.1. Protocolos de desinfección

La desinfección superficial tiene como objetivo eliminar los microorganismos evitando causar daño a los explantes. El procedimiento más utilizado consiste en una doble desinfección mediante una inmersión en etanol (70% v/v) durante 20 a 60 segundos, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio 1 a 3% durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos emplean únicamente etanol o hipoclorito de sodio, es necesario retirar los restos de los productos usados mediante varios enjuagues con agua destilada estéril.

Cuando no se emplea etanol, el uso de agentes tenso activos junto con el desinfectante es recomendado. El más empleado es el Tween-20. Durante la desinfección superficial con hipoclorito de sodio el manejo es sencillo y no representa ningún peligro de toxicidad para el material de siembra empleado.

Los explantes son sumergidos en una solución al 5% (p/v), con dos gotas de tween 20 durante diez minutos y se enjuagan cuatro veces con agua destilada estéril. Con esta desinfección se no se obtiene contaminación en los

explantes usados. Para tener una mejor desinfección los explantes deben tener un lavado previo con agua y detergente (Revista Corpoica 2007).

Desinfectar el material vegetal (ramas de donde se tomarán los nudos) antes de realizar la disección del mismo, este material fue sumergido en Benlate (fungicida sistémico) al 2% durante una hora y luego se realizaron cuatro enjuagues con solución jabonosa y agua destilada estéril. Después se hizo una inmersión de las ramas en alcohol al 7% durante un minuto y fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril (Pedroza 2008).

La esterilización se puede realizar mediante una inmersión en etanol al 70% durante 30 segundos, seguida de 25 minutos en agitación en una solución acuosa al 21% de hipoclorito de sodio tomada de una solución de lejía comercial. Después se lavan tres veces con agua destilada estéril (Zarate *et al.* 1997).

Para la desinfección de los nudos, se recomienda aplicar tratamientos mediante el uso de alcohol al 70% y NaClO en concentraciones de 2,5 y 5% durante diferentes intervalos que podrán ser de 1, 2, 3,4 y 5 minutos, donde se evalúan los siguientes parámetros: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación y porcentaje de supervivencia, siendo este último, la variable respuesta definitiva, para escoger el mejor tratamiento de desinfección (Díaz *et al.* 2005).

2.1.9.2. Tipos de explantes

La edad del explante es importante en el desarrollo *in vitro* y crítico para las especies maderables; la micro propagación es más fácil empleando tejidos juveniles, y más difícil, con tejidos adolescentes y maduros (Villalobos *et al.* 1984).

De acuerdo con el material vegetal utilizado, la técnica la propagación *in vitro* puede ser de: Cultivo de órganos (yemas axilares y apicales, nudos en tallos), cultivo de tejidos (hojas, peciolo, meristemos) y cultivo de células (células y protoplastos), utilizando reguladores de crecimiento. En todos los casos se puede lograr como producto final, plantas enraizadas, que van a ser aclimatadas previamente a la etapa de desarrollo en viveros convencionales,

en donde lograrán el crecimiento necesario para su instalación en el campo en forma definitiva (Domínguez 2002).

Se debe procurar utilizar explantes que contengan mayor proporción de tejido meristemático o que contengan mayor capacidad de expresar la totipotencia. Yemas apicales normalmente presentan mayor capacidad de crecimiento que las yemas axilares, que se encuentran bajo efecto de la dominancia apical (Aguilar *et al.* 2010).

Los explantes que mejores resultados dan son los tomados de las plantas jóvenes, debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido, la extracción de explantes se debe realizar en cabinas de flujo laminar para garantizar la asepsia.

La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas semi leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles. Es importante, por lo tanto, formar un banco de plántulas *ex vitro* utilizando semillas recolectadas de árboles sanos y vigorosos preferentemente cercanos al sitio donde se van a plantar los futuros árboles; los explantes se toman de plantas jóvenes (López 2010).

2.2. Antecedentes

Zaccai *et al.* (2006), en su trabajo de investigación menciona que desarrollaron protocolos para la regeneración *in vitro* y la producción de plantas propagadas *in vitro* y el sistema de transformación para *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). Entre los tipos de explantes y los diferentes medios probados, la regeneración de brotes consistentes se obtuvo solo a partir de segmentos nodales cultivados en un medio de regeneración que consiste en un suplemento de medio Murshashige y Skoog con 2 mg l^{-1} 6-benciladenina, 2 mg l^{-1} zeatina y 1 mg l^{-1} ácido indol acético. La eficiencia de la regeneración dependía del tipo de planta, blanca o flor de alfiler, utilizada como fuente de explantes.

Xu, Hunter y Reid (2005) realizaron una investigación sobre los sistemas de regeneración en *Mirabilis jalapa*, donde usan sistema modelo

para estudiar la senescencia floral independiente del etileno en cuatro tiempos. Como primer paso para desarrollar un sistema de transformación / regeneración (T / R), han investigado formas de obtener una regeneración rápida y eficiente de las plantas *Mirabilis jalapa*. Después de probar una amplia gama de explantes, medios y condiciones de cultivo, determinaron que podían obtener altas tasas de formación de meristemas utilizando cotiledones extirpados de embriones maduros.

Los cotiledones y sus pecíolos subyacentes se aislaron de semillas maduras y se cultivaron en la oscuridad durante una semana en medio Murashige y Skoog (MS) que contenía 1 mg de L-1 IAA y 1 mg de L-1 tiadiazurón (TDZ). Los cotiledones se transfirieron luego a medios de regeneración y se cultivaron a la luz. El medio de regeneración contenía sales y vitaminas MS y 2 mg. L-1 TDZ. Después de cuatro semanas, aparecieron brotes de meristemas en más del 80% de los pecíolos. La mayoría de los meristemas podrían desarrollarse a brotes maduros y luego a plantas intactas.

Vepechadu, Pal Bais y Vivanco (2003), realizaron una investigación donde las semillas de *M. expansa* se lavaron en agua corriente y se esterilizaron en superficie usando hipoclorito de sodio (0,3% v / v) durante 10-15 minutos, seguidas de tres a cuatro lavados en agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas en superficie se colocaron en medios basales estáticos de MS (Murashige y Skoog 1962) (4,4 g de sales de MS, 30 g de sacarosa y 8 g de agar por litro) para la germinación.

Los cultivos de callos se iniciaron utilizando raíces primarias de plántulas de 10 días de edad cultivadas *in vitro* y posteriormente cultivadas en medios que contienen sales de MS y vitaminas suplementadas con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0,90 IM), cinetina (0,11 IM) y sacarosa (30 gl) 1). Los reguladores del crecimiento de las plantas se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 C. La intensidad de la luz bajo un modo continuo fue 4.4117 J m) 2 s) 1. Los cultivos en suspensión celular se establecieron a partir de los cultivos de callos, y se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio nutriente que contenía

2,4-D (0,90 IM), cinetina (0,11 IM) y sacarosa (30 gl) 1) por subcultivo quincenal en un agitador rotativo a 90 rpm mantenido a 25 ± 2 C.

Vivanco y Flores (2000), realizaron un estudio usando callos y cultivos de suspensión celular de *Mirabilis expansa* [Ruiz & Pavón] que desarrollaron y mantuvieron vivos en medio Murashige y Skoog suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg / l) y cinetina (0,1 mg / l). Los cultivos de callos y suspensión celular se cribaron con anticuerpos generados contra ME1 (27.S kDa) y ME2 (27 kDa), dos proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) encontradas previamente en las raíces de *M. expansa*. Una proteína de 29 kDa que se encuentra en callos y suspensiones celulares reaccionó fuertemente con los anticuerpos ME1. La proteína de 29 kDa, denominada MEC, se purificó hasta homogeneidad mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de perfusión de intercambio catiónico.

2.3. Hipótesis

- a) Sí se precisa el explante ideal para cada tipo de morfotipo de kuyacsa en cada etapa del cultivo de tejidos lograremos una propagación exitosa.
- b) Sí se determina el protocolo de desinfección adecuada para la etapa de establecimiento *in vitro* en los dos morfotipos de kuyacsa se obtendrá mayor número de plantas sanas.
- c) Sí se evalúa la tasa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* se conocerá que morfotipo produce mayor número de plántulas.
- d) Sí se conoce la vía regeneración morfogénica de cada morfotipo de kuyacsa nos permitirá saber si es directa o indirecta.

2.4. Variables y operacionalización de variables

Variables:

- A. Kuyacsa (*Mirabilis expansa*)
- B. Cultivo *in vitro*

Indicadores:

- a) Porcentaje de regeneración.
- b) Porcentaje de oxidación.

- c)** Porcentaje de contaminación por bacterias.
- d)** Porcentaje de contaminación por hongos.
- e)** Número de raíces por plántula.
- f)** Número de brotes por plántula.
- g)** Longitud de brotes por plántula.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo y nivel de investigación

El tipo de investigación aplicada, porque se basó en los principios de la ciencia sobre los aspectos de micropropagación *in vitro*, para obtener, plántulas de dos morfotipos de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl. en la Región Huánuco.

Es cuantitativa, porque respuestas de los explantes a los protocolos de desinfección empleados están expresados en porcentajes y todos los datos recopilados expresados en forma numérica.

Es experimental, porque las variables independiente y dependiente fueron manipuladas intencionalmente en las etapas de multiplicación y enraizamiento, aplicando técnicas del cultivo de células y tejidos.

3.2. Lugar de ejecución

El proyecto se ejecutó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán (UNHEVAL), Huánuco, Perú.

a) Posición geográfica:

Latitud Sur : 9°57'03.5" S

Longitud Oeste : 76°14'55.0" O

Altura : 1 935 msnm

b) Ubicación geográfica:

Región : Huánuco

Provincia : Huánuco

Distrito : Pillco Marca

Lugar : Laboratorio de Biotecnología Vegetal
UNHEVAL

3.3. Población, muestra y unidad de análisis

Población

La población estuvo compuesta por dos morfotipos de kuyacsa, compuesta por plantas que corresponden al morfotipo rojo y blanco.

Muestra

La muestra estuvo constituida por toda la población de los dos morfotipos de kuyacsa, procedentes del jardín de colecta en Mitocucho.

Tipo de muestreo

No probabilístico, porque la muestra se seleccionó por conveniencia.

Unidades de análisis

La unidad de análisis está representada por los explantes de Kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) cultivadas en condiciones *in vitro*.

3.4. Etapas de estudio

El presente trabajo de investigación fue realizado en dos etapas:

Etapa 01: Selección de material vegetal

Etapa 02: Fase de laboratorio

A continuación, se detalla los pasos a desarrollados durante la etapa 02: Fase de laboratorio.

a) Desinfección

Las plantas de kuyacsa mantenidas refrigeradas en bolsas con cierre hermético por 24 horas a 3°C, de donde se utilizaron las yemas apicales y laterales.

Lavado con agua de caño, luego se pasó por agua destilada y detergente. Luego se llevó a la sala de siembra, dentro de la cámara de flujo laminar, se sumergió en alcohol, después en hipoclorito de sodio, la determinación del tiempo y reactivo se aplicó según el tratamiento destinado.

Terminado la desinfección se enjuagó con abundante agua destilada esterilizada.

Cuadro 02. Procedimiento de la etapa de desinfección fuera de la cámara de flujo laminar

Lugar	Procedimiento de desinfección
Jardín de colecta	Se cortaron los tallos al ras de la planta, se lavó con agua de caño para retirar la tierra. Los tallos lavados fueron colocados en bolsas con cierre hermético.
Laboratorio (Fuera de la cámara de flujo laminar)	Se usó una magenta para lavar los tallos, en una solución de agua destilada con detergente por un minuto, después de enjuagar tres veces con agua destilada para retirar los restos del detergente, se colocó en un frasco estéril y fue llevado a la cámara de flujo laminar.

Fuente: Elaboración propia.

Se realizaron tres ensayos para seleccionar los protocolos de desinfección adecuados para los morfotipos rojo y blanco. Cada ensayo consistió en 10 repeticiones, en total 80 unidades experimentales en cada ensayo.

Cuadro 03. Ensayo 01 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

Trat	Procedimiento de desinfección	Morfotipo	Explante
D1	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.5% por 1 minuto y medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema apical
D2	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 1.8% por 1 minuto y 40 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema lateral
D3	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 1 minuto, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.8% por 2 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema apical
D4	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2% por 1 minuto y	Blanco	Yema lateral

	medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.		
D5	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.5% por 2 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D6	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.5% por 1 minuto y medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral
D7	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2% por 2 minutos y 50 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D8	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.5% por 2 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral

Fuente: Elaboración propia

Se realizó el ajuste de cada uno de los protocolos usados en el ensayo 01(Cuadro 03) para optimizar los resultados, para esto se cambiaron los tiempos de inmersión y porcentaje de concentración de hipoclorito de sodio.

Cuadro 04. Ensayo 02 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

Trat.	Procedimiento de desinfección	Morfotipo	Explante
D1	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.5% por 2 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema apical
D2	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.2% por 2 minutos y 30 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema lateral
D3	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 1 minuto, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2.4% por 4 minutos. Terminado el	Blanco	Yema apical

	tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.		
D4	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.2% por 3 minutos y medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema lateral
D5	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2% por 2 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D6	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.3% por 4 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral
D7	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2% por 3 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D8	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.5% por 4 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral

Fuente: Elaboración propia

Nuevamente se realizó el ajuste de cada uno de los protocolos usados en el ensayo 02 (Cuadro 04) para obtener mejores resultados, para esto se cambió los tiempos de inmersión y porcentaje de concentración de hipoclorito de sodio.

Cuadro 05. Ensayo 03 del procedimiento de la etapa de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

Trat.	Procedimiento de desinfección	Morfotipo	Explante
D1	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 1.8% por 3 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema apical
D2	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.5% por 3 minutos y 30 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema lateral

D3	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.7% por 4 minutos y 30 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema apical
D4	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.4% por 4 minutos y medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Blanco	Yema lateral
D5	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2% por 2 minutos y medio. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D6	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.6% por 5 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral
D7	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en alcohol al 70° durante 30 segundos, luego se retiró el explante para sumergirlo en lejía estéril al 2.3% por 3 minutos y 40 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema apical
D8	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.7% por 7 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	Rojo	Yema lateral

Fuente: Elaboración propia

Se realizó la disección de las ramas de los dos morfotipos empleados, y se utilizaron pinzas y bisturíes, en una placa Petri esterilizada se cambió de bisturí 2 veces, se sumergió en alcohol y flameado con un mechero. Al obtener las yemas apicales y laterales estas fueron cortadas con un bisturí y con cuidado se colocó en frascos de prueba con un medio sólido sin MS. Se llevó a la sala de incubación durante 10 días.

b) Establecimiento *in vitro*

Culminada la etapa de desinfección, se llevó a cabo selección de 4 protocolos y un último ajuste para realizar la introducción definitiva. Cada tratamiento tuvo 20 repeticiones, en total 160 unidades experimentales.

Las unidades experimentales fueron llevadas nuevamente a la sala de incubación por un mes, realizando las evaluaciones respectivas cada 10

días. La descripción de los tratamientos de introducción es detallada en el siguiente Cuadro 06.

Cuadro 06. Descripción de tratamientos de establecimiento *in vitro*

Trat.	Procedimiento de desinfección	Medio de cultivo	Morfotipo	Explante
T1	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 3% por 4 minutos y 30 segundos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	MS + Agua de coco + agar	Blanco	Yema apical
T2	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.9% por 5 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	MS + agar	Blanco	Yema lateral
T3	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 3.3% por 5 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	MS + agua de coco + agar	Rojo	Yema apical
T4	Se introdujo el explante en un frasco estéril y se sumergió en lejía estéril al 2.9% por 10 minutos. Terminado el tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril.	MS + agar	Rojo	Yema lateral

Fuente: Elaboración propia

c) Multiplicación y enraizamiento

De las plántulas establecidas *in vitro*, se seleccionó dos tipos de explantes, uno de la parte basal y el otro de la zona apical de la plántula *in vitro*; de esta forma se obtuvo cuatro tratamientos con veinte repeticiones cada una. La multiplicación se realizó en dos medios de cultivo diferentes los cuales se detallan en el Cuadro 07.

Cuadro 07. Descripción de los tratamientos de medios de multiplicación

Trat.	Medio de multiplicación	Morfotipo	Explante
T1	MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB	Blanco	Basal
T2	MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP	Blanco	Apical
T3	MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB	Rojo	Basal
T4	MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP	Rojo	Apical

Fuente: Elaboración propia.

Dónde:

A: MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB

B: MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP

3.5. Prueba de hipótesis

El diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) es el más simple de todos los diseños, solamente se estudia el efecto de un factor, el cual se varía en diferentes tratamientos o niveles.

El análisis de varianza (ANOVA) en DCA, consiste en analizar los cocientes de las varianzas para probar la hipótesis de igualdad o desigualdad entre las medidas debidas a los tratamientos. Para lo cual se separa la variación total en las partes con que contribuye cada fuente de variación. En el caso de DCA las fuentes de variación principales son debidas a los tratamientos y al error.

3.5.1. Diseño de la investigación

Establecimiento *in vitro*

Se hizo la distribución de la población en tratamientos cada uno con sus respectivas repeticiones con fines cualitativos, los mismos que se representan en porcentajes.

Multiplicación y enraizamiento

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

Modelo aditivo lineal

Se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Para:

$$i = 1, 2, 3, \dots, t \quad (\text{N}^\circ \text{ de tratamientos})$$

Dónde:

Y_i = Unidad experimental que recibe el tratamiento i (observación de la unidad experimental)

μ = Media general a la cual se espera alcanzar todas las observaciones (media poblacional)

τ_i = Efecto verdadero del i ésimo tratamiento

e_{ij} = Error experimental

a) Análisis de varianza

Se utilizó la técnica estadística de Análisis de Varianza o prueba de F (ANOVA), con 0,05 de margen de error de las fuentes de variabilidad de los tratamientos (nivel de significación).

Cuadro 08. ANOVA para el Diseño Completamente al Azar

FV	SC	GL	CM	Fo	p-value
Factor	SC_F	k-1	$CM_F=SC_F/k-1$	CM_F/CM_E	$P(F>F_o)$
Error	$SC_E=SC_T-SC_F$	N-k	$CM_E=SC_E/N-k$		
Total	SC_T	N-1			

Fuente: Elaboración propia.

3.5.2. Datos a registrar

a) Etapa de establecimiento *in vitro*

Todas las evaluaciones fueron realizadas cada 10 días desde la fecha de siembra.

Porcentaje de regeneración:

Se evaluó si las yemas se habían abierto mostrando una yema central activa, con presencia de hojas dispuestas a modo de roseta protegiéndola. Se obtendrá al dividir el número de explantes vivos y brotados entre el total de explantes multiplicados por 100.

Porcentaje de oxidación

Se evaluó la reacción de los explantes ante cualquier daño mecánico o químico que cause la liberación de radicales libres causando el cambio de color del explante a uno negro total o parcial, llegando a causar la muerte. Se calculó al dividir el número de explantes oxidados entre el total de explantes multiplicados por 100.

Porcentaje de contaminación por hongos

Se obtuvo al dividir el número de explantes que presentaran micelio sobre sí mismos o en el medio de cultivo, entre el total de explantes por 100.

Porcentaje de contaminación por bacterias

Se manifestó como una secreción de un mucilago generalmente blanquecino desde la base del explante, que cambia el color del medio y origina un olor desagradable, se dividirá el número de explantes contaminados entre el total de explantes por 100.

b) Etapa de multiplicación**Número de brotes**

Esta variable se estimó contabilizando el número de brotes, emitidos por el explante durante su desarrollo, a los 10, 20 y 30 días de su multiplicación.

Tamaño de explante después de la siembra

Esta evaluación se realizó a los 10, 20 y 30 días después de la siembra, se midió desde la base sobre el medio de cultivo hasta el ápice de la plántula, con la ayuda de papel milimetrado.

c) Etapa de enraizamiento**Presencia de raíz en las plántulas**

Se utilizó el método de la observación y conteo para determinar la presencia o ausencia de raíces en esta etapa. La evaluación se realizó en los 4 tratamientos a los 10, 20 y 30 días después de la multiplicación.

3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información**Técnicas e instrumentos bibliográficos****a) Fichaje**

Mediante este proceso se realizó la recopilación y extracción de datos importantes de las fuentes bibliográficas, tales como: artículos científicos, libros, internet y fuentes no bibliográficas; para la elaboración del marco teórico.

b) Análisis de contenido

Esta técnica fue usada para el análisis sistemático de documentos escrito, todo ello para la redacción del marco teórico.

c) Instrumentos bibliográficos

Bibliografía: tesis y libros.

Hemerográficas: revistas indizadas e internet.

d) Fichas de investigación

Resumen.

Textuales.

Comentarios.

e) Instrumentos de laboratorio

Manual de equipos.

Guías de laboratorio.

Protocolos.

f) Procesamiento de información

Los datos obtenidos serán procesados en una computadora usando programas para el procesamiento adecuado de los datos.

3.6. Materiales, equipos e insumos**Material biológico**

Morfotipo blanco de Kuyacsa.

Morfotipo rojo de Kuyacsa.

Materiales para la colecta

Cooler

Bolsa plástica ziplock

Tijera de podar

Etiquetas

Materiales de laboratorio

Frascos de vidrio de 99ml

Placas Petri

Vaso de precipitado

Frascos de vidrio de 250 ml

Mechero de Bunsen

Pinzas

Mango de bisturí n°4
Hojas de bisturí n° 22
Papel aluminio
Para film
Papel toalla
Mascarilla
Gorro
Cerillos

Equipos de laboratorio

Cámara de flujo laminar
Autoclave vertical
Destilador de agua
Balanza analítica electrónica
Estereoscopio
Horno microondas
Refrigeradora
Cámara fotográfica

Reactivos

Agar
Sales MS
Sacarosa / azúcar
BAP
ANA
Agua destilada
Hormonas

Materiales de desinfección

Hipoclorito de sodio
Alcohol de 96°
Alcohol de 70°
Detergente
Agua destilada

3.7. Conducción de la investigación

Con el objetivo de determinar el mejor protocolo de desinfección, tipo de explante y medio de cultivo para la micropropagación de los morfotipos blanco y rojo de kuyacsa se dividió en dos etapas:

3.7.1. Selección del material vegetal

- **Visita al jardín de colecta Kichki**

Esta especie fue recogida del jardín de colecta ubicado en Mitocucho a 2930 msnm, dicho jardín poseía los morfotipos blancos y rojos de la región Huánuco y Cajamarca. Para el presente trabajo solo se trabajó con los morfotipos procedentes de Huánuco. Se realizaron varias visitas con la finalidad de coleccionar el material necesario. Dentro de esta especie los dos morfotipos se diferencian principalmente por el color de flor y el color de tallos como se aprecia en la Figura 02.



Figura 02. Tallos, hojas y nudos del morfotipo blanco y rojo de kuyacsa.

- **Selección y recojo de la planta madre**

Se realizó la selección in situ de las poblaciones de kuyacsa morfotipo blanco y rojo con las mejores características de la especie, como: estado fisiológico, vigorosidad, libre de plagas, fuerza en las ramas y tallos.

Usando tijeras de podar se extrajeron los tallos de plantas, estas fueron colocadas en bolsas herméticas, para evitar la pérdida de humedad durante el traslado hasta las instalaciones del laboratorio de Biotecnología vegetal, posteriormente fueron rotuladas con datos como fecha de colecta, morfotipo y nombre de la especie.



Figura 03. Flores del morfotipo rojo en el jardín de colecta – Mitocucho, Kichki.



Figura 04. Flores del morfotipo blanco en el jardín de colecta – Mitocucho, Kichki.



Figura 05. Vista microscópica de las flores del morfotipo blanco y rojo de kuyacsa.

- **Traslado y acondicionamiento**

Las muestras que fueron traídas del campo se colocaron en una refrigeradora a 4°C, cada una de ellas en su respectiva bolsa hermética con los datos mencionados anteriormente. De este modo los explantes se mantienen frescos para poder realizar la introducción *in vitro*.



Figura 06. Muestras de los morfotipos blanco y rojo, con la rotulación respectiva.

3.7.2. Fase de laboratorio

a) Ensayos previos al establecimiento

Se realizó la revisión de diversas fuentes bibliográficas, al no encontrar información acerca de protocolos de desinfección *in vitro* de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl. se optó por realizar tres ensayos previos a la introducción *in vitro* definitiva. Con la finalidad de determinar que protocolo de desinfección es óptimo y el tipo de explante adecuado en cada morfotipo.

Ensayo uno:

Primero, para efectos de asegurar un adecuado proceso de establecimiento, se procedió con la esterilización y desinfección de los equipos y materiales necesarios de la sala de: preparación de medio de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó en este estudio fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se lo preparó de forma convencional, suplementado con fuente de carbono para lo cual se empleó la azúcar posteriormente se ajustó el pH, del medio de cultivo (a un rango de 5.6 a 5.8), luego se añadió Agar-agar como material de soporte, en una proporción de 0.60% p/v. La solución preparada se distribuyó en tubos de ensayo en un volumen de 20 ml/frasco y se procedió a sellarlos con papel aluminio para evitar el ingreso de algún microorganismo que se pudiese encontrar en el ambiente.

Para la esterilización de los materiales se utilizó la autoclave, en el cual se introdujo; el medio de cultivo anteriormente preparado; implementos y cristalería necesaria como mangos de bisturí, pinzas, cajas Petri y otros, para el efecto de esterilizado la autoclave alcanzo una temperatura de 121°C y 15 psi de presión.

Luego, se procedió a seccionar los tallos de kuyacsas, los cuales fueron previamente lavados con detergente suave, más agua destilada operación que se realizó fuera de la cámara de flujo laminar. Para la desinfección del material vegetal, se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol de acuerdo a los tratamientos de desinfección propuestas en

el Cuadro 03. Los mismos que fueron colocados en la plataforma de trabajo de la cámara de flujo laminar. En este mismo espacio, se situó materiales para la siembra (bisturí, mechero, pizas, caja Petri, tres vasos con agua estéril, algodón, Parafilm, mechero y otros). Todo el material dispuesto en la cámara de flujo laminar, fue irradiado con luz U.V. durante 15 minutos para su respectiva esterilización antes de la desinfección del material vegetal.

Luego de la desinfección superficial, se realizó la siembra de las yemas axilares y laterales cortándolos con el bisturí sobre la caja Petri en tamaños de 5 y 10 mm tratando de no dañarlas y usando la pinza se sembró en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), un explante por frasco, luego se flameó el contorno del frasco con el explante sembrado y se selló con Parafilm, una vez concluido este procedimiento, se rotuló los frascos con los siguientes datos: repetición y fecha de siembra, posteriormente se los traslado a la sala de incubación a 18 ± 2 grados centígrados, 16 horas luz a una intensidad lumínica de 1000 lux, por el espacio de 10 días.

Ensayo dos:

Después de observar los resultados obtenidos se hicieron cambios y reajustes de las propuestas de desinfección.

Nuevamente se repitieron los pasos anteriores de preparación de ambientes de trabajo, preparación de medios, esterilización de materiales, desinfección de material vegetal (kuyacsa) de acuerdo al Cuadro 04. Luego se realizó la siembra de los explantes de la misma manera descrita en el ensayo uno.

Ensayo tres:

Con los resultados obtenidos se optimizaron los tratamientos de desinfección, nuevamente se repitieron los pasos anteriores de preparación de ambientes de trabajo, preparación de medios, esterilización de materiales, desinfección de material vegetal (kuyacsa) de acuerdo al Cuadro 05. Luego se realizó la siembra de los explantes de la misma manera descrita en el ensayo uno y dos.

b) Introducción definitiva

Luego de haber realizado los ensayos y haber obtenido tratamientos de desinfección adecuados. Sufriendo un ligero cambio en los minutos de inmersión en NaClO, se obtuvieron los tratamientos detallados al Cuadro 06. Los tipos de explantes usados: yemas apicales y yemas axilares del tercio medio superior tomados de la planta madre.

Primero, para efectos de asegurar un adecuado proceso de establecimiento, se procedió con la esterilización y desinfección de los equipos y materiales necesarios de la sala de: preparación de medio de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó en este estudio fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual se lo preparó de forma convencional, suplementado con fuente de carbono para lo cual se empleó la azúcar posteriormente se ajustó el pH, del medio de cultivo (a un rango de 5.6 a 5.8), luego se añadió Agar-agar como material de soporte, en una proporción de 0.60% p/v. La solución preparada se distribuyó en tubos de ensayo en un volumen de 20 ml/frasco y se procedió a sellarlos con papel aluminio para evitar el ingreso de algún microorganismo que se pudiese encontrar en el ambiente.

Para la esterilización de los materiales se utilizó la autoclave, en el cual se introdujo; el medio de cultivo anteriormente preparado; implementos y cristalería necesaria como mangos de bisturí, pinzas, cajas Petri y otros, para el efecto de esterilizado la autoclave alcanzo una temperatura de 121°C y 15 psi de presión. (Figura 07)



Figura 07. Lavado y esterilización de materiales contaminados

Luego, se procedió a seccionar los tallos de kuyacsas, los cuales fueron previamente lavados con detergente suave, más agua destilada operación que se realizó fuera de la cámara de flujo laminar. Para la desinfección del material vegetal, se prepararon soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol de acuerdo a los tratamientos de desinfección propuestas en el Cuadro 06. Los mismos que fueron colocados en la plataforma de trabajo de la cámara de flujo laminar. En este mismo espacio, se situó materiales para la siembra (bisturí, mechero, pizas, caja Petri, tres vasos con agua estéril, algodón, Parafilm, mechero y otros). Todo el material dispuesto en la cámara de flujo laminar, fue irradiado con luz U.V. durante 15 minutos para su respectiva esterilización antes de la desinfección del material vegetal.

Luego de la desinfección superficial, se realizó la siembra de las yemas axilares y laterales cortándolos con el bisturí sobre la caja Petri en tamaños de 5 y 10 mm tratando de no dañarlas y usando la pinza se sembró en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), un explante por frasco, luego se flameó el contorno del frasco con el explante sembrado y se selló

con Parafilm, una vez concluido este procedimiento, se rotuló los frascos con los siguientes datos: repetición y fecha de siembra, posteriormente se los traslado a la sala de incubación a 18 ± 2 grados centígrados, 16 horas luz a una intensidad lumínica de 1000 lux, por el espacio de 10 días.



Figura 08. Preparación de ambientes, material vegetal y siembra.

c) Etapa de multiplicación y enraizamiento

En esta etapa de multiplicación se trabajó con dos tipos de medios, son los siguientes:

Medio de multiplicación A

MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB

Medio de multiplicación B

MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP

Para la preparación del ambiente y medio de cultivo se efectuó el mismo procedimiento que en la etapa anterior (Establecimiento *in vitro*) y la adición de las hormonas necesarias en cada medio.

Usando unas pinzas delgadas se sacaron las plántulas de los frascos sellados y cortaron en dos partes, una apical y otra basal. Se procedió a colocar un explante de cada morfotipo por frasco en los diferentes medios preparados, los instrumentos como pinzas y bisturí deben ser flameados entre cada corte para mantener la asepsia. Los frascos que contienen los explantes son tapados con papel aluminio y sellados con Parafilm. Cada uno tiene una etiqueta donde se indica el tratamiento y fecha para poder realizar las evaluaciones posteriores.

IV. RESULTADOS

4.1. Etapa de establecimiento *in vitro*

La etapa del establecimiento *in vitro* consiste en lograr pasar la barrera de contaminación y observar el crecimiento de algún órgano del explante por lo tanto se evaluó dos variables el tipo de explante por morfotipo y el protocolo de desinfección. Por lo tanto, es necesario determinar el tipo de explante y el protocolo adecuado que permita un óptimo desarrollo.

4.1.1. Ensayos previos a la introducción *in vitro*

4.1.1.1. Porcentaje de establecimiento

a) Primer ensayo

En la Figura 9 se observa que la yema axilar es el explante que logra mayor porcentaje de establecimiento (15 por ciento en el morfotipo blanco y 20 por ciento en el morfotipo rojo), seguido de la yema apical (5 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo).

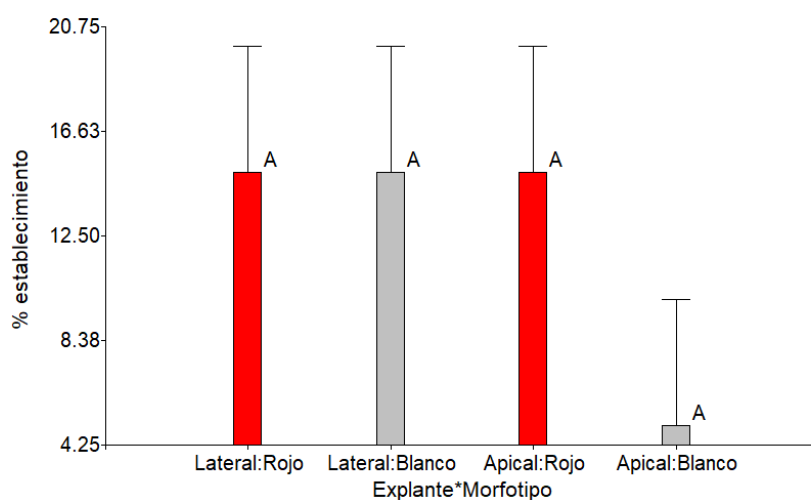


Figura 9. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el primer ensayo. (Blanco y Rojo).

b) Segundo ensayo

En la Figura 10 se muestra que la yema axilar es el explante que logra mayor porcentaje de establecimiento (45 por ciento en el morfotipo blanco y 50 por ciento en el morfotipo rojo), seguido de la yema apical (30 por ciento en el morfotipo blanco y 35 por ciento en el morfotipo rojo), en ambos casos se pudo observar el desarrollo de hojas.

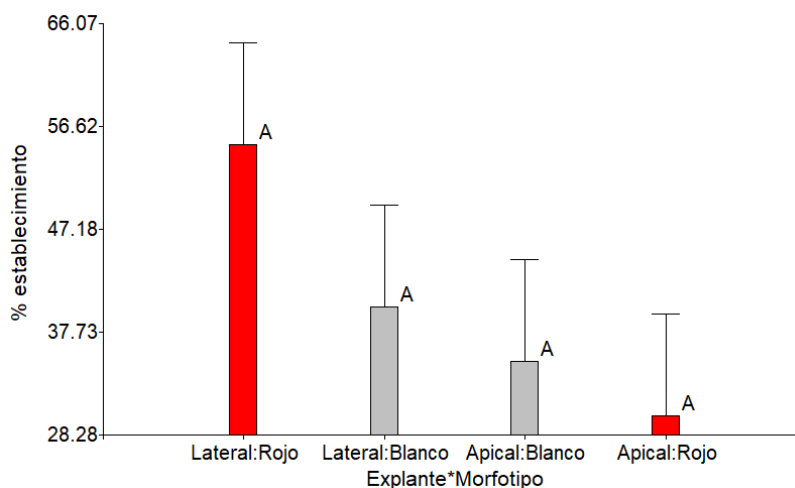


Figura 10. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el segundo ensayo. (Blanco y rojo).

c) Tercer ensayo

En la Figura 11 se aprecia que la yema axilar es el explante que logra mayor porcentaje de establecimiento (60 por ciento en el morfotipo blanco y 75 por ciento en el morfotipo rojo), seguido de la yema apical (45 por ciento en el morfotipo blanco y 50 por ciento en el morfotipo rojo), en ambos casos se pudo observar el desarrollo de hojas.

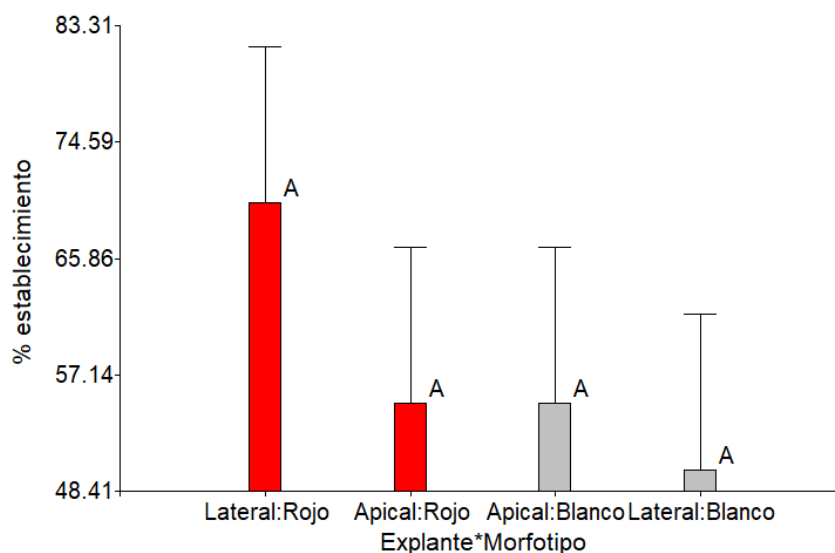


Figura 11. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y los morfotipos usados en el tercer ensayo. (Blanco y rojo).

4.1.1.2. Porcentaje de oxidación

a) Primer ensayo

En la figura 12 se muestra que las yemas apicales presentaron el mayor porcentaje de oxidación (15 por ciento en el morfotipo blanco y 5 por ciento en el morfotipo rojo) y finalmente de las yemas axilares (5 por ciento en el morfotipo blanco y 0 por ciento en el morfotipo rojo).

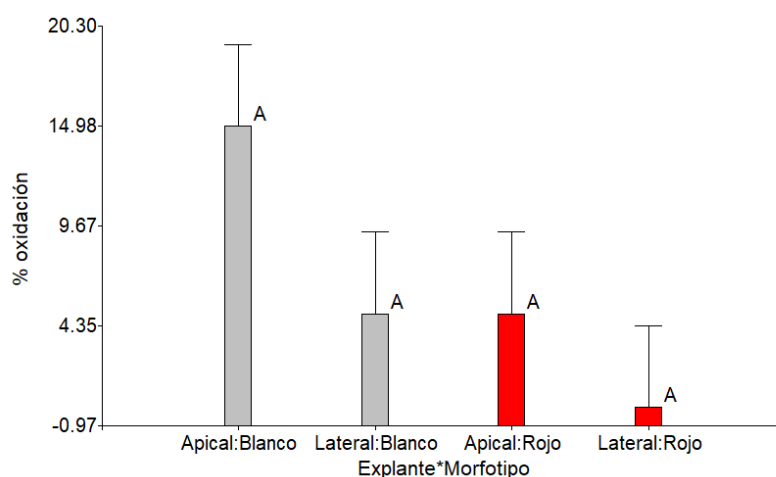


Figura 12. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).

b) Segundo ensayo

En la Figura 13 se observa que las yemas apicales presentaron el mayor porcentaje de oxidación (10 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo) y finalmente de las yemas axilares (0 por ciento en el morfotipo blanco y 5 por ciento en el morfotipo rojo).

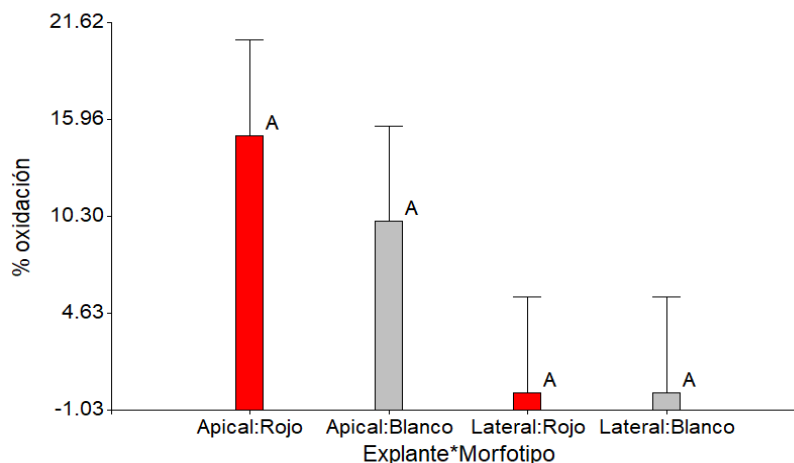


Figura 13. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).

c) Tercer ensayo

En la Figura 14 se aprecia que las yemas apicales presentaron el mayor porcentaje de oxidación (5 por ciento en el morfotipo blanco y 5 por ciento en el morfotipo rojo) y finalmente de las yemas axilares (0 por ciento en el morfotipo blanco y 0 por ciento en el morfotipo rojo).

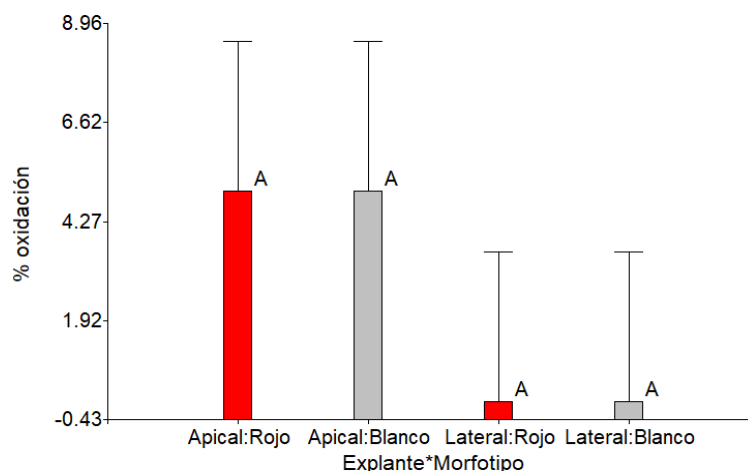


Figura 14. Respuesta en porcentaje de oxidación de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).

4.1.1.3. Porcentaje de contaminación por hongos

a) Primer ensayo

En la Figura 15 se muestra que el morfotipo blanco presento mayor contaminación (72.5 por ciento en el morfotipo blanco) versus el 62.5 por ciento que presento el morfotipo rojo. De igual modo se observó que las yemas apicales presentaron mayor grado de contaminación (75 por ciento en el morfotipo blanco y 70 por ciento en el morfotipo rojo) y luego las yemas axilares (70 por ciento en el morfotipo blanco y 55 por ciento en el morfotipo rojo).

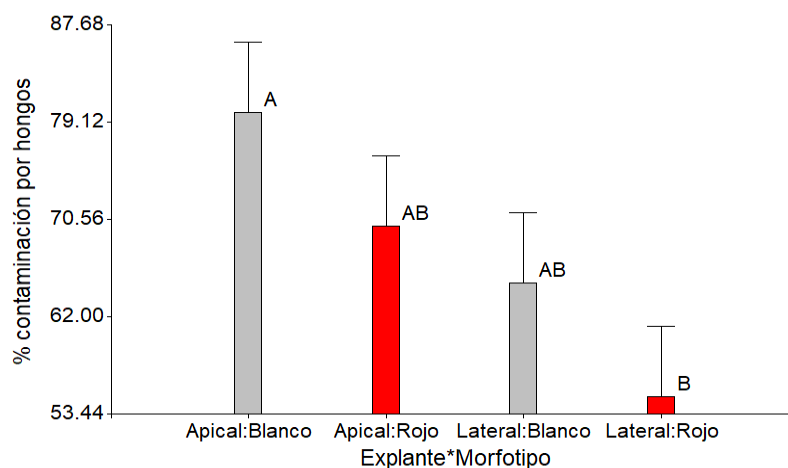


Figura 15. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).

b) Segundo ensayo

En la Figura 16 se aprecia que las yemas apicales presentaron mayor grado de contaminación (55 por ciento en el morfotipo blanco y 45 por ciento en el morfotipo rojo) y luego las yemas axilares (45 por ciento en el morfotipo blanco y 35 por ciento en el morfotipo rojo).

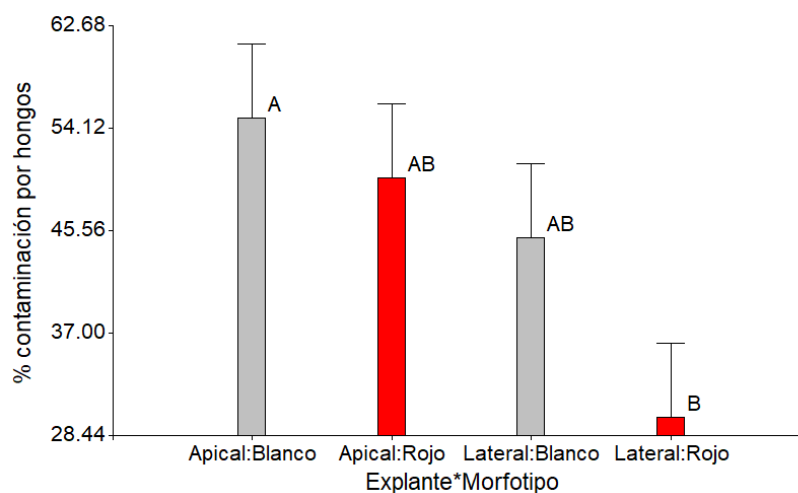


Figura 16. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).

c) Tercer ensayo

En la figura 17 se observa que las yemas apicales presentaron mayor grado de contaminación (55 por ciento en el morfotipo blanco y 45 por ciento en el morfotipo rojo) y luego las yemas axilares (45 por ciento en el morfotipo blanco y 35 por ciento en el morfotipo rojo) y luego las yemas axilares (35 por ciento en el morfotipo blanco y 20 por ciento en el morfotipo rojo).

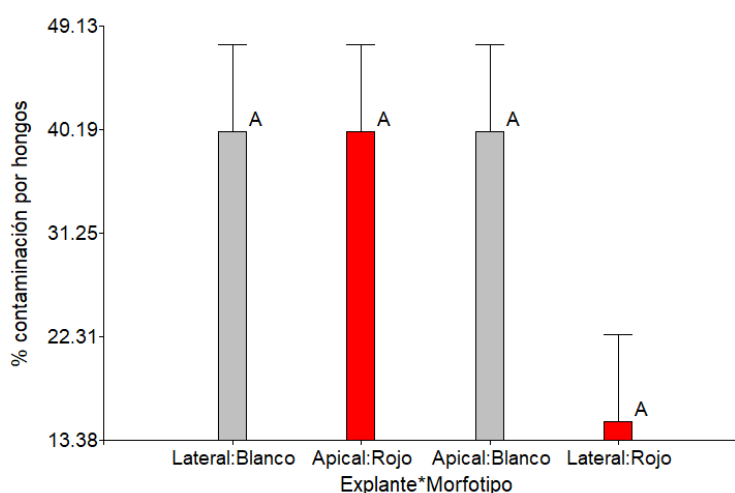


Figura 17. Respuesta en porcentaje de contaminación por hongos de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).

4.1.1.4. Porcentaje de contaminación por bacterias

a) Primer ensayo

En la Figura 18 se muestra que las yemas axilares presentaron una mayor incidencia de bacterias (5 por ciento en el morfotipo blanco y 25 por ciento en el morfotipo rojo), mientras que para las yemas apicales se observa menor incidencia de bacterias (5 por ciento en el morfotipo blanco y 15 por ciento en el morfotipo rojo).

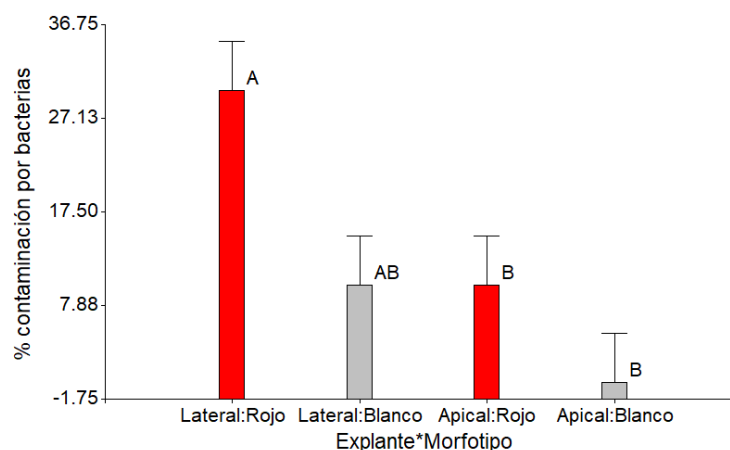


Figura 18. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el primer ensayo (blanco y rojo).

b) Segundo ensayo

En la figura 19 se aprecia que las yemas axilares presentaron una mayor incidencia de bacterias (10 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo), mientras que para las yemas apicales se observa menor incidencia de bacterias (5 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo).

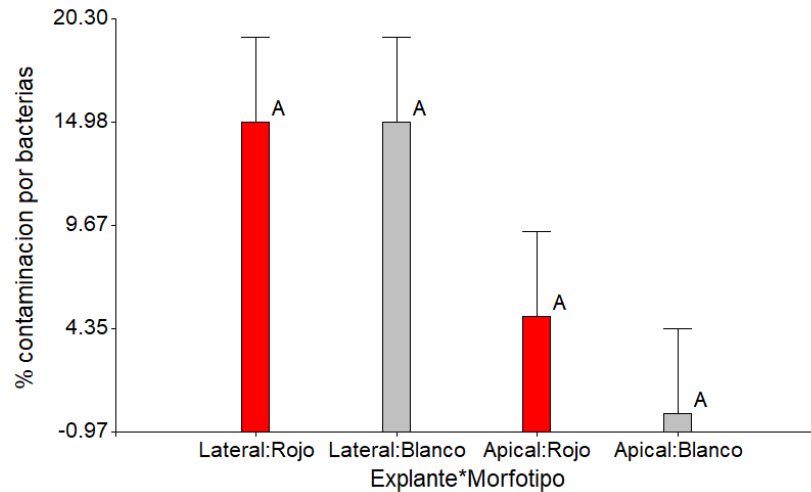


Figura 19. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el segundo ensayo (blanco y rojo).

c) Tercer ensayo

En la Figura 20 se observa que las yemas laterales presentaron una mayor incidencia de bacterias (10 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo), mientras que para las yemas apicales se observa menor incidencia de bacterias (5 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo).

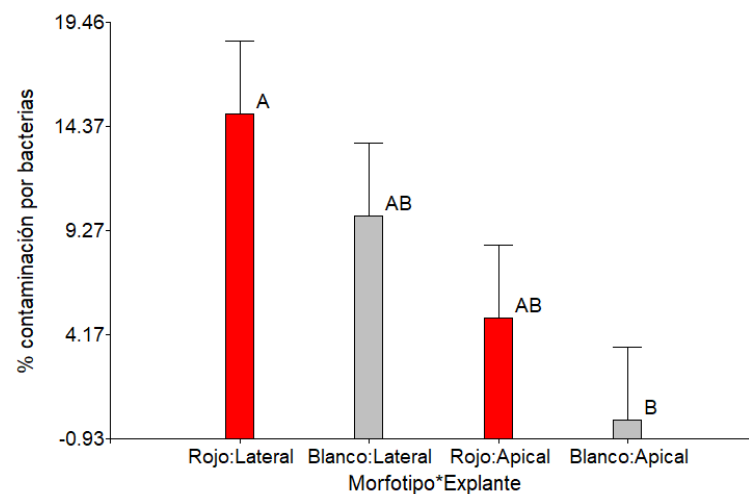


Figura 20. Respuesta en porcentaje de contaminación por bacterias de los explantes y morfotipos usados en el tercer ensayo (blanco y rojo).

4.1.1.5. Establecimiento in vitro

a) Porcentaje de establecimiento

Se confirma estadísticamente (Figura 21) que la yema axilar es el explante que logra mayor porcentaje de establecimiento (90 por ciento en el morfotipo blanco y 90 por ciento en el morfotipo rojo), seguido de la yema apical (85 por ciento en el morfotipo rojo y 80 por ciento en el morfotipo blanco), en ambos casos se pudo observar el desarrollo de hojas.

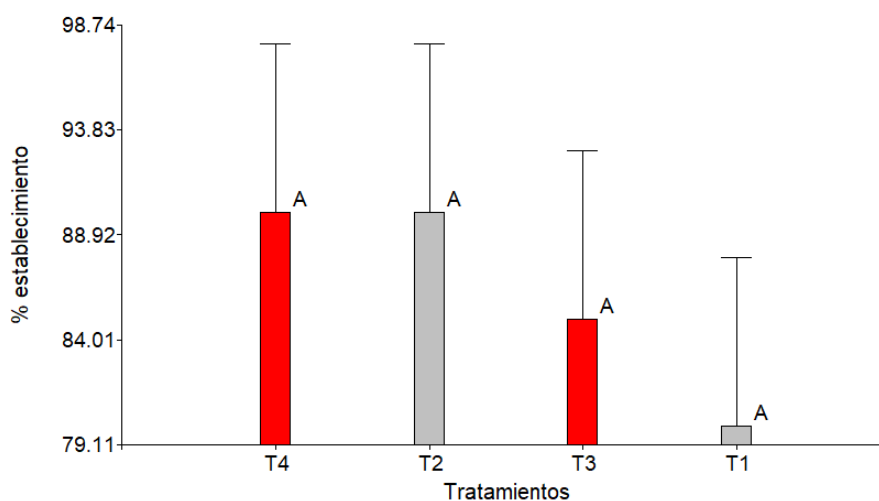


Figura 21. Respuesta en porcentaje de establecimiento de los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.

b) Porcentaje de oxidación

Los resultados obtenidos que los niveles de oxidación presentados en los tres ensayos previos fueron reducidos a la introducción definitiva fueron reducidos al 0 por ciento en los dos morfotipos y los 4 tratamientos usados.

c) Porcentaje de contaminación por hongos

En la Figura 22 se observa que las yemas apicales presentaron mayor grado de contaminación (15 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo) y luego las yemas axilares (10 por ciento en el morfotipo blanco y 10 por ciento en el morfotipo rojo). También se observa que los mayores resultados frente a los tratamientos de desinfección fueron obtenidos

por los tratamientos T1 (15 por ciento) y finalmente se logró menor contaminación con los T2, T3 y T4 (10 por ciento).

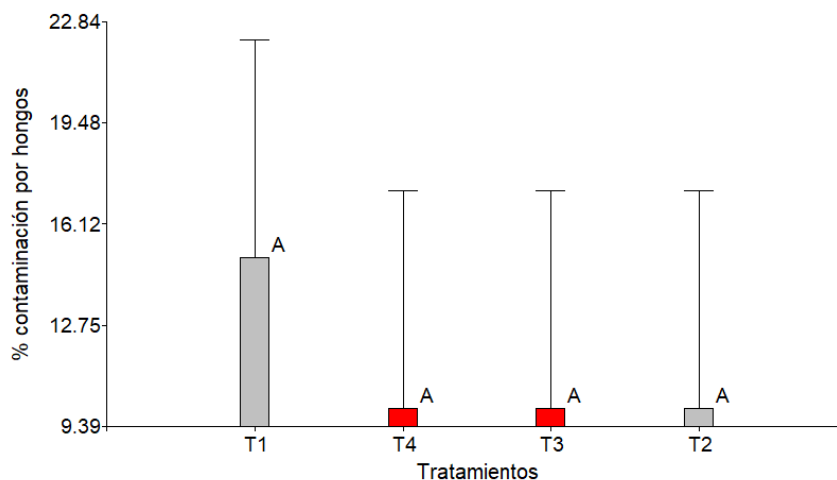


Figura 22. Respuesta en porcentaje de contaminación de hongos en los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.

d) Porcentaje de contaminación por bacterias

En la Figura 23 se muestra que las yemas apicales presentaron una mayor incidencia de bacterias (5 por ciento en el morfotipo blanco y 5 por ciento en el morfotipo rojo), mientras que para las yemas axilares se observa menor incidencia de bacterias (0 por ciento en ambos morfotipos)

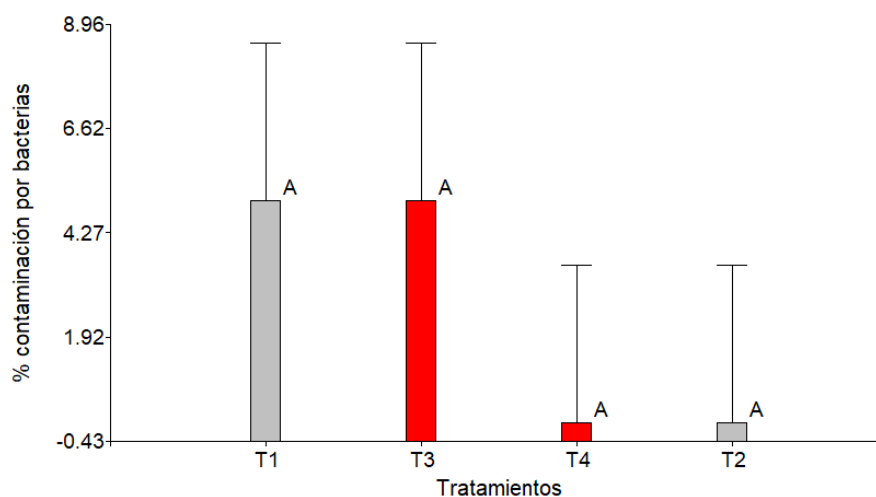


Figura 23. Respuesta en porcentaje de contaminación bacteriana en los tipos de explantes y tratamientos de desinfección usados en dos morfotipos de Kuyacsa.

4.2. Etapa de multiplicación

4.2.1. Número de brotes

a) Evaluación a los 10 días después de la siembra

Según el análisis de varianza general del número de brotes se aprecia que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Cuadro 09)

Cuadro 09. Análisis de Varianza para el número de brotes (10 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
N° de brotes	80	0.27	0.24	48.48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31.05	3	10.35	9.31	<0.0001
Tratamientos	31.05	3	10.35	9.31	<0.0001
Error	84.50	76	1.11		
Total	115.55	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 1.1118 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4	3.20	20	0.24	A
T3	2.10	20	0.24	B
T2	1.85	20	0.24	B
T1	1.55	20	0.24	B

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

Los resultados para el número de brotes a los 10 días (Figura 24) muestran que el morfotipo rojo tiene el mayor número de brotes (2.7%) en promedio, mientras que el morfotipo blanco tiene el menor número de brotes (1.8%) en promedio. También se observa que el mayor número de brotes fue conseguido con los T4 (3.2%) y T3 (2.1%), siendo superior al obtenido con los T2 (1.9%) y T1 (1.6%).

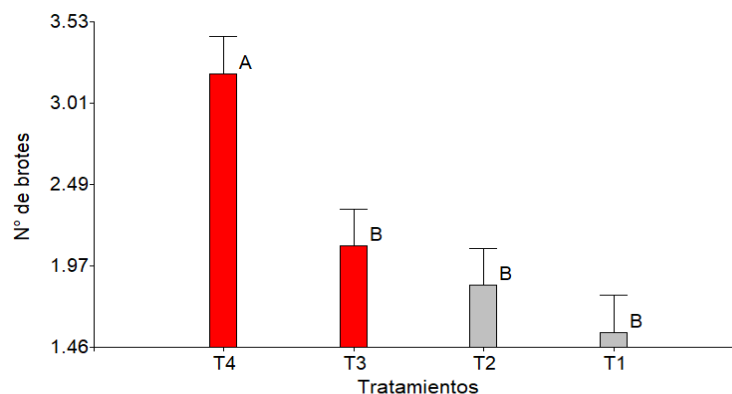


Figura 24. Respuesta en número de brotes por tratamiento.

b) Evaluación a los 20 días después de la siembra

Según el análisis de varianza general del número de brotes se aprecia que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Cuadro 10)

Cuadro 10. Análisis de Varianza para el número de brotes (20 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N° de brotes	80	0.25	0.22	45.85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	55.44	3	18.48	8.26	0.0001
Tratamientos	55.44	3	18.48	8.26	0.0001
Error	170.05	76	2.24		
Total	225.49	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 2.2375 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4	4.55	20	0.33	A
T3	3.40	20	0.33	B
T2	2.75	20	0.33	B C
T1	2.35	20	0.33	C

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

Los resultados para el número de brotes a los 20 días (Figura 25) muestran que el morfotipo rojo tiene el mayor número de brotes (4.0%) mientras que el morfotipo blanco tiene el menor número de brotes (2.6%). También se observa que el mayor número de brotes fue conseguido con los T4 (4.6%) y T3 (3.4%), siendo superior al obtenido con los T2 (2.8%) y T1 (2.4%).

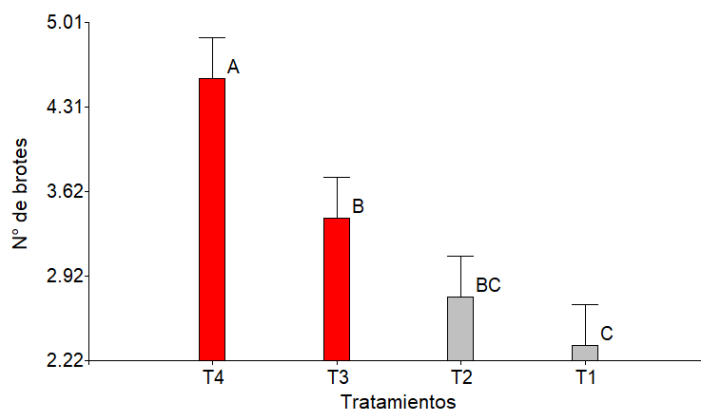


Figura 25. Respuesta en número de brotes por tratamiento.

c) Evaluación a los 30 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza para el número de brotes, se observa que solo hay diferencias significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05 (Cuadro 11)

Cuadro 11. Análisis de Varianza para el número de brotes (30 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N° de brotes	80	0.08	0.04	42.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31.84	3	10.61	2.12	0.1041
Tratamientos	31.84	3	10.61	2.12	0.1041
Error	379.65	76	5.00		
Total	411.49	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 4.9954 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Significancia
T4	6.20	20	0.50	A
T3	5.35	20	0.50	A B
T2	5.05	20	0.50	A B
T1	4.45	20	0.50	B

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

Los resultados para el número de brotes a los 30 días (Figura 26) muestran que el morfotipo rojo tiene el mayor número de brotes en promedio (5.8%) mientras que el morfotipo blanco tiene el menor número de brotes en promedio (4.8%). También se observa que el mayor número de brotes fue conseguido con los T4 (4.6%) y T3 (3.4%), siendo superior al obtenido con los T2 (2.8%) y T1 (2.4%).

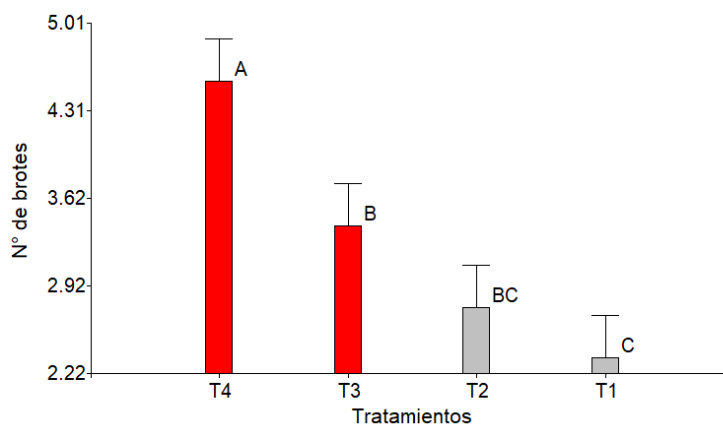


Figura 26. Respuesta en número de brotes por tratamiento.

4.2.2. Longitud de brotes

a) Evaluación a los 10 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza para la longitud de brotes, se observa que solo hay diferencias significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05 (Cuadro 12)

Cuadro 12. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (10 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud de explante	80	0.25	0.22	42.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	29.30	3	9.77	8.32	0.0001
Tratamientos	29.30	3	9.77	8.32	0.0001
Error	89.17	76	1.17		
Total	118.47	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 1.1733 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Significancia
T4	3.53	20	0.24	A
T3	2.40	20	0.24	B
T2	2.31	20	0.24	B
T1	1.90	20	0.24	B

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

Los resultados para la longitud de brotes a los 10 días (Figura 27) muestran que la mayor longitud de brotes se logró con los T4 (3.5 cm en promedio) y T3 (2.4 cm en promedio), siendo superior al obtenido con los T2 (2.3 cm en promedio) y T1 (1.9 cm en promedio).

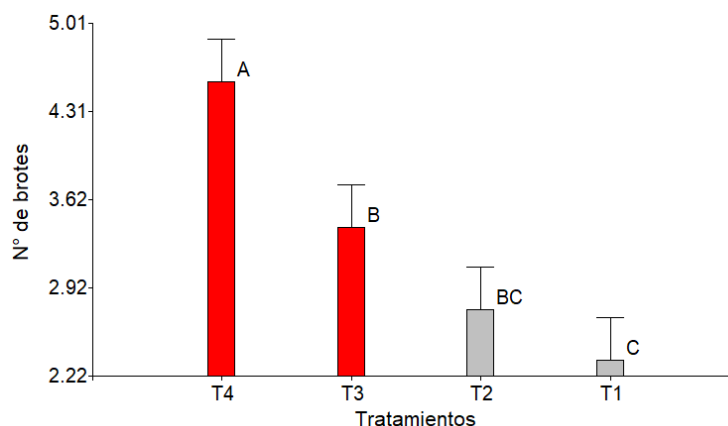


Figura 27. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.

b) Evaluación a los 20 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza para la longitud de brotes, se observa que solo hay diferencias significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05. (Cuadro 13)

Cuadro 13. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (20 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud de explante	80	0.25	0.22	42.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	69.42	3	23.14	8.25	0.0001
Tratamientos	69.42	3	23.14	8.25	0.0001
Error	213.17	76	2.80		
Total	282.58	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 2.8048 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4	5.27	20	0.37	A
T3	4.13	20	0.37	B
T2	3.74	20	0.37	B
T1	2.66	20	0.37	C

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

Los resultados para la longitud de brotes a los 20 días (Figura 28) muestran que la mayor longitud de brotes se logró con los medios T4 (5.3cm en promedio) y T3 (4.2 cm en promedio), siendo superior al obtenido con los T2 (3.7 cm en promedio) y T1 (2.7 cm en promedio).

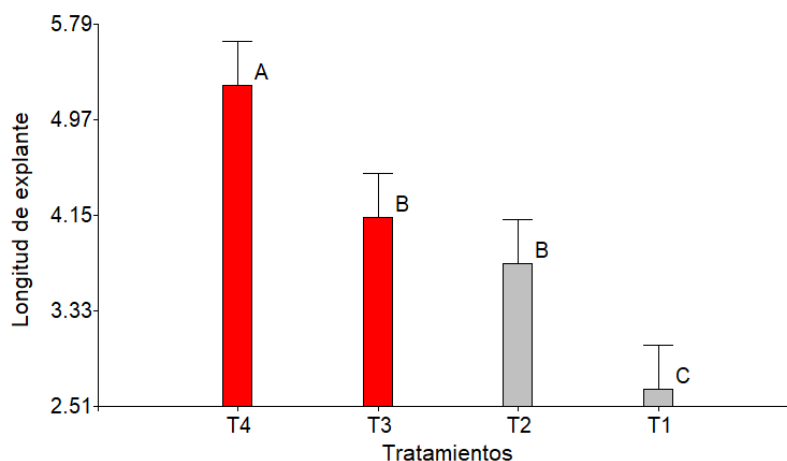


Figura 28. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.

c) Evaluación a los 30 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza para la longitud de brotes, se observa que solo hay diferencias significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05. (Cuadro 14)

Cuadro 14. Análisis de Varianza para la longitud de brotes (30 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud de explante	80	0.16	0.13	42.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	75.32	3	25.11	4.84	0.0039
Tratamientos	75.32	3	25.11	4.84	0.0039
Error	393.91	76	5.18		
Total	469.22	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 5.1830 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Letra
T4	6.90	20	0.51	A
T3	5.24	20	0.51	B
T2	5.10	20	0.51	B
T1	4.21	20	0.51	B

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

Los resultados para la longitud de brotes a los 30 días (Figura 27) muestran que la mayor longitud de brotes se logró con los T4 (6.9 cm en promedio) y T3 (5.2 cm en promedio), siendo superior al obtenido con los T2 (5.1 cm en promedio) y T1 (4.2 cm en promedio).

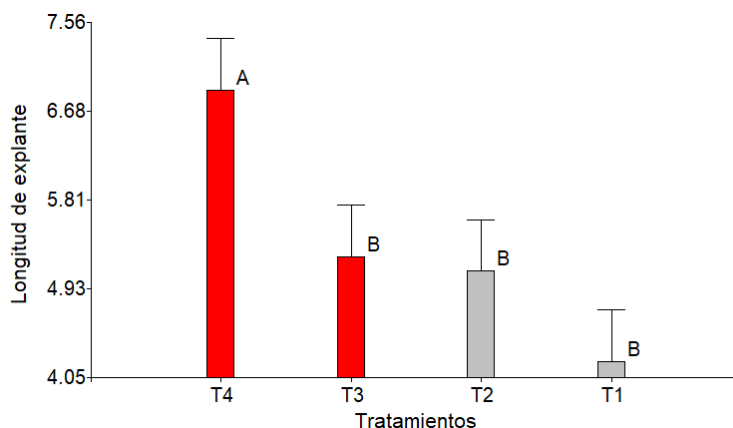


Figura 29. Respuesta en longitud de brotes por tratamiento.

4.2.3. Número de raíces

a) Evaluación a los 10 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza para el número de raíces, se observa que solo hay diferencias muy significativas en todas las fuentes de variación, a un nivel de significancia de 0.05 (Cuadro 15)

Cuadro 15. Análisis de Varianza para el número de raíces (10 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nº de raíces	80	0.03	0.00	229.52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.32	3	0.11	0.76	0.5221
Tratamientos	0.32	3	0.11	0.76	0.5221
Error	10.57	76	0.14		
Total	10.89	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.1391 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.
T4	0.24	17	0.09 A
T3	0.22	23	0.08 A
T2	0.10	20	0.08 A
T1	0.10	20	0.08 A

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

En la figura 30 se observa que el mayor número de raíces se logró con los T4 (0.3 raíces en promedio) y T3 (0.2 raíces en promedio), siendo superior al obtenido con los T2 (0.1 raíces en promedio) y T1 (0.1 raíces en promedio).

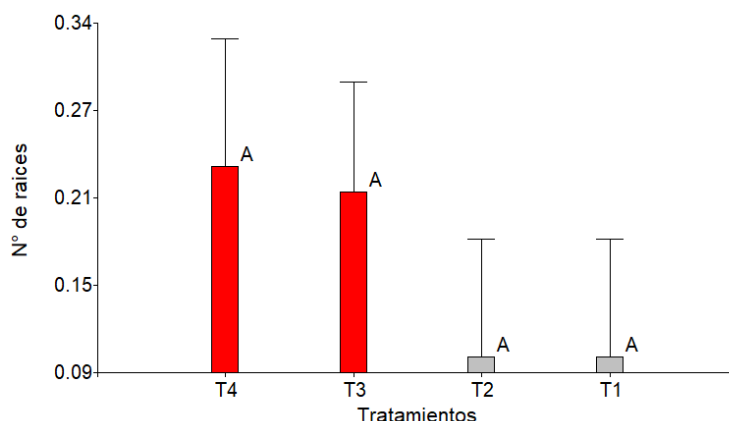


Figura 30. Respuesta en número de raíces por tratamiento.

b) Evaluación a los 20 días después de la siembra

Según al análisis de varianza general del número de raíces se aprecia que todas las fuentes de variación presentan diferencias muy significativas a un nivel de significancia de 0.05. (Cuadro 16)

Cuadro 16. Análisis de Varianza para el número de raíces (20 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N° de raíces	80	0.67	0.65	55.72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	588.79	3	196.26	50.88	<0.0001
Tratamientos	588.79	3	196.26	50.88	<0.0001
Error	293.16	76	3.86		
Total	881.95	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 3.8573 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	Letra
T4	6.94	17	0.48	A
T3	5.65	23	0.41	B
T2	0.90	20	0.44	C
T1	0.80	20	0.44	C

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

En la figura 31 se observa que el mayor número de raíces se logró con los T4 (6.7 raíces en promedio) y T3 (5.8 raíces en promedio), siendo superior al obtenido con los T2 (0.9 raíces en promedio) y T1 (0.8 raíces en promedio).

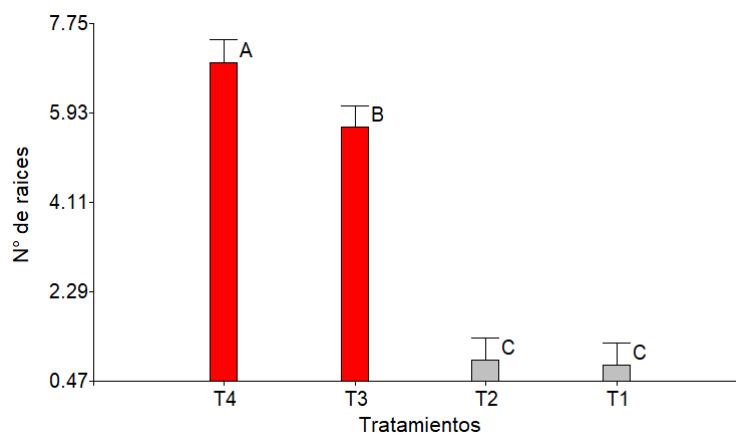


Figura 31. Respuesta en número de raíces por tratamiento.

c) Evaluación a los 30 días después de la siembra

De acuerdo al análisis de varianza general del número de raíces se aprecia que todas las fuentes de variación presentan diferencias muy significativas a un nivel de significancia de 0.05 (Cuadro 17). Pero se observa la diferencia entre las evaluaciones realizadas anteriormente, siendo este el Cv más bajo entre los tres cuadros mostrados.

Cuadro 17. Análisis de Varianza para el número de raíces (30 días)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N° de raíces	80	0.43	0.40	53.37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	403.03	3	134.34	18.77	<0.0001
Tratamientos	403.03	3	134.34	18.77	<0.0001
Error	543.96	76	7.16		
Total	946.99	79			

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 7.1574 gl: 76

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T4	8.53	17	0.65	A
T3	5.91	23	0.56	B
T2	3.55	20	0.60	C
T1	2.45	20	0.60	C

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

Como se observa en la figura 32, el mayor número de raíces se logró con los T4 (8.3 raíces en promedio) y T3 (5.8 raíces en promedio), siendo

superior al obtenido con los T2 (3.6 raíces en promedio) y T1 (2.5 raíces en promedio).

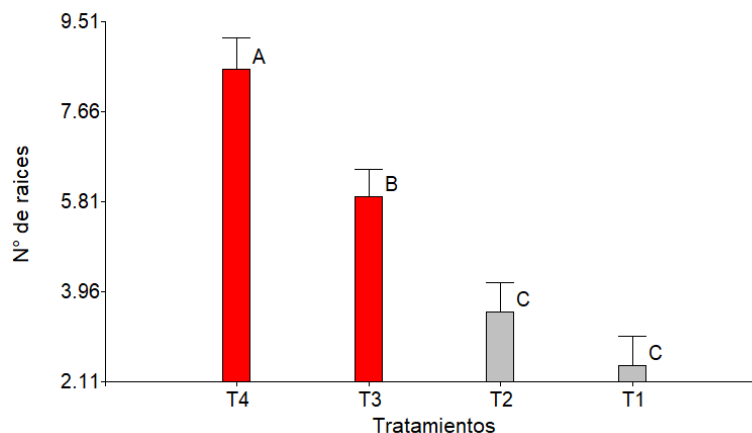


Figura 32. Respuesta en número de raíces por tratamiento.

4.2.4. Comparación de promedios generales para determinar el mejor tipo de explante y medio de multiplicación.

Considerando los tipos de explantes usados, apical y basal, ambos tipos de explantes fueron sembrados en dos diferentes medios de cultivo. Con el objetivo de determinar el explante ideal en la etapa de multiplicación se evaluó el número de brotes, longitud de brote. Durante la etapa de enraizamiento se evaluó el número de raíces presentes en las plántulas, los resultados nos muestran que el T4, donde se usó un explante basal del morfotipo rojo multiplicado en el medio de papa, tiene mayor número de brotes, longitud de brotes y número de raíces que los otros tratamientos usados. Estos datos ratifican que es el explante ideal para la etapa de multiplicación y enraizamiento directo.

Cuadro 18. Comparación de promedios generales para determinar el mejor explante y medio de cultivo en las etapas de multiplicación y enraizamiento.

Trat	Medios de Cultivo	Explante	Número de brotes	Longitud de brotes	Número de raíces
T1	MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP	Yema Apical	4.5	4.2cm	2.5
T2	MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB	Yema Basal	5.1	5.1cm	3.6
T3	MS + 0,02 mg L-1 de ANA + 0,03 mg L-1 de BAP	Yema Apical	5.4	5.2cm	5.8
T4	MS + 0.01 mg L-1 de ANA + 0.03mg L-1 de AIB	Yema Basal	6.2	6.9cm	8.3

Fuente: Elaboración propia.

4.2.5. Vías de regeneración morfogénica de los dos morfotipos de kuyacsa.

Los resultados que se detallan a continuación son preliminares, debido a que las diversas concentraciones de hormonas influirían en las vías de regeneración.

Treinta días después de haber realizado la multiplicación de los morfotipos blanco y rojo. Se pudo observar la aparición de pequeñas protuberancias en tallos provenientes del morfotipo blanco, que estaban sumergidos en medio de cultivo. Las muestras fueron observadas con la ayuda de un estereoscopio, pudiéndose observar callos en desarrollo. En los siguientes días pequeñas raíces emergían provenientes del callo. Cabe resaltar que no todas las unidades experimentales del morfotipo blanco desarrollan callos al mismo tiempo e incluso algunas no necesitan de un callo para tener algunas raíces. Siendo esto un caso aislado. La vía de regeneración viene a ser la callogénesis.

En cuanto al morfotipo rojo se observó la presencia de raíces desde los 10 días de haber realizado la multiplicación, no se registró el desarrollo de callos en ninguna unidad experimental de este morfotipo. Por otro lado, las raíces que desarrollan son abundantes y largas ayudando a desarrollar plántulas más fuertes con mayor número de hojas y entrenudos. La vía de regeneración es la organogénesis directa.

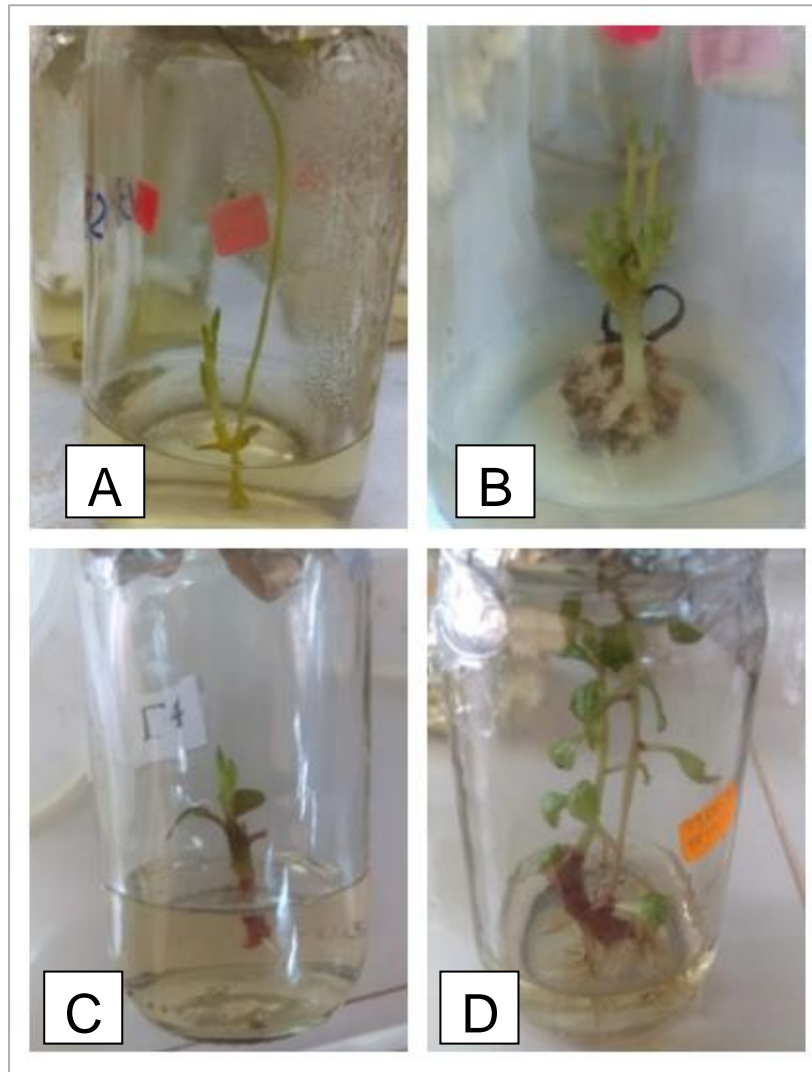


Figura 33. En la imagen A se observa una plántula del morfotipo blanco sin la presencia de callos, en la imagen B se observa el callo desarrollado. En la imagen C el morfotipo rojo tiene una raíz en desarrollo y en la imagen D se muestra el sistema radicular desarrollado.

V. DISCUSIÓN

Debido a que es una especie poco estudiada en el área de Biotecnología Vegetal, los antecedentes son escasos por este motivo se recurre a especies emparentadas, misma familia, para realizar la discusión sobre los resultados obtenidos.

5.1. Establecimiento *in vitro*

En el trabajo de Sistema de Regeneración y transformación en *Mirabilis Jalapa* realizado por Zaccari M. *et al.* (2007), menciona que, uso semillas que fueron esterilizadas con una solución de Hipoclorito de Sodio al 3% y 3,3 ml ácido clorhídrico, para posteriormente ser germinadas en Medio Murashigue & Skoog (1962), que contiene vitaminas B5 obteniendo plántulas vigorosas. Todo esto se logró a partir de semillas de plantas sembradas en un invernadero.

En comparación con mi trabajo, logré el establecimiento *in vitro* a partir de yemas tanto apicales como axilares de dos morfotipos (blanco y rojo) de *Mirabilis Expansa* en lugar de usar semillas, en este caso se usaron soluciones de Hipoclorito de Sodio con diferentes concentraciones y tiempos de inmersión, una solución de Hipoclorito de Sodio al 2.5% durante dos tiempos de inmersión diferentes, del mismo modo fueron sembradas en Medio Murashigue & Skoog (1962).

5.1.1. Supervivencia de explantes

Al realizar la comparación del protocolo usado para *Mirabilis Jalapa* y *Mirabilis Expansa* se observó que, la eficiencia de regeneración depende del tipo de planta – flores blancas o moradas – utilizadas como fuente de explantes. En ambos casos el morfotipo rojo es menos exigente que el morfotipo blanco, así mismo tiene más resistencia a un mayor tiempo de inmersión en la solución de Hipoclorito de Sodio empleada para desinfectar, también tiene un mejor desarrollo en cuanto a número de brotes, longitud de brote y número de raíces. En el caso del morfotipo blanco necesita mayor

cuidado al realizar la inmersión en la solución de NaClO, de igual modo al realizar la siembra porque es muy sensible al calor proveniente de las pinzas por este motivo las pinzas deben ser sumergidas en agua destilada estéril frío después de ser flameadas en el mechero.

Como se ratifican en los resultados obtenidos por Zaccai *et al.* (2007), en el cultivo *in vitro* de *Mirabilis jalapa* a partir de semillas, señala que los resultados se obtuvieron tres semanas después de haber realizado la siembra, en un ambiente con una temperatura constante de 23 °C y 16 horas de luz blanca. En el caso de la *Mirabilis expansa* los resultados pueden ser observados desde los diez días en algunos explantes, pero a partir de las dos semanas en la mayoría de los explantes, siendo incubados a una temperatura de 19 – 20 °C y 16 horas de luz blanca.

5.2. Multiplicación y enraizamiento

La kuyacsa en estado silvestre prospera adecuadamente en suelos con escasa material orgánico. El morfotipo rojo es más rustico que el morfotipo blanco, por ese motivo para el cultivo *in vitro* del morfotipo blanco es conveniente emplear un medio enriquecido. Debido a la ausencia de información acerca de los medios de cultivo para multiplicar Kuyacsa se optó por emplear medio para papa con diferentes concentraciones de hormonas, debido a que son cultivos andinos con ciertas similitudes.

En lo referente a la multiplicación de brotes se utilizaron explantes provenientes de los tratamientos de la fase de establecimiento, para evaluar el número de brotes, empleándose dos medios de multiplicación **A**: MS + 0.01 mg L⁻¹ de ANA + 0.03mg L⁻¹ de AIB y **B**: MS + 0,02 mg L⁻¹ de ANA + 0,03 mg L⁻¹ de BAP, considerando que los explantes fueron tallos con dos nudos y callos en el caso del morfotipo blanco; dos y tres nudos procedentes del morfotipo rojo, no se tiene información acerca de otro trabajo de investigación para poder comparar los resultados obtenidos.

En caso del morfotipo rojo no se necesitó emplear medios de enraizamiento porque las raíces se desarrollaron de manera exitosa y abundante con los medios empleados en la etapa de multiplicación. El

morfotipo blanco necesita más tiempo para desarrollar raíces, que son escasas.

Según Kio Ling *et al.* (2009) es mejor incubar los callos de *Mirabilis jalapa* a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo luz con una intensidad aproximada de 2000 Lux proveniente de fluorescentes de luz blanca por 16 horas diarias, donde los callos tienen mejor desarrollo y después de 18 días de cultivo se tienen callos jóvenes y friables listos para ser transferidos en un mejor medio de inducción (1/2 MS suplementado con $20.0\ \mu\text{M}$ picloram) y tres sub cultivos más cada uno en intervalos de dos semanas.

Esto difiere de los resultados obtenidos en este caso con *Mirabilis expansa* morfotipo blanco, donde los callos fueron sometidos a $18\pm 2\ ^{\circ}\text{C}$, 16 horas luz a una intensidad lumínica de 1000 lux, como resultado los callos no se desarrollaron adecuadamente debido a la falta de transferencia a un medio enriquecido y los respectivos sub cultivos.

VI. CONCLUSIONES

a) Es uno de los primeros trabajos que se realiza para la estandarización de protocolos de micropropagación de *Mirabilis Expansa*, usando dos morfotipos.

b) El explante ideal en la etapa de establecimiento *in vitro* de *Mirabilis expansa* morfotipo blanco y rojo, es la yema axilar.

c) El explante ideal en la etapa de multiplicación y enraizamiento de *Mirabilis expansa* morfotipo blanco y rojo, es la parte basal de las plántulas provenientes del establecimiento *in vitro*.

d) El mejor protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Mirabilis expansa* morfotipo blanco es el que corresponde al **P3**: Inmersión en NaClO al 2.9% durante 5', tres enjuagues con agua destilada estéril por 5' cada uno.

e) El mejor protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Mirabilis expansa* morfotipo rojo es el que corresponde al **P8**: Inmersión en NaClO al 2.9% durante 10', tres enjuagues con agua destilada estéril por 5' cada uno.

f) Se requiere dos subcultivos porque en la etapa de introducción los explantes exigen muchos nutrientes y se realizaron cada 15 días. Los medios de subcultivo fueron los mismos que se emplearon en el cultivo inicial.

g) El número de brotes y longitud de explantes de *Mirabilis expansa* morfotipo blanco, durante la etapa de multiplicación, es influenciado positivamente por el medio de cultivo usado, pero se requiere de una cantidad más alta hormonas para el desarrollo óptimo.

h) El número de brotes y longitud de explantes de *Mirabilis expansa* morfotipo rojo es superior al morfotipo blanco, al ser más resistente y rustico tiene un mejor desarrollo.

i) En base a los resultados preliminares obtenidos, para conocer las vías de regeneración es necesario realizar estudios con diferentes dosis de fitohormonas y la presencia de un testigo.

j) Aparentemente, el morfotipo blanco necesita formar callos para poder generar pequeñas raíces, por ese motivo se requiere otro medio de enraizamiento con mayor concentración de hormonas.

k) Aparentemente, el morfotipo rojo no requiere de un medio de enraizamiento debido a que el medio de multiplicación le proporciona los nutrientes necesarios para la formación de estas.

l) La tasa de multiplicación más alta es obtenida por el morfotipo rojo, donde se usó explantes procedentes de la parte basal de las plántulas, obteniendo plantas más vigorosas y saludables.

m) En la etapa de multiplicación un tratamiento sobresale más que otro, pero a nivel de promedio no hay diferencia. Es necesario la presencia de un testigo para realizar las comparaciones correspondientes con los tratamientos.

n) Aparentemente la vía de morfogenética de regeneración durante la etapa de enraizamiento para el morfotipo blanco es la callogénesis, mientras que, para el morfotipo rojo es la organogénesis.

o) La incubación de plántulas *in vitro*, debe ser en un ambiente con una temperatura entre 18°C y 21°C y con 10 horas luz.

p) La multiplicación masiva mediante el cultivo *in vitro* de kuyacsa facilitará el repoblamiento de esta especie en las diversas provincias de la Región Huánuco.

VII. RECOMENDACIONES

a) Realizar ensayos previos cuando se trabaja con especies nativas que no poseen un protocolo de desinfección establecido porque muchas veces solo se dispone que una cantidad limitada de plantas que puedan proveer el explante necesario.

b) Continuar con los trabajos de investigación en kuyacsa, porque es una especie nativa que está siendo relegada por cultivos más rentables y de mayor aceptación en el mercado local. Al continuar con los trabajos de investigación podemos ayudar a la conservación y revalorización de esta maravillosa especie nativa.

c) Estudiar el cultivo de callos del morfotipo blanco, la transferencia a mejores medios dónde pueda desarrollarse de manera óptima y los sub cultivos para obtener resultados positivos.

d) Estudiar la cadena de comercialización y el valor en el mercado de esta especie.

e) Es recomendable realizar la etapa de aclimatación, que por cuestiones de tiempo no se realizó.

f) Realizar el cultivo *in vitro* de los otros morfotipos existentes, para evitar la pérdida o extinción de esta especie.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar *et al.* 2010. Organogénesis y Embriogénesis Somática en “Te nurite” (*Satureja macrostema* Brenth Briq.) (En línea). Consultado 20 feb. 2020. Disponible en: <https://bit.ly/3myoUXf>
- Ayala, G. 2004. Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación; Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Centro Internacional de la Papa, CIP. Lima, Perú. p. 101-112.
- Barrera, V; Tapia, C. y Monteros, A. (eds.). 2004. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). (En línea). Quito, Ecuador - Lima, Perú. 176 p. consultado 17 de ago. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3dK4S8p>
- Boutherin, D. y Bron, G. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 292 p.
- Bushway, L; Pritts, M; Handley, D. 2008. The Raspberry & Blackberry Production Guide. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service. 3–6 p.
- Castillo, A. S.f. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo (en línea). Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Consultado 02 oct. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3d4647z>
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1995. Programa colaborativo de biodiversidad de raíces y tubérculos andinos. La Molina. Perú (en línea). Consultado 20 feb. 2019. Disponible en <https://bit.ly/2v7zIC9>
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 1999. Manual del CIP: Cultivo de Tejidos.90 p.

- CIPOTATO (International Potato Center). 2014. Achira y Mauka. Raíces y tubérculos andinos (en línea). Consultado 5 Feb. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3dRD7eh>
- Díaz, J. *et al.* 2005. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. *Horticultural Reviews*. 277 p.
- Domínguez, V. 2002. Usos medicinales de la familia *Labiatae* en Chiapas, México. 31 p. (En línea). Consultado 28 ene. 2020. Disponible en <https://bit.ly/3dJCm6Y>
- Escandón, AS. *et al.* 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Hibr.). Una arbustiva de relevancia ornamental. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, abril 2003, vol. 32, N° 1, 111-122 p.
- Flores, HE. *et al.* (2003) Andean Root and Tuber Crops: Underground Rainbows. *Hort Science* 38(2): 161-167 p. (En línea). Consultado 29 ene. 2020. Disponible en: <https://bit.ly/3gkKnlv>
- García, F. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 650 p.
- Gendall, H. 2017. Biocultural diversity conservation and the case of the “lost” Andean crop (*Mirabilis expansa*) (Ruiz y Pav.) Standley). Tesis de Maestría, Universidad de Copenhagen Dinamarca.
- Hartmann, HT. y Kester, D. 1995. Propagación de plantas, Principios y práctica. 4ta Ed. México D.F, Compañía editorial de México. 755 p.
- Klášková, T y Fernández, CE. 2011. Mauka – a Promise for fighting with the unbalanced nutrition of high Andean Regions. Czech Republic. Institute of Tropics and Subtropics. Vol. 44(1) 37 - 40 p.
- Larco, ME. 2019. Fenología floral del cultivo de miso (*Mirabilis expansa*) según la escala Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie (BBCH) como base para mejorar la

productividad. Ecuador. Tesis para optar al grado de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos. Universidad de las Américas.

Lindsey, K. y Jones, M.G. 1989. Biotecnología vegetal agrícola. Zaragoza: España. ACRIBIA S.A. 370 p.

López. 2010. Introducción de una nueva metodología para la esterilización de los medios de cultivo. Tesis en opción al grado científico de Máster en Biotecnologías Vegetal. IBP. Santa Clara.

Montenegro, LF. Y Franco S. 1988. Evaluación de nutrientes en tres variedades de *Mirabilis expansa* "Chago". En: Memorias del VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos, INIAP, Quito, Ecuador. p. 268-273

Moreno, M. y Oropeza, M. 2017. Efectos de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de micro tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.), Colombia (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología Vol. XIX N°2, 29-37 p. Consultado 30 ene. 2020. Disponible en: <https://bit.ly/3uBiEkm>

NRC (National Research Council). 1989. Lost crops of the Incas: Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington D.C.: National Academy Press.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). S.f. Biotecnología de tubérculos y raíces andinas (en línea). Consultado 1 mar. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3fPof2y>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 1992. Cultivo Marginados, otra perspectiva de 1942 (en línea). Consultado 1 mar. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3ebDss9>

Pedroza, J. (2008). Aplicaciones del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Perea, D., Tirado, P. 2011. Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*: Manual de Practicas de Laboratorio. Edit. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.160 p.

- Pierik, R. 2007. *In vitro* culture of higherplants. Editorial Marinus Nijhoff Publishers. Ediciones Mundi-Prensa. España. 120 p.
- Rea, J. 1982. El Miso Una Contribución de la Agricultura Pre-Inca de Ecuador y Bolivia. Desde el Surco 5: 23-26 p.
- Rea, J. 1994. Andean roots. In: JE Hernández-Bermejo, and J León (Eds.) Neglected crops: 1492 from a different perspective. FAO-UN, Rome, and Botanical Garden of Córdoba, Andalucía, España, Consultado 10 Feb. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3cZgOUD> y <https://bit.ly/2Q73gxt>
- Rea, J. y León, J. 1965. La Mauka (*Mirabilis expansa* Ruiz & Pavón), Un Aporte de la Agricultura Andina Prehispánica de Bolivia. Anales Científicos 3: 38-41 p.
- Revista Corpoica. 2007. Manejo de planta *in vitro* fase IV. Ponencia al XI, Fórum Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de la Habana Cuba.
- Roca, WM. y Mroginski, LA. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones (en línea). Cali, CIAT. Consultado 02 oct. 2017. Disponible en: <https://goo.gl/G3uEE8>
- Seminario, J. 1993. Aspectos Etnobotánicas y Morfológicos del Chago, Miso o Mauca (*Mirabilis expansa* R. y P.) en el Perú. Boletín de Lima 15(86): 71-79 p.
- Seminario, J. 1988. El Chago o mauka, *Mirabilis expansa* R. y P. en Cajamarca, Memorias: VI Congreso Internacional Sobre Cultivos Andinos. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina
- Seminario, J. 2000. Fascículo 1 Origen de las raíces Andinas. En: Seminario Cunya J (Ed) Raíces Andinas manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP), 1-8, 34-36 p.
- Seminario, J. 2004. Raíces Andinas, Contribución al conocimiento y a la capacitación. VI. Aspectos etnobotánicos y productivos del chago

miso o mauka. (*Mirabilis expansa*) (Ruiz y Pav.) Standley).
Universidad Nacional de Cajamarca.

- Seminario, J. y Valderrama, M. 2012. Variabilidad morfológica y evaluación agronómica de maukas *Mirabilis expansa* (Ruiz & Pav.) Standl. del Norte peruano. Revista Peruana de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 249 – 256 p.
- Sudarshana, B; Kabita, M; Bibhuti, B. y Mritunjay K. 2015. *In vitro* antioxidative potential of methanolic aerial extracts three athnomedicinal plants of Assam: A comparative study. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol 5 (12) 111 -116 p. Consultado 12 Feb. 2019. Disponible en <https://bit.ly/3iPxcKJ>
- Tapia, ME. y Fries, AM. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. (En línea). Perú, FAO, ANPE – PERÚ. Consultado 14 oct. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3sXVaFP>
- Van Zant. 2016. History of *Mirabilis expansa* (Ruiz & Pav. Standl. Growth and Use in the Andes. Atlas Journal of Biology – ISSN 2158 – 9151. Published by Atlas Publishing, Consultado 10 Ene. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3s0etx2>
- Villalobos, A. *et al.* 1984. Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. México. 49 p.
- Villalobos, A.; Thorpe, TA. y Yeung, EC. 1982. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México) 51:43 – 59 p.
- Vivanco, JM. y Flores, HE. 2000. Biosynthesis of Ribosome Inactivating Proteins from Callus and Cell Suspension Cultures from *Mirabilis expansa*. Plant Cell Reports 19: 1033-1039 p.
- Vivanco, JM; Savary, BJ y Flores, HE. 1999. Characterization of Two Novel Type I Ribosome – Inactivating Proteins from the Storage Roots of the Andean Crop *Mirabilis expansa*. Plant Physiology; Vol. 119. 1447-1456 p.

- Xu, X; Hunter, D. y Reid, M. 2005. An Efficient regeneration system for four o'clock (*Mirabilis jalapa*). Department of Environmental Horticulture, University of California, One Shields Ave. California, USA. 153 – 156 p.
- Zaccai, M. *et al.* 2007. Regeneration and transformation system in *Mirabilis jalapa*. (En línea) *Scientia Horticulturae* 111, 304 – 309 p. Consultado el 30 nov 2019. Disponible en: <https://bit.ly/3fTvxlI>
- Zapana, JG; Mamani, M; Escobar-Mamani, F. y Zapana. JC. 2017. Producción de raíz tuberosa en cultivo de “mauka” (*Mirabilis expansa* [Ruiz & Pavón] Standley) con aplicación de abonamiento orgánico y fertilización química en Puno – Perú. *Revista de Investigación Alto andina* 2017; Vol. 19 N°3: 257 – 284. Perú.
- Zárate, R. *et al.* 1997. Mejoramiento Genético en tejidos (En línea). Consultado el 14 dic. 2019. Disponible en: <https://bit.ly/2Q9YKhH>

ANEXOS



Figura 34. Preparación de medio de cultivo de introducción.



Figura 35. Instalación de las plántulas in vitro del morfotipo rojo.



Figura 36. Instalación de las plántulas in vitro del morfotipo blanco.



Figura 37. Desarrollo radicular en plántulas del morfotipo rojo.



Figura 38. Desarrollo de las plántulas, morfotipo rojo.

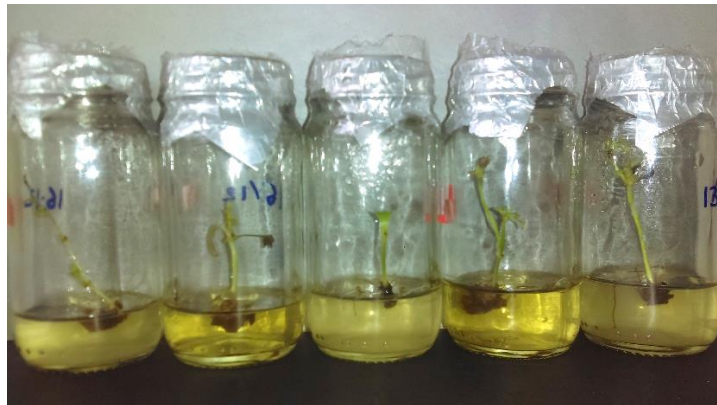


Figura 39. Desarrollo de las plántulas, morfotipo blanco.

Cuadro 19. Registro de datos 10 días después de la multiplicación in vitro.

CUADRO 1- 10 DIAS DESPUES												
REPETICIONES	#BROTOS				LONGITUD DEL EXPLANTE cm				# RAICES			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
R1	1	2	2	4	1.75	2.60	2.60	4.20	0.00	0.00	0.00	1.00
R2	2	0	3	3	2.50	0.00	3.10	3.25	0.00	0.00	0.00	0.00
R3	2	2	3	3	3.00	2.65	3.35	3.50	0.00	0.00	1.00	0.00
R4	3	3	2	3	2.75	3.20	2.60	3.45	0.00	1.00	0.00	0.00
R5	1	2	2	4	1.90	2.40	2.50	4.20	0.00	0.00	0.00	0.00
R6	3	2	3	4	2.70	2.50	3.15	4.10	1.00	0.00	1.00	0.00
R7	2	3	0	3	2.45	2.90	0.00	3.45	0.00	0.00	0.00	1.00
R8	3	1	2	4	2.65	2.20	2.50	4.60	0.00	1.00	0.00	0.00
R9	3	2	3	0	2.90	2.50	3.10	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
R10	2	2	2	4	2.30	2.60	2.40	4.10	0.00	0.00	0.00	0.00
R11	2	3	0	4	2.15	2.95	0.00	4.35	0.00	0.00	0.00	1.00
R12	1	1	3	3	2.10	2.10	2.90	3.20	0.00	0.00	0.00	0.00
R13	2	2	3	4	2.50	2.45	3.25	4.60	0.00	0.00	0.00	0.00
R14	1	0	2	3	1.95	0.00	2.10	3.80	0.00	0.00	0.00	0.00
R15	0	2	3	3	0.00	2.90	3.50	3.65	0.00	0.00	0.00	1.00
R16	2	3	0	4	2.35	3.10	0.00	4.05	0.00	0.00	0.00	0.00
R17	0	1	2	4	0.00	1.95	2.10	3.90	0.00	0.00	0.00	0.00
R18	1	2	2	0	1.95	2.50	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
R19	0	3	3	4	0.00	2.80	3.60	4.25	0.00	0.00	1.00	1.00
R20	0	1	2	3	0.00	1.80	3.00	3.90	0.00	0.00	0.00	0.00

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 20. Registro de datos 20 días después de la multiplicación in vitro.

CUADRO 2 - 20 DIAS DESPUES												
REPETICIONES	#BROTOS				LONGITUD DEL EXPLANTE cm				# RAICES			
	T1	T2	T3	T3	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
R1	3	4	3	6	3.30	4.70	4.40	6.90	0	1	4	6
R2	3	0	5	4	3.20	0.00	5.50	4.80	2	0	5	5
R3	3	3	4	5	3.25	4.35	4.60	5.70	0	2	5	8
R4	3	4	3	4	3.20	4.70	4.40	4.60	1	1	6	7
R5	2	4	4	5	2.80	4.75	4.70	5.75	0	2	7	6
R6	4	3	4	6	3.90	4.30	4.75	6.80	1	1	5	9
R7	3	4	0	4	3.30	4.70	0.00	4.90	0	1	0	6
R8	4	2	3	6	3.80	3.35	4.50	6.90	2	1	7	8
R9	4	3	4	0	3.85	3.00	4.70	0.00	1	0	6	0
R10	4	3	3	6	3.85	4.35	4.35	6.80	2	1	6	9
R11	3	4	0	5	3.40	4.75	0.00	5.80	0	2	0	6
R12	2	2	5	5	2.90	3.40	5.70	5.75	2	1	7	8
R13	2	3	5	6	3.00	4.35	5.65	6.85	0	1	8	7
R14	3	0	4	4	3.40	0.00	4.80	4.80	1	0	7	8
R15	0	3	4	4	0.00	4.30	4.70	4.75	0	1	9	7
R16	2	3	0	5	3.10	4.35	0.00	5.80	2	0	0	7
R17	0	2	4	6	0.00	3.60	4.80	6.80	0	0	8	9
R18	2	3	4	0	3.00	4.30	4.70	0.00	2	2	8	0
R19	0	3	5	6	0.00	4.25	5.70	6.85	0	0	8	9
R20	0	2	4	4	0.00	3.30	4.70	4.80	0	1	9	8

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 21. Registro de datos 30 días después de la multiplicación in vitro.

CUADRO 3- 30 DIAS DESPUES												
REPETICIONES	#BROTOS				LONGITUD DEL EXPLANTE cm				# RAICES			
	T1	T2	T3	T3	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
R1	5	6	6	8	5.10	6.00	6.10	8.20	2	4	4	11
R2	5	0	7	6	5.15	0.00	6.90	7.10	4	0	5	12
R3	6	5	7	7	5.10	5.60	6.80	7.80	3	3	5	10
R4	5	6	6	6	5.20	5.70	6.35	7.15	3	4	6	9
R5	5	6	5	7	5.30	5.50	5.90	7.80	0	5	7	7
R6	6	5	5	8	5.30	5.80	6.00	8.20	3	4	5	8
R7	5	6	0	6	5.10	5.90	0.00	7.20	2	4	0	9
R8	6	5	6	7	5.20	5.60	6.45	7.90	3	5	7	8
R9	7	5	5	0	5.40	5.80	6.20	0.00	3	3	6	0
R10	7	6	7	8	5.40	5.70	6.70	8.30	3	4	6	10
R11	6	7	0	6	5.10	5.80	0.00	7.20	3	5	0	7
R12	5	5	8	7	5.00	5.40	6.95	7.80	4	4	7	12
R13	5	6	7	7	5.10	5.90	0.31	7.70	3	4	8	8
R14	6	0	6	6	5.60	0.00	5.90	7.10	4	0	7	10
R15	0	6	6	6	0.00	5.50	7.80	7.20	0	4	9	9
R16	5	5	0	7	5.50	5.40	0.00	7.90	4	3	0	9
R17	0	5	7	8	0.00	5.60	6.70	8.30	0	4	8	13
R18	5	6	6	0	5.60	5.70	6.10	0.00	5	4	8	0
R19	0	6	7	8	0.00	5.30	6.90	7.90	0	3	8	14
R20	0	5	6	6	0.00	5.80	6.80	7.15	0	4	9	0

Fuente: Elaboración propia.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRONOMO

En la ciudad de Huánuco a los **19** días del mes de julio del año 2021, siendo las **18.00** horas de acuerdo con el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán-Huánuco, se reunieron en la Plataforma Cisco Webex Meeting de la Facultad de Ciencias Agrarias de la **UNHEVAL**, los miembros integrantes del Jurado Calificador, nombrados mediante **Resolución N° 187-2021-UNHEVAL-FCA-D**, de fecha **15/07/2021**, para proceder con la evaluación de la sustentación de la tesis titulada:

"PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS MORFOTIPOS DE KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) DE LA REGIÓN HUÁNUCO"

presentada por la Bachiller en Ingeniería Agronómica:

ANABEL BRISEIDA FLORES AMADO

Bajo el asesoramiento de la Dra. **Milka N. Tello Villavicencio**

El Jurado Calificador está integrado por los siguientes docentes:

PRESIDENTE : Mg. **Fleli Ricardo Jara Claudio**
SECRETARIO : M.Sc. **Severo Ignacio Cárdenas**
VOCAL : Ing. **Grifelio Vargas García**
ACCESITARIO : Dra. **María Betzabé Gutiérrez Solórzano**

Finalizado el acto de sustentación, luego de la deliberación y verificación del calificativo por el Jurado, se obtuvo el siguiente resultado: **Aprobado** por **unanimidad** con el cuantitativo de **17** y cualitativo de **Muy Bueno**, quedando la sustentante **apto** para que se le expida el TÍTULO DE INGENIERO AGRONOMO.

El acto de sustentación se dio por concluido, siendo las **19:25** horas.

Huánuco, 19 de julio de 2021.

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

- Deficiente (11, 12, 13) Desaprobado
- Bueno (14, 15, 16) Aprobado
- Muy Bueno (17, 18) Aprobado
- Excelente (19, 20) Aprobado



"Año de la Universalización de la Salud"
UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN
HUÁNUCO - PERU
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DEL CONSEJO DIRECTIVO N° 099-2019-SUNEDU/CD



OBSERVACIONES:

Sin observaciones. _____

Huánuco, 19 de julio de 2021.

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES:

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN - HUANUCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CONSTANCIA

Por medio de la presente se deja constancia que la Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agrarias UNHEVAL:

FLORES AMADO, Anabel Briseida:

Presento la tesis titulada:

“PROPAGACIÓN in vitro DE DOS MORFOTIPOS DE KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) DE LA REGIÓN HUÁNUCO”

Fue aplicado en el programa: **“turnitin”**


TESIS; para Revision.pdf, Fecha: 9 de julio del 2021.

Resultado: **30 % de similitud general**, rango considerado: Apto, por disposición de la Facultad.

Para lo cual firmo el presente para los fines correspondientes.

Atentamente.

Dr. Antonio S. Cornejo y Maldonado
Director de Investigación de la F.C.A.

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN		REGLAMENTO DE REGISTRO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR GRADOS ACÁDEMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES			
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN		RESPONSABLE DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNHEVAL	VERSION	FECHA	PAGINA
		OFICINA DE BIBLIOTECA CENTRAL	0.0	28/02/2022	1 de 2

ANEXO 2

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE TESIS ELECTRÓNICAS DE PREGRADO

1. IDENTIFICACIÓN PERSONAL (especificar los datos de los autores de la tesis)

Apellidos y Nombres: Flores Amado, Anabel Briseida

DNI: 73645185 Correo electrónico: floresamado11@gmail.com

Teléfonos: Casa - Celular 986773890 Oficina -

Apellidos y Nombres: _____

DNI: _____ Correo electrónico: _____

Teléfonos: Casa _____ Celular _____ Oficina _____

Apellidos y Nombres: _____

DNI: _____ Correo electrónico: _____

Teléfonos: Casa _____ Celular _____ Oficina _____

2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

Pregrado	
Facultad de: <u>Ciencias Agrarias</u>	E. P. : <u>Ingeniería Agronómica</u>

Título Profesional obtenido:

Ingeniero Agrónomo

Título de la tesis:

" Propagación in vitro de dos morfotipos de Kuyacsa
(Mirabilis expansa [Ruiz y Pav.] Standl.) de la región Huánuco"

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN		REGLAMENTO DE REGISTRO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR GRADOS ACÁDEMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES			
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN		RESPONSABLE DEL REPOSITORIO INSTITUCIONAL UNHEVAL	VERSION	FECHA	PAGINA
		OFICINA DE BIBLIOTECA CENTRAL	0.0	28/02/2022	2 de 2

Tipo de acceso que autoriza(n) el (los) autor(es):

Marcar "X"	Categoría de Acceso	Descripción del Acceso
<input checked="" type="checkbox"/>	PÚBLICO	Es público y accesible al documento a texto completo por cualquier tipo de usuario que consulta el repositorio.
<input type="checkbox"/>	RESTRINGIDO	Solo permite el acceso al registro del metadato con información básica, más no al texto completo

Al elegir la opción "Público", a través de la presente autorizo o autorizamos de manera gratuita al Repositorio Institucional – UNHEVAL, a publicar la versión electrónica de esta tesis en el Portal Web repositorio.unheval.edu.pe, por un plazo indefinido, consintiendo que con dicha autorización cualquier tercero podrá acceder a dichas páginas de manera gratuita, pudiendo revisarla, imprimirla o grabarla, siempre y cuando se respete la autoría y sea citada correctamente.

En caso haya(n) marcado la opción "Restringido", por favor detallar las razones por las que se eligió este tipo de acceso:

Asimismo, pedimos indicar el período de tiempo en que la tesis tendría el tipo de acceso restringido:

- () 1 año
 () 2 años
 () 3 años
 () 4 años

Luego del período señalado por usted(es), automáticamente la tesis pasará a ser de acceso público.

Fecha de firma: 03 / 03 / 2022

Firma del autor y/o autores:

