

Establecimiento *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) -variedad Purén- a partir de meristemos

Glenda Analy López Gómez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) -variedad Purén- a partir de meristemos

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Glenda Analy López Gómez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Establecimiento *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) -variedad Purén- a partir de meristemos

Glenda Analy López Gómez

Resumen. A causa del incremento de la población mundial e incidencia de las plagas y enfermedades en el cultivo de papa, el interés por la biotecnología vegetal se ha enfocado en la producción de plantas sanas *in vitro*. El objetivo del estudio fue evaluar seis medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de meristemos de papa. Se usó el medio Murashige y Skoog (MS) sin fitohormonas con 30 g/L de sacarosa y pH a 5.8, MS+ácido ascórbico 3.0 mg/L (A), MS+A+ácido giberélico 2.0 mg/L (AG), MS+AG+6-bencilaminopurina 0.5 mg/L (AGBAP), MS+AG+kinetina 0.5 mg/L (AGK), y MS sin fitohormonas con 20 g/L sacarosa y pH a 5.6. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar. Las variables evaluadas fueron fenolización, formación de callo, número de nudos y altura de planta a los 60 días. Los explantes de todos los tratamientos no presentaron fenolización. Los tratamientos: AG, AGBAP y AGK indujeron la callogénesis (60, 100 y 100% respectivamente). El ácido giberélico no afectó la elongación de tallo y la distancia entrenudos posiblemente por la combinación con citocininas. El tratamiento MS sin fitohormonas con 20 g/L de sacarosa y pH de 5.6 presentó mayor número de nudos (8.17) y altura (8cm) al día 60. El mejor medio para el establecimiento *in vitro* de meristemos de papa –variedad Purén- es el MS con 20 g/L de sacarosa y pH a 5.6. Se recomienda continuar evaluando este medio para la etapa de multiplicación.

Palabras clave: Citocininas, fenolización, giberelinas, sacarosa.

Abstract. Due to the increasing world population and the incidence of pests and diseases in potato cultivation, plant biotechnology has focused on the production of healthy *in vitro* plants. The objective of this study was to evaluate six media for the *in vitro* establishment of potato meristems. Murashige and Skoog (MS) was used as medium without phytohormones with 30 g/L of sucrose and pH of 5.8, MS + ascorbic acid 3.0 mg/L (A), MS + A + gibberellic acid 2.0 mg/L (AG), MS + AG + 6-benzylaminopurine 0.5 mg/L (AGBAP), MS + AG + kinetin 0.5 mg/L (AGK), and MS without phytohormones with 20 g/L sucrose and pH of 5.6. The design was a randomized design. The variables evaluated were phenolization, callus formation, number of nodes and plant height at 60 days. The explants of all the treatments didn't present phenolization. The treatments: AG, AGBAP and AGK induced callogenesis (60, 100, and 100% respectively). Gibberellic acid did not affect stem elongation and internode distance possibly due to the combination with cytokinins. The MS treatment without phytohormones with 20 g/L sucrose and pH 5.6 showed a greater number of nodes (8.17) and height (8cm) at day 60. The best growing media for the *in vitro* establishment of potato meristems - Purén variety - is the MS with 20 g/L sucrose and pH of 5.6. The recommendation is to continue evaluating this medium for the multiplication stage.

Key words: Cytokinins, gibberellins, phenolization, sucrose.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIÓN	10
5. RECOMENDACIÓN	11
6. LITERATURA CITADA.....	12
7. ANEXO	16

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXO

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de papa -variedad Purén-	5
2. Tratamientos evaluados en el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de papa -variedad Purén-.....	5
3. Promedio de nudos por vitroplántula como respuesta a ácido ascórbico (A), ácido giberélico (G), 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K) en el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de papa -variedad Purén-	8
4. Altura promedio de tallo por vitroplántula al día 60 después del establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a ácido ascórbico (A), ácido giberélico (G), 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K) en meristemas de papa -variedad Purén-	8
Figuras	Página
1. Manipulación de brotes de papa	3
2. Extracción de meristemo apical de papa	4
3. Medición de la altura del tallo de vitroplántulas de papa desde la base hasta el meristemo apical.....	6
4. Efecto de ácido ascórbico, ácido giberélico, 6-bencilaminopurina y kinetina en meristemas de papa –variedad Purén- a los 60 días después del establecimiento <i>in vitro</i>	9
Anexo	Página
1. Número de unidades observacionales establecidas <i>in vitro</i> al día 60.....	16

1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, es considerada el cuarto alimento de mayor importancia a nivel mundial (Leiva Mora *et al.* 2011). La producción de este tubérculo es constante en países desarrollados, mientras que, en países en desarrollo la producción ha incrementado rápidamente debido a su interés alimentario (Rodríguez Buitrón 2014).

La producción de papa es el principal ingreso para los productores de las zonas altas de Honduras, 90% del cual son pequeños productores. Honduras importa alrededor de 2,000 toneladas de semilla de papa al año, estas llegan solamente en una temporada y Honduras produce papa durante todo el año. Debido a los precios altos, los agricultores usan su propia semilla para la propagación de papa causando mayor incidencia de plagas y enfermedades y, por ende, bajo rendimiento. Con el fin de mejorar los ingresos de los productores y asegurarles un mejor abastecimiento de semilla libre de enfermedades y a un bajo precio, el gobierno de Honduras, a través de la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA) adscrita a la Secretaría de Ganadería y Agricultura (SAG) liberaron en el 2018 las variedades propias de este país Centroamericano: Purén y Jicaramaní. Científicos del Centro Internacional de la Papa (CIP) están ayudando al personal del DICTA a mejorar la producción de semilla, además, el SAG tiene como meta reemplazar la mitad de las importaciones de semilla. Es por ello que, el DICTA ha establecido una relación de colaboración con la Universidad Zamorano para establecer el protocolo del establecimiento *in vitro* de papa a partir de meristemos de la variedad Purén (CIP 2019).

El cultivo de papa se ve afectado por factores tanto bióticos como abióticos. Según VISAR (2015) y OIRSA (2015), a mayor producción de este tubérculo, la vulnerabilidad a incidencia de plagas y enfermedades aumenta. Los principales patógenos que afectan la papa incluyen hongos: *Phytophthora infestans* (tizón tardío) y *Alternaria solani* (tizón temprano); nematodos: *Globodera rostochiensis* (nematodo dorado) y *Meloidogyne spp.* (nematodo agallador); y enfermedades transmitidas por insectos: el PLRV (virus del enrollamiento de la hoja de papa) transmitido por *Myzus persicae* (pulgón verde) y la bacteria *Candidatus liberibacter solanacearum* transmitido por *Paratrioza bactericera cockerelli* (chicharrita).

La propagación de la papa puede ser sexual, es decir, el fruto obtenido mediante la fertilización del ovario de la flor, o asexual a partir de tubérculos el cual es la clonación en campo, secciones del tubérculo y partes de la planta mediante cultivo *in vitro* (Larios Mejía *et al.* 2013). A causa del incremento de la población mundial y las afecciones de plagas y enfermedades de la papa, el interés por la biotecnología vegetal se ha enfocado en la producción de plantas *in vitro* que tiene como aplicaciones principales la conservación del

germoplasma, intercambio genético y producción de plantas sanas. Los explantes de papa usados han sido hoja, tallo o tubérculo, sin embargo, explantes obtenidos de meristemos pueden emplearse como material inicial para la obtención de plantas sanas ya que, la distribución de microorganismos en el tejido de la planta es desuniforme y su progresión hacia el ápice del tallo es baja (García Águila *et al.* 2001; Gonzáles Castillo y Chavarría Reyes 2016). Las ventajas del cultivo de meristemos para la micropopagación se resumen en propagación masiva conservando su estabilidad genética y menor infección virótica (Espinoza *et al.* 1992).

Cada especie vegetal e incluso variedades distintas de la misma especie requieren de un medio de cultivo distinto debido a que, el crecimiento y desarrollo *in vitro* está determinado por la constitución genética, nutrientes, factores físicos y reguladores de crecimiento (fitohormonas) responsables de la distribución de compuestos que la planta sintetiza y la determinación del crecimiento de órganos. Las principales fitohormonas son auxinas, giberelinas y citocininas (Pierik 1987; Tacoronte *et al.* 2017).

Las auxinas se sintetizan en los meristemos, ápice del tallo, yemas y hojas jóvenes. Generalmente producen elongación y división celular (formación de callo), expansión de tejidos, formación de raíces adventicias, inhibición de tallos axilares y adventicios. En cambio, la biosíntesis de las giberelinas se lleva a cabo en los entrenudos superiores, en las yemas y hojas jóvenes, y el punto de acción principal es en el meristemo intercalar. Estas últimas al ser sintetizadas en los ápices y raíces, son transportadas por el floema.

La giberelina más utilizada es el ácido giberélico, este incrementa la división y elongación celular debido al aumento en el número y longitud de las células, no causan gran efecto en el desarrollo de raíces, pero inducen la elongación del tallo de los entrenudos. Junto con este efecto produce una disminución del grosor del tallo, reducción del tamaño de las hojas y la pérdida de intensidad del color verde, sin embargo, es termolábil, ya que pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclaveado (Pierik 1987).

Las citocininas se sintetizan en meristemos apicales de los tallos y raíces, no son transportadas activamente a través de los tejidos, pero sí de forma pasiva desde la raíz al tallo a través del xilema. Éstas inhiben el crecimiento radicular y elongación de tallos, ya que modifican la dominancia apical, como el 6-bencilaminipurina que promueve el crecimiento lateral de yemas; además las citocininas poseen acción sinérgica, como la kinetina que estimula la división celular solo en presencia de auxinas (Pierik 1987; Hurtado y Merino 1987; Rojas Garcidueñas y Ramírez 1993; Taiz y Zeiger 2006).

La fenolización, causada por daño mecánico, consiste en la oxidación de fenoles exudados por los tejidos vegetales, misma que es capaz de inhibir el crecimiento e incluso producir la muerte de los tejidos. La función antioxidante del ácido ascórbico y otros compuestos ayuda a contrarrestar tal efecto (Olmos *et al.* 2016). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de seis medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de meristemos de papa - variedad Purén-.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Fuente del explante.

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se utilizó como explante meristemos apicales de brotes de papa (*Solanum tuberosum* L.) -variedad Purén- (Figura 1). El material vegetal fue proporcionado en febrero de 2019 por la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA) adscrita a la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) de Honduras. Los tubérculos de donde se extrajeron los meristemos se almacenaron en oscuridad, en ambiente no controlado y se eliminaron los brotes en la segunda semana de febrero para un experimento previo y en la segunda semana de mayo para este experimento.



Figura 1. Manipulación de brotes de papa.

Desinfección del explante.

Los brotes apicales de las papas se lavaron con agua potable y jabón mediante varios enjuagues, posteriormente se desinfectaron con alcohol al 70% durante 5 segundos y se dejaron reposar por 10 minutos en una solución de NaOCl comercial al 20% (volumen/volumen) (ingrediente activo 4.72%) + TweenTM 80, la cual se eliminó con tres enjuagues de agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Preparación, siembra y manejo del material vegetal.

La siembra se realizó en condiciones de asepsia dentro de la cámara de flujo laminar horizontal encendida y desinfectada 20 minutos antes de iniciar el trabajo. Las pinzas y bisturí fueron lavados con agua y jabón, desinfectados con etanol al 70% y esterilizados por 15 segundos con calor seco a 250 -300 °C. Con los instrumentos estériles y con ayuda del estereoscopio se separaron los primordios foliares y se extrajo el meristemo apical (Figura 2).

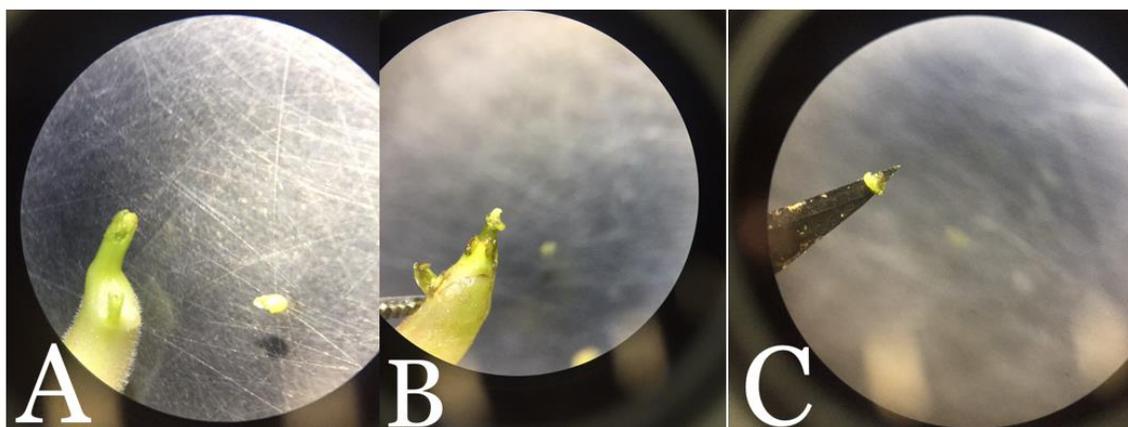


Figura 2. Extracción de meristemo apical de papa: A) brote B) meristemo sin primordios foliares y C) meristemo apical sobre la punta de bisturí (aumento 30x).

Medio de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (Cuadro 1) como medio base. Se preparó los medios de cultivos con agua destilada y sus componentes según los tratamientos, se midió el pH mediante el medidor “pHep[®] by HANNA” y se ajustó con KOH o HCl a 5.8 o a 5.6 según el tratamiento a evaluar. Se adicionó 1.8 g/L de Phytigel[®] como agente gelatinizante. Se colocó 10 mL de medio de cultivo en tubos de ensayo de 150 × 25 mm. Los medios se esterilizaron en el autoclave “Market Forge Sterilmatic STM – E” por 20 minutos a 1 kg/cm² y 121°C.

Tratamientos evaluados.

Se evaluaron seis tratamientos (Cuadro 2). El testigo usado fue el medio de Murashige y Skoog modificado por Lago Castro (1991) con 30 g/L de sacarosa y pH a 5.8 al cual se le suplementó con ácido ascórbico, ácido giberélico, 6-bencilaminopurina y kinetina, y también se evaluó el medio MS modificado por Lago Castro sin fitohormonas, pero con el pH a 5.6 y 20 g/L de sacarosa.

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de papa –variedad Purén-.

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
	Vitaminas		Myo-inositol
		Tiamina	0.1
		Piridoxina	0.5
		Ácido nicotínico	0.5
Aminoácido		Glicina	2
Carbohidrato		Sacarosa	30000

Fuente: Lago Castro (1991)

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en el establecimiento *in vitro* de meristemas de papa –variedad Purén-.

Tratamientos	Ácido ascórbico (A)	Ácido giberélico (G)	6-bencilaminopurina (BAP)	Kinetina (K)
MS [¥]	0.0	0.0	0.0	0.0
MS + A	3.0	0.0	0.0	0.0
MS + AG	3.0	2.0	0.0	0.0
MS + AGBAP	3.0	2.0	0.5	0.0
MS + AGK	3.0	2.0	0.0	0.5
MS20 [€]	0.0	0.0	0.0	0.0

[¥]Medio MS modificado para el establecimiento de papa con 30 g/L de sacarosa y 5.8 pH.

[€]Medio MS con 20 g/L de sacarosa y 5.6 pH.

Incubación.

Los tratamientos se incubaron a 70% de humedad, 24-25 °C, 15 días en oscuridad y luego se expusieron a la luz a 4000 Lux hasta cumplir 60 días después de establecimiento.

Variables evaluadas.

Los datos se tomaron a los 15 días después del establecimiento. Luego se realizaron cada siete días hasta alcanzar 60 días para cada tratamiento.

Las variables evaluadas fueron:

- a) Fenolización de los explantes
- b) Formación de callo
- c) Número de nudos en tallo principal y secundarios
- d) Altura de la plántula al día 60 después de establecidas donde se midió cinco repeticiones por cada tratamiento desde la base hasta el meristemo apical (Figura 3).



Figura 3. Medición de la altura del tallo de vitroplántulas de papa desde la base hasta el meristemo apical.

Diseño Experimental.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se contó con seis tratamientos y 60 repeticiones por cada tratamiento para un total de 360 unidades observacionales.

Análisis estadístico.

Para las variables evaluadas se realizó un Análisis de Varianza con separación de medias por la prueba de Duncan y nivel de significancia ($P \leq 0.05$). Para el análisis se usó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4[®]).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenolización de los explantes.

Los explantes en todos los tratamientos no presentaron oxidación de fenoles, por lo tanto, en el cultivo de meristemas de papa no es necesario agregar ácido ascórbico a los medios de cultivo. Sin embargo, otras investigaciones indican que es beneficioso en algunos casos como en el establecimiento de caña de azúcar, fresa y plátano (Valdez Balero *et al.* 2002; Sánchez Cuevas y Salaverría 2004; Canchignia Martínez *et al.* 2008). Además, Toledo *et al.* (1998) y Krikorian (1991) indican que, al ser los meristemas tejidos jóvenes, estos son menos susceptibles al oscurecimiento que los tejidos maduros.

Formación de callo.

Los tratamientos MS y MS20 no formaron callo y desarrollaron directamente el tallo a diferencia del resto de tratamientos que generaron el 60, 100 y 100% de explantes con callo al día 24 después del establecimiento. Luego continuaron con el desarrollo del tallo.

Según Grout (1999), el desarrollo del brote directamente desde el meristemo evita la formación del tejido calloso. Sin embargo, evaluaciones demuestran que el ácido giberélico (1 mg/L) (Jiménez Barreto *et al.* 2009), kinetina (0.5 mg/L) (Hidrobo Luna *et al.* 2002) y 6-bencilaminopurina en diferentes concentraciones (Shriram *et al.* 2008) responden positivamente a la formación de callo. Esto se asemeja a los tratamientos que tuvieron las concentraciones de ácido giberélico 2 mg/L, 6-bencilaminopurina y kinetina 0.5 mg/L respectivamente. Este callo permite su subcultivo para la regeneración de órganos y embriones de manera indirecta (Pierik 1987) por lo que podría ser usado para futuras investigaciones.

Número de nudos y altura promedio por vitroplántula.

Al día 60 después del establecimiento, el tratamiento MS20 presentó mayor cantidad de nudos y altura promedio por vitroplántula (Cuadro 3 y 4 y Figura 4) en comparación al medio propuesto por Lago Castro (1991) con 30 g/L de sacarosa y pH 5.8. Esto concuerda con Tacoronte *et al.* (2017) que evaluó el efecto de sacarosa en papa donde concluyó que el tratamiento con 20 g/L de sacarosa y pH 5.6 presentó mayor cantidad de nudos y elongación de tallo. Además, se observó que al estar los explantes en un medio con bajo contenido de carbono, para su sobrevivencia, aseguran su crecimiento ante dicha carencia con una alta actividad fisiológica.

A pesar de que se reporta que el ácido giberélico induce elongación de tallo y entrenudos (Pierik 1987; Hurtado y Merino 1987), esto no se observó posiblemente por la combinación con 6-bencilaminopurina y kinetina.

Cuadro 3. Promedio de nudos por vitroplántula como respuesta a ácido ascórbico (A), ácido giberélico (G), 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K) en el establecimiento *in vitro* de meristemos de papa –variedad Purén-.

Tratamientos	Días					
	28	35	42	49	56	60
MS	0.00 c [¥]	1.06 d	1.05 d	1.02 c	3.36 b	3.87 bc
MS + A	0.25 c	1.53 bc	2.84 bc	2.34 c	4.60 b	5.14 b
MS + AG	1.40 b	0.74 d	3.22 ab	2.43 c	4.22 b	4.22 bc
MS+AGBAP	2.38 a	2.56 a	4.10 a	4.30 b	4.15 b	4.15 bc
MS + AGK	1.07 b	1.12 cd	2.02 cd	1.43 c	2.18 b	2.11 c
MS20 [€]	2.14 a	2.13 ab	4.43 a	6.05 a	7.60 a	8.17 a
R ²	0.49	0.38	0.51	0.44	0.40	0.42
CV	6.69	6.26	9.54	11.25	14.15	15.15
Probabilidad	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

[€]Medio MS con 20 g/L de sacarosa y 5.6 pH.

[¥]Promedios con diferentes letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan.

Cuadro 4. Altura promedio de tallo por vitroplántula al día 60 después del establecimiento *in vitro* como respuesta a ácido ascórbico (A), ácido giberélico (G), 6-bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K) en meristemos de papa –variedad Purén-.

Tratamientos	Altura de tallo (cm)
MS	7.05 ab [¥]
MS + A	7.08 ab
MS + AG	4.48 b
MS + AGBAP	5.30 ab
MS + AGK	1.16 c
MS20 [€]	8.00 a
R ²	0.28
CV	11.74
Probabilidad	0.0002

[€]Medio MS con 20 g/L de sacarosa y 5.6 pH.

[¥]Promedios con diferentes letras no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan.

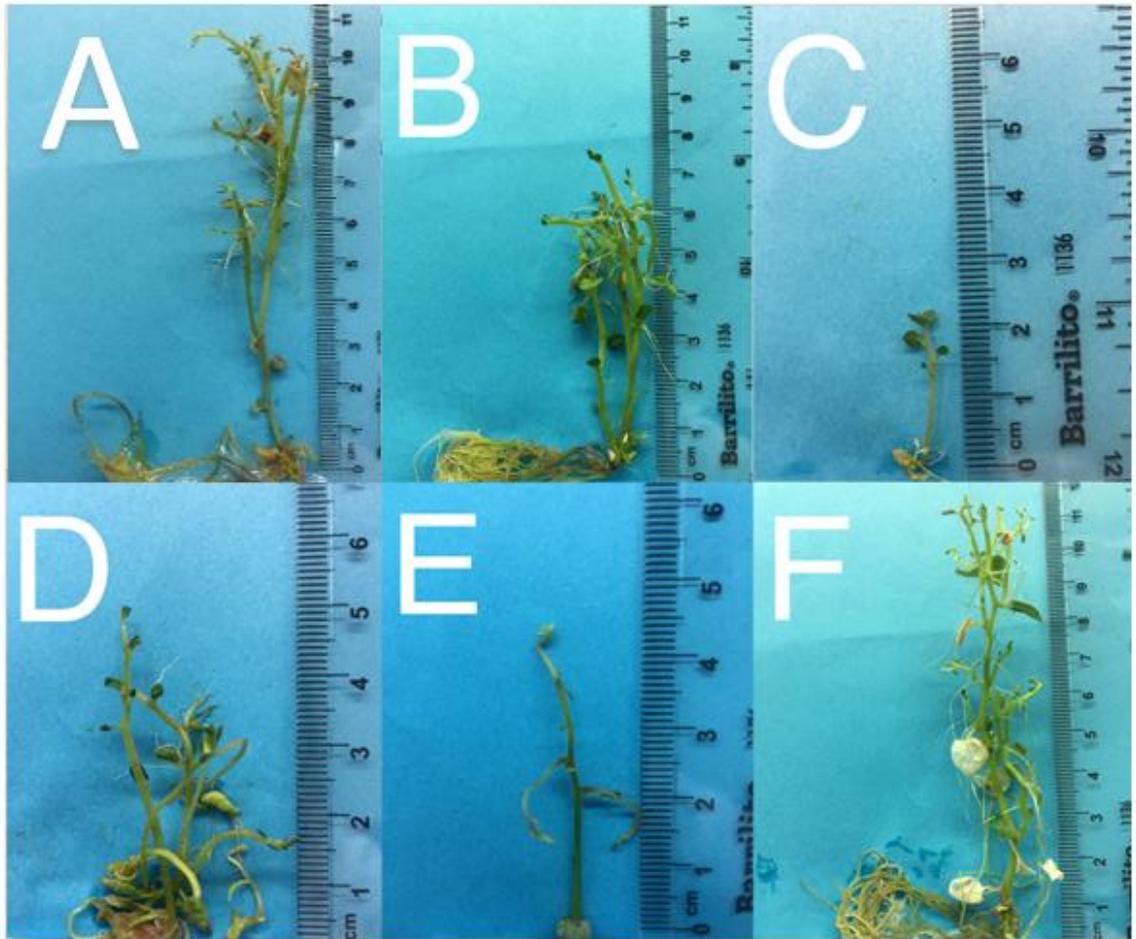


Figura 4. Efecto de ácido ascórbico, ácido giberélico, 6-bencilaminopurina y kinetina en meristemos de papa –variedad Purén- a los 60 días después del establecimiento *in vitro* A) MS, B) ácido ascórbico (3.0 mg/L), C) ácido ascórbico (3.0 mg/L) + ácido giberélico (2.0 mg/L) D) ácido ascórbico (3.0 mg/L) + ácido giberélico (2.0 mg/L) + 6-bencilaminopurina (0.5 mg/L), E) ácido ascórbico (3.0 mg/L) + ácido giberélico (2.0 mg/L) + Kinetina (0.5 mg/L) y F) MS con 20 g/L de sacarosa y 5.6 pH.

4. CONCLUSIÓN

- El mejor medio para el establecimiento *in vitro* de meristemas de papa -variedad Purén- es el MS sin fitohormonas con 20 g/L de sacarosa y pH a 5.6.

5. RECOMENDACIÓN

- Continuar evaluando el medio MS sin fitohormonas con 20 g/L de sacarosa y pH a 5.6 en la etapa de multiplicación.

6. LITERATURA CITADA

- Canchignia Martínez HF, Sigcha Sigcha LE, Toaquiza Soatunsig JP, Ramos Gavilanez LE, Saucedo Aguilar SG, Carranza Patiño MS, Cevallos Falquez OF. 2008. Alternativas para la propagación *in vitro* de plátano variedad maqueño (*Musa balbisiana* AAB). Ciencia y tecnología. [consultado el 2 de sep. de 2019]; 1(1):43-48. <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-tecnologia-quevedo/articulo/alternativas-para-la-propagacion-in-vitro-de-platano-variedad-maqueño-musa-balbisiana-aab>
- CIP, International Potato Center. 2019. Con variedades propias, Honduras se apresta a mejorar ingresos de agricultores de papa; [consultado el 1 de ago. de 2019]. <https://cipotato.org/es/blog-es/variedades-propias-honduras-papa/>
- Espinoza N, Lizárraga R, Sigüeñas C, Buitrón F, Bryan J, Dodds JH. 1992. Cultivo de tejidos: micropropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. 2 ed. Lima, Perú. 19p. Centro Internacional de la Papa: [consultado el 25 de jul. de 2019]. <http://cipotato.org/library/pdfdocs/ResGuide41143.pdf>
- García Águila L, Sarría Hernández Z, Pichardo Moya T, Pérez Mederos B. 2001. Cultivo de meristemas para la eliminación del virus S de papa en plantas cultivadas *in vitro*. Biotecnología Vegetal. [consultado el 23 de ago. Del 2019]; 1(2): 117-119. <https://pdfs.semanticscholar.org/5ee5/526c77e5eeabf2875ac4bfd009389212080c.pdf>
- González Castillo DA, Chavarría Reyes MA. 2016. Microtuberización del cultivar papa (*Solanum tuberosum* L.) banda en biorreactores económicos de inmersión temporal. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 36p; [consultado el 28 de jul. de 2019]. <http://repositorio.una.edu.ni/3396/1/tnf01g643mc.pdf>
- Grout BW. 1999. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. En: Hall RD, editor. Plant cell culture protocols. Methods in molecular biologyTM. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press. p 115-125.

- Hidrobo Luna JR, Ardisana EH, Hernández A. 2002. Estudio sobre la efectividad del Rizobac en el proceso de callogénesis en papa var. Desiree. IBP. [consultado el 21 de ago. de 2019]; 2(4):195-200. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:IPvmrzCeDrkJ:https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/186/162+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=hn>
- Hurtado D, Merino ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. 1 ed. México. Trillas. 232p. ISBN: 968-24-2159-4.
- Jiménez Barreto JP, Chaparro Giraldo A, Blanco J. 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. Colom.Biotecnol. [consultado el 20 de ago. De 2019]; 6(2):66-74. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200008&lng=en&nrm=iso
- Krikorian AD. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca, W. *et al.* editores. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Cali, Colombia. 41-76p.
- Lago Castro L. 1991. Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa. En: Roca, W. *et al.* editores. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Cali, Colombia. 447-468p.
- Larios Mejía R, Santos Méndez J, Pineda L, Hernández S. 2013. Manual de producción de semilla de papa mediante técnicas de reproducción asexual. Tegucigalpa, Honduras. [consultado el 20 de ago. de 2019]. http://www.agronegocioshonduras.org/wp-content/uploads/2014/06/manual_de_produccion_de_semilla_de_papa.pdf
- Leiva Mora M, Portela Díaz Y, Torrez García S, Novisel V, Jiménez Terry F, Agramonte D, León M, Alvarado Capó Y, Acosta Suárez M, Cruz Martín M, Sánchez C, Roque B. 2011. Índices fisiológicos asociados al crecimiento de variedades de papa obtenidas por métodos biotecnológicos. IBP. Cuba; [consultado el 20 de may. de 2019]. 11(2): 119-120. <https://biblat.unam.mx/es/revista/biotecnologia-vegetal/articulo/indices-fisiologicos-asociados-al-crecimiento-de-variedades-de-papa-obtenidas-por-metodos-biotecnologicos>

- OIRSA, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. 2015. El psílido de la papa y tomate *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc) (Hemíptera: Triozidae): ciclo biológico; la relación con las enfermedades de las plantas y la estrategia del manejo integrado de plagas en la región del OIRSA [internet]. 1ed. San Salvador, El Salvador; [consultado el 5 de sep. de 2019].
- Olmos S, Luciani G, Galdeano E. 2016. Micropropagación. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editores. Biotecnología Vegetal. Cuba. D – Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. P. 353-362.
- Pierik RL. 1987. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 1ª ed. Países Bajos. Kluwer Academic Publishers B.V. 326 p. ISBN: 84-7114-267-8.
- Rodríguez Buitrón R. 2014. Respuesta de cultivares de patata a la salinidad y potencial efecto protector del metil jasmonato frente al estrés salino. Universidad de Lleida. Lleida, España. 250p; [consultado el 20 de may. de 2019]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/293375/Trrb1de1.pdf?sequence=2>
- Rojas Garcidueñas M, Ramírez H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas. 2ª ed. México, D.F. Limusa, S.A. 263 p. ISBN: 968-18-3622-7.
- Sánchez Cuevas CM, Salaverría JL. 2004. Control de oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) UDO Agrícola. [consultado el 2 de sep. de 2019]; 4(1):21-26. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221549>
- Shriram V, Kumar V, Shitole MG. 2008. Organogénesis indirecta y regeneración de plantas en *Helicteres isora* L., una importante planta medicinal. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. India. 44(1):186-193. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9108-3>
- Tacoronte B, Vielman M, Olivo A, Chacín N. 2017. Efectos de nitratos y sacarosa en la propagación *in vitro* de tres variedades de papa nativa. *Colom.Biotecnol*. 19(2);63-73. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70160
- Taiz L, Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. 2ª ed. Universidad Jaume I. Valencia, España. 656 p. ISBN: 978-84-8021-600-5.

- Toledo J, Espinoza N, Golmirzaie A. 1998. Cultivo de tejidos: manejo de plántulas *in vitro* en la producción de semilla de papa. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP); [consultado el 21 de ago. De 2019]. <https://books.google.hn/books?id=gabtBQAAQBAJ&pg=PP32&lpg=PP32&dq=por+qu%C3%A9+explantes+de+papa+no+se+fenolizan&source=bl&ots=aCPKOaHxzm&sig=ACfU3U09A12HqhEQVd9SVO89U4AsKkqOtg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjC0ZeE8ZTkAhVCrIkKHSd7DyUQ6AEwBHoECAkQAQ#v=onepage&q=por%20qu%C3%A9%20explantes%20de%20papa%20no%20se%20fenolizan&f=false>
- Valdez Balero A, Orellana Pérez PA, García Rodríguez L, Veitia Rodríguez N, Bermudez Carabaloso I, García Rodríguez L, Padrón Y. 2002. Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido var. Sp 70-1284) en formación de callos. *Biotechnología Vegetal*. [consultado el 1 de sep. de 2019]; 2(1):31-37. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/125/107>
- VISAR, Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones. 2015. Plan de manejo integrado de enfermedades de la papa en Guatemala (*Solanum tuberosum* L.) [internet]. 1 ed. Guatemala; [consultado el 10 de jun. de 2019]. <http://proyectoadaintegracion.minex.gob.gt/ada/docs/MINISTERIO%20DE%20AGRICULTURA%20GANADERIA%20Y%20ALIMENTACION/MANUAL%20PAPA.pdf>

7. ANEXO

Anexo 1. Número de unidades observacionales establecidas *in vitro* al día 60.

Experimento 1	Cantidad	%
Establecidos	360	100.00
Sin reacción	138	38.33
Asépticos	222	61.66