

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
AGRARIAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**TESIS:**

**TOLERANCIA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN PAPA  
(*Solanum tuberosum* L.) MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE  
VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLÁNTULAS REGENERADAS POR  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**

Presentada por:

**M.Cs. ANGEL ESTEBAN SANTA CRUZ PADILLA**

Asesor:

**Dr. NILTON EDUARDO DEZA ARROYO**

Cajamarca, Perú

2025



### CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

- Investigador:  
Angel Esteban Santa Cruz Padilla  
DNI: 26706321  
Escuela Profesional/Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias. Programa de Doctorado en Ciencias. Mención: Gestión Ambiental y Recursos Naturales
- Asesor: Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo
- Grado académico o título profesional  
 Bachiller     Título profesional     Segunda especialidad  
 Maestro     Doctor
- Tipo de Investigación:  
 Tesis     Trabajo de investigación     Trabajo de suficiencia profesional  
 Trabajo académico
- Título de Trabajo de Investigación:  
"TOLERANCIA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLÁNTULAS REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA"
- Fecha de evaluación: 06/09/2025
- Software antiplagio:             TURNITIN             URKUND (ORIGINAL) (\*)
- Porcentaje de Informe de Similitud: 15%
- Código Documento: 3117:492449162
- Resultado de la Evaluación de Similitud:  
 APROBADO     PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 24/09/2025

Firma y/o Sello  
Emisor Constancia



Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo  
DNI: 23816486

\* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT © 2025 BY  
**ANGEL ESTEBAN SANTA CRUZ PADILLA**  
Todos los derechos reservados



**Universidad Nacional de Cajamarca**  
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 090-2018-SUNEDUCD  
**Escuela de Posgrado**  
CAJAMARCA - PERU



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**

Siendo las 16.00 horas, del día 14 de agosto del año dos mil veinticinco, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. GLICERIO EDUARDO TORRES CARRANZA**, **Dr. JUAN EDMUNDO CHÁVEZ RABANAL** **Dr. AUGUSTO HUGO MOSQUEIRA ESTRAYER** y en calidad de Asesor, el **Dr. NILTON EDUARDO DEZA ARROYO**, actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **TOLERANCIA A ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLÁNTULAS REGENERADAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.**, presentada por el **Maestro en Ciencias Mención: Gestión Ambiental, ANGEL ESTEBAN SANTA CRUZ PADILLA**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBAR POR UNANIMIDAD con la calificación de Dieciocho (18) la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Maestro en Ciencias Mención: Gestión Ambiental ANGEL ESTEBAN SANTA CRUZ PADILLA**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, Mención **GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES** de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Siendo las 16.00 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

  
.....  
**Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo**  
Asesor

  
.....  
**Dr. Glicerio Eduardo Torres Carranza**  
Jurado Evaluador

  
.....  
**Dr. Juan Edmundo Chávez Rabanal**  
Jurado Evaluador

  
.....  
**Dr. Augusto Hugo Mosqueira Estrayer**  
Jurado Evaluador

**A:**

La memoria de mi padre Angel Santa Cruz Linares, un extraordinario ejemplo de vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Expreso mi sincero agradecimiento a:

Dios, quien me guarda y me guía cada momento de mi vida

Al Doctor Nilton Eduardo Deza Arroyo por su dedicación en el asesoramiento del presente trabajo de Tesis.

Al Doctor Héctor Antonio Cabrera Hoyos, la ingeniera Rosmeri Verónica Pando Gómez, y la Bióloga María Elvira, por conceder las facilidades para la realización del presente trabajo de investigación en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca - INIA.

Al Doctor Toribio Norberto Tejada Campos por su invaluable apoyo en la revisión del documento y por sus valiosas sugerencias para mejorar esta investigación.

Al Ingeniero M.Sc. Jorge Luis Vásquez Orrillo por sus valiosos aportes en el análisis estadístico y por sus aportes con información relevante.

A mi querida familia, cuyo amor, apoyo incondicional, comprensión, paciencia y constantes palabras de aliento me han permitido mantenerme firme en este propósito y alcanzar este logro.

**El temor de Jehová es el principio de la sabiduría, y el conocimiento del Santísimo  
es la inteligencia**

**- Proverbios 9:10**

## CONTENIDO

Ítem	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ILUSTRACIONES</b> .....	xi



<b>LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS</b> .....	xvii
<b>RESUMEN</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xx
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	01
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	05
<b>2.1. Antecedentes de la investigación</b> .....	05
<b>2.2. Bases teóricas</b> .....	08
<b>2.2.1. Control hormonal en las plantas</b> .....	09
<b>2.2.2. Sistemas de control en la desdiferenciación y                 regeneración de tejidos vegetales</b> .....	10
<b>2.2.3. Embriogénesis somática</b> .....	12
<b>2.2.4. Mejoramiento vegetal para estrés abiótico mediante                 embriogénesis somática</b> .....	13
<b>2.3. Definición de términos básicos</b> .....	14
<b>2.3.1. <i>Solanum tuberosum</i> L.</b> .....	14
<b>2.3.2. Estrés por déficit hídrico y tolerancia</b> .....	14
<b>2.3.3. Mejoramiento vegetal por variación somaclonal</b> .....	14
<b>2.3.4. Desdiferenciación celular</b> .....	15
<b>2.3.5. Callo</b> .....	15
<b>2.3.6. Calogénesis</b> .....	15
<b>2.3.7. Cultivo <i>in vitro</i> en plantas</b> .....	16
<b>2.3.8. Embriogénesis somática</b> .....	16
<b>2.3.9. Embriode o embrión somático</b> .....	16
<b>2.3.10. Explante</b> .....	16

2.3.11. Variación somaclonal .....	17
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Ubicación geográfica .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Equipos y materiales .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Material experimental .....	19
3.2.2. Equipos .....	19
3.2.3. Material de vidrio .....	19
3.2.4. Material quirúrgico .....	20
3.2.5. Insumos para medios de cultivo .....	20
3.2.6. Material de escritorio .....	20
3.2.7. Otros materiales .....	21
<b>3.3. Metodología .....</b>	<b>21</b>
3.3.1. Primera etapa .....	21
3.3.2. Segunda etapa .....	23
3.3.3. Tercera etapa .....	26
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
4.1. Inducción callogénica de explantes de papa .....	29
4.2. Inducción para regeneración por embriogénesis somática bajo estrés por déficit hídrico .....	34
4.3. Micropropagación de las plántulas regeneradas (fase de transición)	38
4.4. Tolerancia al estrés .....	40
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 01.</b> <i>Mapa de ubicación geográfica del Laboratorio de Cultivo In Vitro de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca - INIA .....</i>	<b>18</b>

<b>Figura 02.</b> <i>Micropropagación de plántulas de papa variedad INIA 302 AMARILIS</i> .....	21
<b>Figura 03.</b> <i>Obtención de callos bien conformados a partir de explantes de yema de la variedad de papa INIA 302 Amarilis.....</i>	23
<b>Figura 04.</b> <i>Plántulas de dos clones obtenidos mediante variación somaclonal y plántulas testigo, sometidas a estrés por déficit hídrico simulado utilizando manitol.....</i>	27
<b>Figura 05.</b> <i>Fotografías de la respuesta de cinco tipos de explantes a la inducción callogénica con medio M.S. más 3.0 ppm de BAP, y 2.0 ppm de ANA, en oscuridad. ....</i>	31
<b>Figura 06.</b> <i>Explantes obtenidos en la segunda etapa de la investigación. .....</i>	36
<b>Figura 07.</b> <i>Diferencia de crecimiento in vitro de plántulas de papa, provenientes de regeneración por inducción de embriogénesis somática, y plantas testigo a los 45 días después de la siembra in vitro.....</i>	42
<b>Figura 08.</b> <i>Vista exterior del Laboratorio de Cultivos In Vitro de la EEA. BI..</i>	68
<b>Figura 09.</b> <i>Vista interior del Laboratorio de Cultivo In Vitro. Materiales en incubación.....</i>	68
<b>Figura 10.</b> <i>Micropropagación: A. Plántula in vitro. B. Explantes obtenidos a partir de la plántula in vitro.....</i>	69
<b>Figura 11.</b> <i>Plántulas del experimento en incubación.....</i>	70
<b>Figura 12.</b> <i>Desdiferenciación de tejidos. Obtención de callos.....</i>	71
<b>Figura 13.</b> <i>Clon AMARILISAESPI, con tolerancia a estrés por déficit hídrico simulado in vitro: A. Fotografía lateral del envase conteniendo los explantes. B. Fotografía tomada desde la parte superior del envase.....</i>	71

<b>Figura 14.</b> <i>Evaluación de la sanidad de las plántulas obtenidas.....</i>	72
<b>Figura 15.</b> <i>Plántula con tolerancia a estrés por déficit hídrico simulado in vitro.</i>	72

<b>Tablas</b>	Pág.
<b>Tabla 01.</b> <i>Tratamientos en estudio para la primera etapa de la investigación</i>	22
<b>Tabla 02.</b> <i>Tratamientos en estudio para la segunda etapa de la investigación</i>	25
<b>Tabla 03.</b> <i>Tratamientos en estudio para la tercera etapa de la investigación</i>	27

<b>Tabla 04.</b> <i>Respuesta de cinco tipos de explantes a la inducción callogénica con medio M.S. más 3.0 ppm de BAP, y 2.0 ppm de ANA, en oscuridad. ....</i>	30
<b>Tabla 05.</b> <i>Respuesta de 324 callos bien conformados (C1), y 352 callos parcialmente desarrollados (C2); provenientes de cinco tipos de explantes (E1, E2, E3, E4, E5) a la inducción de regeneración por embriogénesis somática; bajo dos condiciones de estrés por déficit hídrico simulado in vitro (M1 y M2).</i>	35
<b>Tabla 06.</b> <i>Resultado de la micropropagación (utilizando medio M.S. 1962) de plántulas regeneradas bajo estrés por déficit hídrico simulado in vitro.....</i>	38
<b>Tabla 07.</b> <i>Cuadrados medios y significación del ANVA para la longitud de plántula durante seis semanas, de dos clones procedentes de un proceso de regeneración bajo dos niveles de estrés hídrico comparadas con plántulas sin tratamiento especial previo (testigo) .....</i>	41
<b>Tabla 08.</b> <i>Constituyentes del medio de cultivo base utilizado (Murashigue y Skoog, 1962 modificado).....</i>	59
<b>Tabla 09.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (11 de marzo de 2024).....</i>	60
<b>Tabla 10.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (18 de marzo de 2024).....</i>	60
<b>Tabla 11.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (25 de marzo de 2024).....</i>	60
<b>Tabla 12.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (01 de abril de 2024).....</i>	61
<b>Tabla 13.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (08 de abril de 2024).....</i>	61

<b>Tabla 14.</b> <i>Evaluaciones de comparación de longitud de planta (15 de abril de 2024).....</i>	61
<b>Tabla 15.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los diez días después de la siembra .....</i>	62
<b>Tabla 16.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los diez días después de la siembra .....</i>	62
<b>Tabla 17.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los diez días después de la siembra .....</i>	62
<b>Tabla 18.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los diecisiete días después de la siembra .....</i>	62
<b>Tabla 19.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los diecisiete días después de la siembra .....</i>	62
<b>Tabla 20.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los diecisiete días después de la siembra .....</i>	63
<b>Tabla 21.</b> <i>Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los diecisiete días después de la siembra .....</i>	63
<b>Tabla 22.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los veinticuatro días después de la siembra .....</i>	63
<b>Tabla 23.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los veinticuatro días después de la siembra.....</i>	63
<b>Tabla 24.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los veinticuatro días después de la siembra .....</i>	63
<b>Tabla 25.</b> <i>Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los veinticuatro días después de la siembra .....</i>	64
<b>Tabla 26.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los treinta y un días después de la siembra .....</i>	64

<b>Tabla 27.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los treinta y un días después de la siembra</i> .....	64
<b>Tabla 28.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los treinta y un días después de la siembra</i> .....	64
<b>Tabla 29.</b> <i>Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los treinta y un días después de la siembra</i> .....	65
<b>Tabla 30.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los treinta y ocho días después de la siembra</i> .....	65
<b>Tabla 31.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los treinta y ocho días después de la siembra</i> .....	65
<b>Tabla 32.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los treinta y ocho días después de la siembra</i> .....	65
<b>Tabla 33.</b> <i>Prueba de significancia para Planta a los treinta y ocho días después de la siembra</i> .....	65
<b>Tabla 34.</b> <i>Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los treinta y ocho días después de la siembra</i> .....	66
<b>Tabla 35.</b> <i>Resumen de la variable evaluada a los cuarenta y cinco días después de la siembra</i> .....	66
<b>Tabla 36.</b> <i>Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra</i> .....	66
<b>Tabla 37.</b> <i>Prueba de significancia para concentración de manitol a los cuarenta y cinco días después de la siembra</i> .....	66
<b>Tabla 38.</b> <i>Prueba de significancia para Planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra</i> .....	66

<b>Tabla 39.</b> <i>Prueba de significancia para la interacción Concentración - Planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra .....</i>	<b>67</b>
--	-----------

#### **LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS**

<b>Abreviaciones/siglas</b>	<b>Descripción</b>
-----------------------------	--------------------

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AG3</b>	Ácido giberélico 3
<b>AGL</b>	Agamouselike
<b>AIA</b>	Ácido indol acético
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>ANVA</b>	Análisis de variancia
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>BAP</b>	Benzil amino purina
<b>BBM</b>	BABY BOOM
<b>DCR</b>	Diseño Completamente Randomizado
<b>EEA.BI</b>	Estación Experimental Agraria Baños del Inca
<b>FUS</b>	FUSCA
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Innovación Agraria
<b>IPCC</b>	Intergovernmental Panel on Climate Change
<b>LEC</b>	Leafy Cotyledon
<b>MPa</b>	Megapascales
<b>MS</b>	Murashigue y Skoog
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PRC2</b>	POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX2
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>UNESCO</b>	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

**WUS**

**WUSCHEL**

## **RESUMEN**

El estrés por sequía, exacerbado por el cambio climático, afecta severamente la agricultura, alterando procesos esenciales para el desarrollo de las plantas, entre ellos la

papa. La variación somaclonal, mediante inducción de callogénesis y regeneración bajo estrés simulado, ha demostrado ser útil para generar líneas tolerantes a factores estresantes como la sequía. La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca, con el objetivo de obtener plántulas de papa con tolerancia a estrés por déficit hídrico, mediante la inducción de variación somaclonal. Esta investigación se centró en la inducción de callogénesis y regeneración de plántulas de papa bajo estrés por déficit hídrico simulado *in vitro*. El trabajo se desarrolló en tres etapas; la primera consistió en la inducción de callogénesis a partir de cinco tipos de explantes de papa (hoja, tallo, yema, porción de raíz y ápice de raíz); en la segunda etapa, se indujo la regeneración de plántulas a partir de callos bajo déficit hídrico simulado *in vitro*; y la tercera etapa consistió en comparar los clones obtenidos mediante el proceso de inducción de variación somaclonal, con plántulas *in vitro* testigo (sin tratamiento especial previo). Las yemas mostraron la mejor respuesta a la inducción para desdiferenciación y fueron las únicas que produjeron plántulas a partir de callos bajo estrés hídrico severo. El clon denominado “AmarilisAESp1” mostró mejor respuesta comparativa al estrés por déficit hídrico, considerándose por tanto material promisorio para futuras investigaciones.

**Palabras clave:** Variación somaclonal, embriogénesis somática, estrés hídrico, tolerancia, papa.

## ABSTRACT

Drought stress, exacerbated by climate change, severely affects agriculture by disrupting essential processes for plant development in crops such as potato. Somaclonal variation, through the induction of callogenesis and regeneration under simulated stress conditions,

has proven useful for generating lines tolerant to abiotic stress factors like drought. This research was conducted at the Plant Biotechnology Laboratory of the Baños del Inca Agricultural Experimental Station, with the objective of obtaining potato plantlets tolerant to water deficit stress through the induction of somaclonal variation. The study focused on inducing callogenesis and subsequent regeneration of potato plantlets under *in vitro* simulated water deficit conditions. The work was carried out in three stages. The first stage involved inducing callus formation from five types of potato explants (leaf, stem, bud, root segment, and root apex). In the second stage, plantlet regeneration was induced from calli under *in vitro* simulated water deficit stress. The third stage consisted of comparing the clones obtained through the somaclonal variation induction process with control *in vitro* plantlets (those not subjected to prior stress conditions). Buds exhibited the best response to dedifferentiation induction and were the only explants that produced plantlets from calli under severe water stress. The clone designated “AmarilisAESPI” showed a superior response to water deficit stress and is therefore considered a promising candidate for future research.

**Keywords:** Somaclonal variation, somatic embryogenesis, water stress, tolerance, potato.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

El estrés por sequía obstaculiza en gran medida el desarrollo agrícola y representa un desafío significativo. Se prevé que la creciente frecuencia de fenómenos climáticos extremos a nivel mundial agrave este problema (El-Saadony et al., 2024). Las sequías ocurren de manera natural en el mundo; sin embargo, el cambio climático ha ocasionado la aceleración de los procesos hidrológicos de tal manera que estos fenómenos atmosféricos se produzcan más rápido y con mayor intensidad, con consecuencias cada vez mayores en perjuicio de la agricultura y otras actividades (Mukherjee et al., 2018); se proyectan sequías con efectos sobre la agricultura, con mayor frecuencia en algunas regiones de todos los continentes (Correa y Coral, 2022). En América del sur la sequía está causando serios estragos en la agricultura, especialmente en las zonas cultivadas al secano (Paredes et al., 2014, Purcell, 2022), y el Perú, siendo un país de este continente no es ajeno a esta realidad, pues estudios muestran que en Perú, debido a los cambios en los patrones de la temperatura, las lluvias no se están distribuyendo uniformemente en la temporada de siembras, sino que se acumulan o escasean en diferentes lugares, con temporadas muy secas y temporadas muy húmedas, ocasionando pérdidas económicas, daños ambientales y problemas sociales (Caira et al., 2021; Correa y Coral, 2022; )

La agricultura es una actividad de alto riesgo por su vulnerabilidad a diferentes factores abióticos como heladas, granizadas, sequías, etc. y la papa que es uno de los principales cultivos en el Perú y el mundo (Zhang et al., 2017, Trujillo – Meza et al., 2022) puede ser afectado por diversos factores bióticos y abióticos, que se traducen en considerables pérdidas de la producción y calidad de tubérculos; uno de esos

factores, el déficit hídrico causado por la escasez de agua dulce, tiene efectos negativos en la producción de la papa, por la afectación a los procesos fisiológicos fundamentales involucrados en la nutrición y almacenamiento de fotosintatos, tales como la fotosíntesis, absorción de nutrientes, transporte a través de xilema y floema, que están asociados al rendimiento (Rudack et al., 2017).

La papa en la región andina se cultiva entre los 3 300 y los 4 300 m s.n.m., principalmente para autoconsumo, aunque también para la venta; sin embargo, desde varios años atrás se conoce que la mayoría de regiones que producen papa, especialmente al secano están siendo cada vez más afectadas por periodos de sequía cada vez más frecuentes (Marmolejo y Ruiz, 2018; United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization [UNESCO], 2020; Rivadeneira et al., 2020; Lozano-Povis, 2023) y los modelos climáticos predicen condiciones climáticas extremas con mayor probabilidad; con disminución en la precipitación anual total, con períodos intensos de sequía (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2014). Hijmans (2003) expresó que se prevé que el rendimiento de la papa disminuya hasta un 18%–32% en las próximas décadas.

Aunque existen etapas fenológicas del cultivo de papa, en las cuales éste es más susceptible, todas las etapas de desarrollo de la papa, desde la emergencia hasta la iniciación del tubérculo y el crecimiento del tubérculo, son sensibles a la sequía (Schafleitner et al., 2007) con algunos pocos genotipos capaces de tolerar el agobio por déficit hídrico (Ibrahim et al., 2023) pero con la necesidad de incorporar esa tolerancia a las variedades más comerciales. El cambio climático impone dificultades y limitaciones para el cultivo y el desarrollo de las plantas y por tanto implica un reto para el desarrollo de material vegetal con tolerancia.

Estamos ante la necesidad de realizar investigaciones conducentes a la búsqueda de tolerancia a los factores abióticos que merman fuertemente la producción del cultivo de papa; pero de otro lado, con el avance de la ciencia y la tecnología, actualmente es posible hallar soluciones a los problemas de la agricultura mediante el uso de la biotecnología que tiene la ventaja de reducir el tiempo y recursos para el hallazgo de nuevas alternativas tecnológicas. La variación somaclonal es una de las herramientas biotecnológicas que se ha utilizado desde hace varios años en programas de mejoramiento genético de los cultivos económicamente más importantes del mundo (entre ellos la papa) para el desarrollo de genotipos resistentes o tolerantes a diferentes factores estresantes bióticos y abióticos (Perera et al., 2010; Ferreira et al., 2023). En tal sentido, este trabajo busca conocer la probabilidad de obtener tolerancia a estrés por déficit hídrico en papa mediante la inducción de variación somaclonal en plantas regeneradas por embriogénesis somática, identificando el explante más eficiente para lograr calogénesis y posterior regeneración.

En consecuencia, el objetivo general de este estudio es obtener un 2% de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con tolerancia a estrés por déficit hídrico, mediante la inducción de variación somaclonal en plántulas regeneradas por embriogénesis somática; y los objetivos específicos son: (1) determinar el explante más eficiente para realizar embriogénesis somática en papa, y (2) obtener un 2% de plántulas in vitro de papa generadas por embriogénesis somática con tolerancia a estrés por déficit hídrico, a partir del explante más eficiente para producir calogénesis.; a fin de evaluar la hipótesis general de que “existe una probabilidad inferior al 2% de obtener tolerancia a estrés por déficit hídrico en papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante la inducción de variación somaclonal en plántulas

regeneradas por embriogénesis somática”; y las hipótesis secundarias de que “el explante más eficiente para lograr la embriogénesis somática en papa es la yema”; y de que, “existe una probabilidad de menos de 2% de obtener plántulas in vitro de papa con tolerancia a estrés por déficit hídrico mediante variación somaclonal, generadas por embriogénesis somática a partir del explante más eficiente para producir callogénesis.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

Jiménez et al. (2009) en Colombia, en la investigación titulada “Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales”, evaluaron el efecto de tres reguladores del crecimiento, la zeatina ribósido, ácido naftalénacetico y ácido gibérelico, en balances específicos, sobre la callogénesis, la regeneración y el número de brotes producidos por explante en la variedad de papa Pastusa suprema. La presencia de ácido naftalénacetico demostró ser esencial en la respuesta callogénica y regenerativa de los explantes. En esta investigación encontraron que la adición de 3,0 mg/L de zeatina ribósido, 0,02 mg/L de ácido naftalénacetico y 1,0 mg/L de ácido giberélico sobre un medio básico Murashige y Skoog, 1962 (MS), produce callogénesis y regeneración en porcentajes mayores al 90%.

Kumlay & Ercisli (2015) en Turquía, realizaron un trabajo de investigación titulado “Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions”, y estudiaron el efecto y concentraciones de reguladores del crecimiento para la inducción de callos, y la regeneración de brotes en papa. Los callos mejor conformados fueron obtenidos utilizando el medio MS, conteniendo 3.0 mg/L de benzil amino purina (BAP) y 2.0 mg/L de ácido naftalenacético (ANA); y el medio más favorable para la inducción de brotes a partir de callos fue el MS, suplementado con elevada concentración de BAP y kinetina (2.0 mg/L) juntamente con una baja concentración de ácido giberélico 3 y ANA (0.25 mg/L). Los mencionados autores afirman que las combinaciones favorecieron el proceso de organogénesis de brotes.

Pola-Sánchez y Santiz-Gómez (2019), realizaron un trabajo de callogénesis titulado, “Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annuus* L.)”, y evaluaron el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/L de AIA en la inducción de callos a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y raíz de *Helianthus annuus* L. utilizando el medio Murashige y Skoog (MS). En este estudio, realizado en Chiapas – México, todas las concentraciones evaluadas de AIA indujeron la formación de callos en los diferentes tipos de explantes utilizados; sin embargo, la concentración de 0.1 mg/L tuvo mayor efecto con 75% de respuesta de callogénesis, seguido de la concentración de 0.5 mg/L con 58.9% y finalmente 55.6% con 1 mg/L. En tal sentido, la utilización de AIA es una buena alternativa para la aplicación en protocolos para la inducción de callogénesis, especialmente con explantes de raíz en los que se obtuvo mayor inducción; 100% de callogénesis en concentraciones de 0.1 mg/L. Por otro lado, el AIA indujo organogénesis directa en explantes de cotiledón en esa especie.

En el trabajo de Hernández et al. (2019) realizado en Perú, titulado “Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en "papa amarilla" *Solanum goniocalyx*”, se observó que la obtención de callos embriogénicos se relaciona al tipo de hormona que se utiliza durante su inducción, habiéndose encontrado mayor inducción de callos con la auxina ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y en el caso de las citoquininas son sugeridas la Zeatina, Kinetina, Tiadizuron o la 6-bencilaminopurina (p. 285).

Manlé et al. (2019) en Costa de Marfil, en su trabajo “Effect of Water Stress Induced by Polyethylene Glycol 6000 on Somatic Embryogenesis in Cocoa (*Theobroma cacao* L.)”, evaluaron la respuesta al estrés hídrico simulado con Polietilenglicol 6000 (PEG) en concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100 y 125 g/L, en

las etapas de inducción y proliferación de callo y en embriogénesis somática; observaron que a mayor concentración de PEG, se redujo la producción de embriones somáticos; en sus evaluaciones identificaron genotipos sobresalientes (C1 y C14) y concluyeron que el estudio proporciona una base consistente para la selección de genotipos tolerantes al estrés por déficit hídrico.

Sunaryo et al. (2016) en Indonesia, realizaron un trabajo significativo titulado “Drought tolerance selection of soybean lines generated from somatic embryogenesis using osmotic stress simulation of poly-ethylene glycol (PEG)”, seleccionaron líneas de soya con tolerancia a la sequía generadas a partir de embriogénesis somática, mediante simulación de estrés osmótico producido con polietilenglicol (generando una disminución de 0.41 MPa al potencial osmótico del medio de cultivo); este trabajo se basó en la variación somaclonal como fuente alternativa para la creación de variabilidad genética. Los resultados mostraron alteración de la sensibilidad a la sequía causada por la embriogénesis somática bajo estrés, permitiendo la posterior selección de genotipos tolerantes, siendo el genotipo Tidar seleccionado como de tolerancia moderada al estrés por PEG 15%, a pesar de que su forma convencional era sensible.

Millones y Vásquez (2022) en Amazonas – Perú, en el trabajo “Tolerancia *in vitro* de cultivares de *Rubus* spp. a estrés hídrico simulado con manitol”, evaluaron la respuesta morfológica y fisiológica *in vitro* de explantes en tres cultivares y una accesión silvestre de *Rubus* spp. bajo condiciones de estrés por déficit hídrico, la cual simularon utilizando manitol. Emplearon un diseño completamente al azar con arreglo factorial (Factor A: cuatro genotipos y Factor B: potenciales hídricos simulados con manitol: 0, -0,2, -0,3 y -0,4 MPa) y cuatro explantes por unidad experimental. En el estudio, los cultivares Navaho y Tupy tuvieron una mejor

respuesta con potenciales hídricos disminuidos en -0.4 Mpa con manitol y permitieron identificarlos como tolerantes al estrés por déficit hídrico simulado con manitol en la fase vegetativa.

Hanász et al. (2022) realizaron un trabajo de investigación en Hungría; y demostraron la utilidad del estrés hídrico simulado para realizar comparaciones del comportamiento de diferentes genotipos de papa a estrés osmótico inducido mediante la adición de Polietilenglicol 6000 (5.0, 7.5, 10.0%, p/v). D-manitol (0,1, 0,2, 0,3 M) y Polietilenglicol 600 (2.5, 5.0, 7.5%, p/v) al medio de cultivo Murashige y Skoog 1962. Según sus resultados, los tratamientos con 7,5% y 10% de PEG 6000 y también los tratamientos de 0,2 M y 0,3 M de D-manitol demostraron ser adecuados para la selección de genotipos tolerantes al estrés osmótico.

Massa et al. (2024) en Siria, realizaron la investigación “Clonal Selection for Salinity Tolerance in Some Potato (*Solanum tuberosum*) Varieties by Callus Culture”; en este trabajo, indujeron la producción de callo a partir de diferentes tipos de explantes, en tres variedades de papa y la regeneración posterior a partir de callos estresados por salinidad, utilizando cloruro de sodio a 50, 100 y 150 mM en medio Murashige-Skoog (MS) con el propósito de producir y seleccionar líneas tolerantes al estrés hídrico generado de esa manera; comprobando de esta manera la posibilidad de utilizar la variación somaclonal para desarrollar nuevos genotipos diferentes de las variedades madre con tolerancia a estreses ambientales.

## **2.2. Bases teóricas**

Dorani et al. (2024) expresa que la variación somaclonal genera líneas genotípicas mediante herramientas nuevas y diferenciadas que facilitan la aparición

de variación genética o epigenética en las plantas y que puede ser seleccionada en busca de resistencia o tolerancia a factores estresantes.

### **2.2.1. Control hormonal en las plantas**

Porta y Jimenez – Nopala (2019) expresan que las hormonas vegetales son moléculas de señalización sintetizadas por las plantas y localizadas en los diferentes tejidos de las plantas; donde, en función de su concentración y ubicación, median el desarrollo armonizado y la reacción bioquímica y estructural al estrés por factores bióticos y abióticos, pero también regulan su crecimiento como parte de su desarrollo y como respuesta a las señales ambientales. Buchanan et al. (2015) dan a conocer que las hormonas vegetales controlan la gran mayoría de los procesos fisiológicos y bioquímicos como la división celular, el crecimiento, la diferenciación de los órganos aéreos y de las raíces; también regulan la embriogénesis, la germinación de las semillas, la floración, la formación del fruto, la caída de las hojas y la senescencia.

También Su et al. (2015) mencionan que la formación de callos embriogénicos se induce a partir de explantes mediante un tratamiento exógena con la hormona auxina, que debe luego eliminarse para estimular la embriogénesis somática. Y según Wójcikowska et al. (2013) al parecer, la eliminación de la auxina exógena permite el aumento de los niveles de auxina endógena, un proceso necesario para la iniciación del embrión somático. También sobre este aspecto Wójcikowska et al. (2013) manifiestan que cuando se elimina la auxina exógena (la del medio de cultivo), se activa la expresión de genes como YUCCA2 y YUCCA4, que codifican enzimas que participan en la biosíntesis de auxina incrementando sus niveles endógenos.

Su et al. (2015) señalan que es bien conocido que la auxina y la citoquinina son reguladores clave para el proceso de embriogénesis somática. Asimismo, Su et al. (2020) indican que la auxina es una hormona central para inducir embriogénesis

somática, y los genes involucrados en la biosíntesis y señalización de esta hormona se encuentran altamente expresados en las células totipotentes necesarias para la embriogénesis somática. Salaün et al. (2021) afirman que el tratamiento de tejidos vegetales con auxina implica tanto un estrés que genera una respuesta de biosíntesis y genera una vía de señalización, que conduce a una reprogramación transcripcional y remodelación de la cromatina necesarios para la formación de un embrión somático, y la inducción de embriogénesis somática, así como la organogénesis y la regeneración vegetal, dependen también de la adición de citoquininas.

### **2.2.2. Sistemas de control en la dediferenciación y regeneración de tejidos vegetales**

Para Su et al. (2020), la reprogramación de células somáticas para volverse células totipotentes o pluripotentes es fundamental en la regeneración vía embriogénesis somática u organogénesis de novo; mencionan también que la regulación para que el proceso se lleve a cabo puede ser inducido hormonalmente, por reguladores transcripcionales y por estrés. Según los mismos autores, la elevada acumulación de calosa entre la membrana plasmática y las paredes celulares de las células epidérmicas que luego originan los embriones somáticos, sugiere que para la reprogramación de células al estado totipotente, es necesario interrumpir la comunicación célula a célula.

Mozgová et al. (2017) reportaron que un factor importante, que tiende a evitar la reprogramación mediante dediferenciación es el complejo de histonas metiltransferasa POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX2 (PRC2), pues en su ausencia ocurre activación ectópica de programas de embriogénesis tardía en las células somáticas de los tejidos vegetativos, con expresión de genes de maduración embrionaria y acumulación ectópica de moléculas de almacenamiento embrionario.

Hugues et al. (2020) dio a conocer que el PRC2 media la represión transcripcional que tiende a ser perpetuada para proteger la identidad celular durante la replicación de la cromatina por H3K27me3 (marca genética: trimetilación de lisina 27 en la histona 3), en la fase S de la división celular; en tal sentido, los cambios de identidad celular están asociados a la regulación del silenciamiento de genes mediado por PRC2, siendo la fase S de la división celular la ventana de oportunidad para la reprogramación transcripcional que define el destino celular.

Su et al. (2020) expresaron adicionalmente, que varios factores de transcripción también participan en la regulación, conducente a la reprogramación celular. Así, la expresión de LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), LEAFY COTYLEDON2 (LEC2), FUSCA3 (FUS3), ABA INSENSITIVE3 (ABI3), BABY BOOM (BBM), AGAMOUSELIKE 15 (AGL 15) y WUSCHEL (WUS), provoca la reprogramación de células somáticas a embrionarias. También se conoce que la expresión ectópica de genes responsables de la identidad meristemática en los embriones, como WUS, LEC1 y LEC2, induce embriogénesis somática en ausencia de auxina exógena. Niveles relativamente bajos de la proteína BBM inhiben la diferenciación celular, niveles intermedios inducen la formación de órganos, y niveles altos de esta proteína inducen la embriogénesis somática.

Tang et al. (2020) concluyen que la investigación actual conduce a la deducción de que la expresión de genes de identidad embrionaria y la acumulación de auxina endógena son necesarias para el control de la reprogramación de células somáticas a totipotentes en la embriogénesis somática, porque los genes de identidad determinan la acumulación de competencia embrionaria en células somáticas, que también necesitan acumular altos niveles de auxina para promover la transición del destino

celular hacia células totipotentes y están involucrados en la evocación de la embriogénesis somática.

### **2.2.3. Embriogénesis somática**

Salaün et al. (2021) explican que la embriogénesis somática es un proceso bastante complejo de propagación clonal, que involucra a la totipotencia de las células vegetales, proceso mediante el cual las plantas pueden dar lugar a la formación de embriones sin pasar por los procesos de meiosis ni fertilización y que puede ocurrir de manera espontánea o en respuesta a condiciones ambientales específicas. Facilita la multiplicación clonal de genotipos élite de manera rápida y eficiente; pero también es utilizada para los protocolos de transformación genética de especies agronómicas.

Davies et al. (2017) indican que la embriogénesis somática puede desarrollarse directamente a partir de células preembrionarias presentes en tejidos jóvenes como hipocótilos o cotiledones de plántulas; o puede llevarse a cabo a través de una etapa previa de callogénesis, que implica la reprogramación de células somáticas por dediferenciación de tejidos vegetales, y la posterior regeneración mediante la formación de embrioides o embriones somáticos bajo manejo hormonal inducido específico.

Salaün et al. (2021) manifiestan que la embriogénesis somática generalmente es inducida en condiciones *in vitro* por estrés sobre los tejidos de la planta; este estrés, puede tomar diferentes formas; un alto nivel de hormonas vegetales en el medio de cultivo es el más utilizado, pero también puede utilizarse heridas, pH extremo, choque osmótico o térmico, o tratamientos con diferentes productos químicos. Las primeras etapas de la embriogénesis somática se caracterizan por la inducción de la expresión de muchos genes relacionados con el estrés y especialmente a los que

codifican factores de transcripción. Los embriones somáticos se pueden inducir directamente a partir de tejidos vegetales cultivados in vitro en un medio bajo en auxina, o indirectamente mediante el cultivo de tejidos embriogénicos, en un medio rico en auxina que conduce a la transición a embriones somáticos al cambiar a un medio bajo en auxina.

Ribeiro (2018) menciona que las células y el ciclo celular experimentan estrés durante el proceso de embriogénesis somática indirecta, pues la etapa previa de formación de callo incrementa el metabolismo aeróbico para aumentar la proliferación celular; esto da lugar al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en Inglés); por lo tanto, los tejidos involucrados en el proceso, producen varias proteínas reguladoras asociadas primero al ciclo de división celular y al metabolismo aeróbico, y posteriormente a la defensa contra el estrés oxidativo y al reciclaje y restauración proteica.

#### **2.2.4. Mejoramiento vegetal para estrés abiótico mediante embriogénesis somática**

Joshi et al. (2022) afirman que las plantas tienen propiedades regenerativas con células somáticas individuales o grupos de ellas capaces de dar lugar a plantas completamente formadas. Uno de los medios de regeneración es la embriogénesis somática, mediante la cual se forma una estructura embrionaria que da lugar a una plántula. Comprender los mecanismos de inducción y desarrollo de embriones somáticos es importante como un modelo más accesible para el desarrollo de semillas para la producción pero también para la obtención de cultivos modificados para enfrentar los desafíos agrícolas. Es necesaria la regeneración de las células transformadas, así como la investigación básica para comprender la función de los genes.

## **2.3. Definición de términos básicos**

### **2.3.1. *Solanum tuberosum* L.**

Rodríguez et al. (2009) expresa que la papa *Solanum tuberosum* L. es una especie vegetal de la familia Solanaceae. Sus tubérculos constituyen uno de los alimentos más importantes del mundo. Tanto la papa silvestre, así como la cultivada crecen desde el suroccidente de Estados Unidos hasta el sur de Chile.

Según Rudack et al. (2017), la papa es más susceptible a la sequía que otras especies cultivadas importantes. Marmolejo y Ruiz (2018) informan que en la región andina se cultiva entre los 3 300 y los 4 300 m s.n.m., principalmente para autoconsumo. Sin embargo, desde varios años la mayoría de regiones que producen papa, especialmente al secano están siendo cada vez más afectadas por periodos de sequía cada vez más frecuentes. La variedad INIA 302 Amarilis es una de las variedades más cultivadas en el Perú, especialmente en el norte.

### **2.3.2. Estrés por déficit hídrico y tolerancia**

Moreno (2009) da a conocer que el estrés por déficit hídrico se produce en los vegetales como una respuesta a un ambiente escaso en agua, en el cual la tasa de transpiración es mayor que la toma de agua, y que se puede producir por bajas temperaturas y por elevada salinidad del suelo. Tardieu et al. (2018) indica que la tolerancia al estrés por déficit hídrico en las especies cultivadas, es la capacidad de las plantas para mantener la biomasa, crecimiento o producción bajo escasa disponibilidad de agua.

### **2.3.3. Mejoramiento vegetal por variación somaclonal**

Arzate-Fernández et al., (2022) respecto al cultivo de tejidos vegetales, menciona que éste tiene el potencial para generar variabilidad genética; es decir,

variaciones somaclonales como resultado de mutaciones genéticas o cambios en las marcas epigenéticas; mencionan que el proceso de rediferenciación celular al que es sometido el tejido vegetal en el medio de cultivo puede provocar cambios genéticos y fenotípicos y dichas alteraciones son llamadas variación somaclonal. Los avances realizados en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han hecho posible la regeneración de varias especies hortícolas *in vitro*. Krishna et al. (2016) sostienen que la variación somaclonal ha brindado una herramienta nueva y alternativa a los mejoradores de plantas para obtener variabilidad genética con relativa rapidez y sin tecnología sofisticada en los cultivos agronómicos; en ese sentido, la organogénesis indirecta es una técnica importante para lograr variación genética y reproducir somaclones con características agronómicas o industriales deseables.

#### **2.3.4. Desdiferenciación celular**

Para Tombion (2023) es la transformación y pérdida de las características de especialización de una célula para dar lugar a células de tipo meristemático.

Según Hartmann et al. (2014) es el proceso mediante el cual se expresa la capacidad que tienen células diferenciadas y previamente desarrolladas, para dar inicio a divisiones celulares conducentes a la formación de un nuevo punto de crecimiento meristemático.

#### **2.3.5. Callo**

Conforme a lo señalado por Furusaki & Takeda (2011) son células desdiferenciadas de plantas, agregadas de manera irregular.

#### **2.3.6. Callogénesis**

Para Sánchez-Calvo y Alvarenga-Venutolo (2015) es la formación de una masa de células no diferenciadas a partir de un explante *in vitro*, inducida mediante manejo hormonal; pero también puede ocurrir de manera natural, inducido por factores que

alteren el balance hormonal, incrementando las concentraciones de las hormonas auxina y citocinina.

### **2.3.7. Cultivo *in vitro* en plantas**

Hartmann et al. (2014) explican que es el manejo para el crecimiento de órganos o tejidos vegetales en condiciones asépticas en las que el medio ambiente y los niveles de nutrientes y hormonas para el crecimiento están estrictamente controlados. El cultivo de tejidos es aplicado en varias áreas de la ciencia de las plantas, incluida la fisiología, producción de compuestos naturales y farmacéuticos, fitopatología, preservación de germoplasma, mejoramiento, recuperación de plantas transgénicas y propagación.

### **2.3.8. Embriogénesis somática**

Sharp et al. (1980) afirman que la embriogénesis somática es el desarrollo de un embrión a partir de una sola célula vegetativa, la cual en su desarrollo alcanza la bipolaridad de meristemos de raíces y brotes en una etapa temprana.

### **2.3.9. Embrioides o embrión somático**

Furusaki & Takeda (2011) indican que los embrioides o embriones somáticos son un conjunto de tejidos que se generan a partir de células somáticas o callos y siguen el desarrollo de los embriones zigóticos, con el potencial de plantas intactas.

### **2.3.10. Explante**

Según Merriam-Webster (2023) es el tejido o tejidos vivos removido de un organismo y colocado en un medio para ser cultivado. Furusaki & Takeda (2011) lo definen como parte de una planta utilizada para cultivo.

### **2.3.11. Variación somaclonal**

Patiño (2010, p. 7) lo define de la siguiente manera: “la variación somaclonal es un fenómeno natural que ocurre en los procedimientos de cultivo de tejidos, a través del cual pueden recuperarse mutantes con o sin ventajas adaptativas”.

# CAPÍTULO III

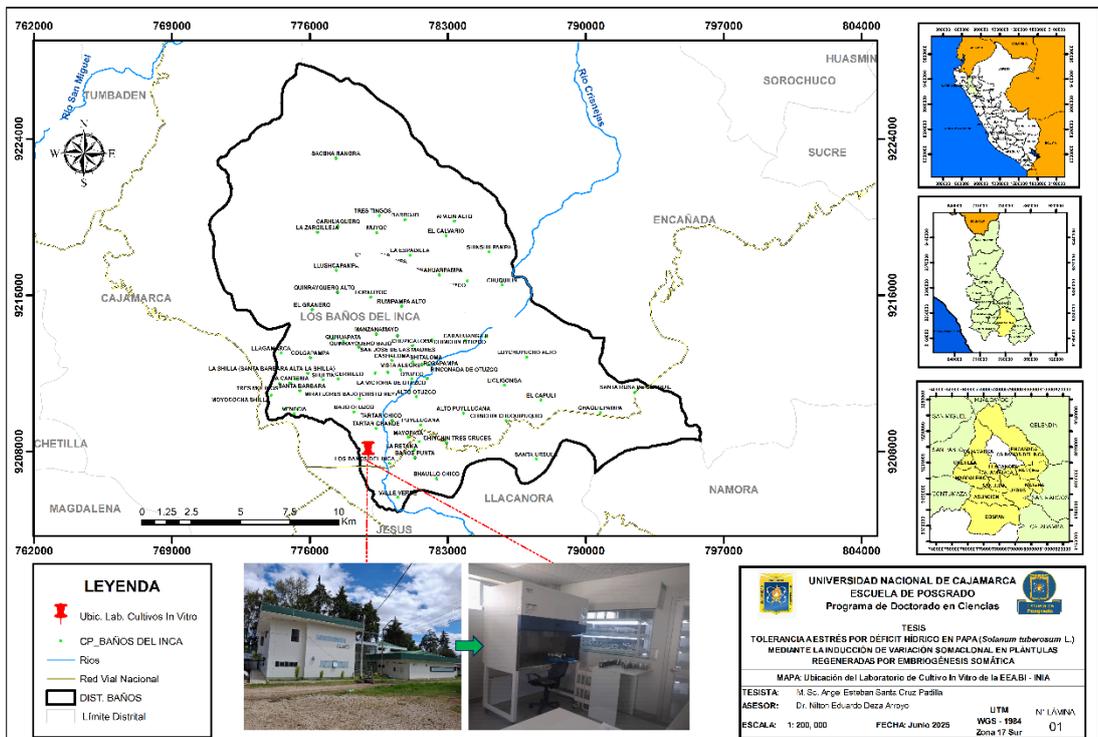
## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Ubicación geográfica

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo In Vitro de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca – Instituto Nacional de Innovación Agraria, ubicado en el Distrito Baños del Inca, Provincia de Cajamarca, a una altitud de 2665 m s.n.m. Latitud: 07°09’39” Sur. Longitud: 78°27’43” Oeste. El lugar se caracteriza por tener una temperatura promedio de 14.3 °C, humedad relativa entre 40 a 60%, presión atmosférica de 740 milibares. El siguiente mapa detalla su ubicación geográfica.

**Figura 01**

*Mapa de ubicación geográfica del Laboratorio de Cultivo In Vitro de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca - INIA.*



## **3.2. Equipos y materiales**

### **3.2.1. Material experimental**

Plántulas in vitro de la variedad de papa INIA 302, proporcionadas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria.

### **3.2.2. Equipos:**

- a. Agitador magnético
- b. Autoclave
- c. Balanza analítica
- d. Cámara de flujo laminar
- e. Computadora
- f. Destilador de agua
- g. Estufa
- h. Potenciómetro
- i. Refrigeradora
- j. Timer
- k. Tubos fluorescentes

### **3.2.3. Material de vidrio:**

- a. Beaker de 1000 mililitros
- b. Pipetas de 1 mililitros
- c. Pipetas de 5 mililitros
- d. Pipetas de 10 mililitros
- e. Pipetas Pasteur
- f. Probetas de 100 mililitros
- g. Probetas de 1000 mililitros
- h. Baguetas

- i. Placas Petri de 150 x 15mm
- j. Matraces Erlenmeyer de 250 mililitros
- k. Frascos de vidrio para cultivo in vitro
- l. Mechero de alcohol

#### **3.2.4. Material quirúrgico:**

- a. Mango de bisturí N° 7
- b. Pinzas de laboratorio de 15 centímetros
- c. Hoja de bisturí N° 11

#### **3.2.5. Insumos para medios de cultivo**

- a. Sales de medio Murashigue y Skoog 1962
- b. Ácido naftalenacético
- c. Ácido giberélico
- d. 6 Bencil aminopurina
- e. Ácido clorhídrico 0.1 N
- f. Hidróxido de sodio 0.1 N
- g. Sacarosa
- h. Manitol
- i. Agar
- j. Agua destilada

#### **3.2.6. Material de escritorio**

- a. Papel bond de 80 gramos
- b. Lápices
- c. Lapiceros
- d. Marcadores de tinta indeleble
- e. Regla graduada

### 3.2.7. Otros materiales

- a. Cámara fotográfica
- b. Algodón
- c. Papel aluminio
- d. Parafilm

### 3.3. Metodología

El trabajo de investigación consistió de tres etapas:

- 3.3.1. Primera etapa.** 20 plántulas in vitro de la variedad de papa INIA 302 Amarilis proporcionadas por el laboratorio de Cultivo In Vitro de la Estación Experimental Agraria Baños del Inca fueron micropropagadas (Figura 02) en dos oportunidades; a los 04 días de recibidas y luego un mes después, hasta obtener aproximadamente 400 plántulas in vitro de unos 8 cm de longitud, suficientes para proveer los 1000 explantes necesarios para el trabajo de investigación.

#### Figura 02

*Micropropagación de plántulas de papa variedad INIA 302 AMARILIS.*



A partir de las plántulas micropropagadas (400 unidades), el día 09 de agosto de 2023, se obtuvo un total de 1000 explantes: 200 de yema, 200 de porción de tallo, 200 de porción de hoja, 200 de porción de raíz, y 200 de ápice de raíz. Los explantes anteriormente mencionados fueron colocados asépticamente en un medio de cultivo Murashigue y Skoog (M.S.) 1962, modificado con un balance hormonal consistente en 3.0 ppm de 6-bencil amino purina (BAP) y 2.0 ppm de ácido naftalenacético (ANA) y posteriormente colocados a incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 19 días, con el propósito de inducir el proceso de callogénesis. Los tratamientos correspondientes a esta etapa de la investigación se muestran en la Tabla 01.

**Tabla 01**

*Tratamientos en estudio para la primera etapa de la investigación*

Tratamiento		Descripción
N°	Código	
T1	E1	Porción de hoja en medio de cultivo para callogénesis
T2	E2	Porción de tallo en medio de cultivo para callogénesis
T3	E3	Yema en medio de cultivo para callogénesis
T4	E4	Ápice de raíz en medio de cultivo para callogénesis
T5	E5	Porción de raíz en medio de cultivo para callogénesis

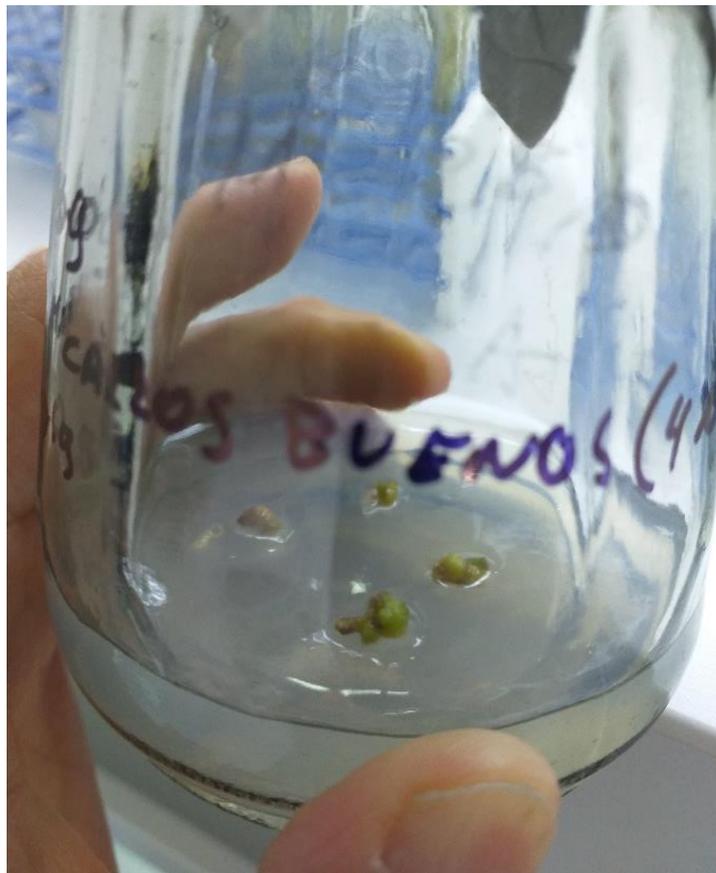
*Nota.* Se muestra la descripción de cada tipo de explante utilizado como tratamiento. Elaboración propia (2024)

Al final de esta etapa se evaluó los explantes desdiferenciados convertidos en callos (Fig. 03), según su procedencia y según las siguientes categorías:

- Callos bien conformados
- Callos parcialmente desarrollados
- Explantes muertos o sin formación de callo (eliminados)

### Figura 03

*Obtención de callos bien conformados a partir de explantes de yema de la variedad de papa INIA 302 Amarilis.*



**3.3.2. Segunda etapa.** El día 28 de agosto de 2023, tras el proceso de evaluación de los explantes, se seleccionó los **callos bien conformados** (324 unidades) y los **callos parcialmente desarrollados** (352 unidades) provenientes de la primera etapa (inducción de callogénesis). Éstos, **según el explante de origen** (E1, E2, E3, E4, E5), fueron colocados en medio de cultivo Murashigue y Skoog (M.S.) 1962, modificado con un balance

hormonal para inducir regeneración mediante embriogénesis somática, bajo **dos condiciones de estrés** por déficit hídrico simulado in vitro. El balance hormonal utilizado fue de 0.25 ppm de la citocinina 6-benzil amino purina, y 0.25 ppm de ácido giberélico 3 (AG3). La intensidad luminosa utilizada fue de 3000 lux, condiciones de iluminación utilizadas exitosamente en la regeneración embriogénica de papa en otros trabajos (Babadjanova, et al., 2023). Las condiciones de estrés por déficit hídrico fueron simuladas utilizando el azúcar alcohol “manitol”, con dos concentraciones distintas para lograr dos niveles de disminución de potencial hídrico; 44.59 g/L para alcanzar -0.6 MPa de disminución del potencial hídrico, y 66.88 g/L para -0.9MPa de disminución del potencial hídrico. Los tratamientos se presentan en la **Tabla 02**.

Después del proceso de inducción a regeneración de plantas por embriogénesis somática se obtuvo 02 plántulas; las plántulas regeneradas bajo condiciones de estrés por déficit hídrico a partir de los callos fueron posteriormente micropropagadas con el propósito de incrementar su cantidad. La micropropagación para la clonación e incremento del material vegetal regenerado se realizó durante cuatro meses, utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962 (M.S) sin aplicación externa de hormonas, y las plántulas obtenidas al final del proceso (18 plántulas in vitro por cada plántula regenerada), fueron utilizadas en la siguiente etapa de la investigación, que consistió en comparar los clones obtenidos con plántulas que no recibieron tratamiento alguno, respecto a su capacidad de tolerar al estrés osmótico.

**Tabla 02***Tratamientos en estudio para la segunda etapa de la investigación*

Tratamiento		Descripción
N°	Código	
T1	M1C1E1	Callos bien conformados, provenientes de tejido foliar, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T2	M1C1E2	Callos bien conformados, provenientes de tallo, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T3	M1C1E3	Callos bien conformados, provenientes de yema, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T4	M1C1E4	Callos bien conformados, provenientes de ápice de raíz, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T5	M1C1E5	Callos bien conformados, provenientes de tejido radicular, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T6	M1C2E1	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tejido foliar en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T7	M1C2E2	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tallo, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T8	M1C2E3	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de yema, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T9	M1C2E4	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de ápice de raíz, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T10	M1C2E5	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tejido radicular, en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T11	M2C1E1	Callos bien conformados, provenientes de tejido foliar, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T12	M2C1E2	Callos bien conformados, provenientes de tallo, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T13	M2C1E3	Callos bien conformados, provenientes de yema, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T14	M2C1E4	Callos bien conformados, provenientes de ápice de raíz, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T15	M2C1E5	Callos bien conformados, provenientes de tejido radicular, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T16	M2C2E1	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tejido foliar, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T17	M2C2E2	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tallo, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T18	M2C2E3	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de yema, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T19	M2C2E4	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de ápice de raíz, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T20	M2C2E5	Callos parcialmente desarrollados, provenientes de tejido radicular, en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol

*Nota.* Se muestra la descripción de cada tratamiento; siendo M, el medio de cultivo modificado con dos concentraciones de manitol; C, el tipo de callo; y E, el tipo de explante de origen del callo respectivo. Elaboración propia (2024).

**3.3.3. Tercera etapa de la investigación.** Después del proceso de micropropagación de las plántulas regeneradas en medio de cultivo M.S. 1962; los clones obtenidos, fueron identificados como **AmarilisAESP1** (las plántulas procedentes del tratamiento M2C1E3) y **AmarilisAESP2** (plántulas procedentes del tratamiento M1C1E3). Las 18 plántulas *in vitro* de cada clon, y las plántulas testigo (plántulas sin tratamiento previo especial). fueron sembradas en un medio de cultivo M.S. 1962, con dos niveles de déficit hídrico simulado (disminución de 0.6 MPa y 0.9 MPa al medio Murashigue y Skoog, 1962) utilizando manitol (44.59 g/l y 66.88 g/l respectivamente) (Fig. 04). Las plántulas testigo de la variedad INIA 302 Amarilis, provinieron de un cultivo *in vitro* utilizando el medio Murashigue y Skoog, a una temperatura ambiente y 3000 lux de intensidad luminosa. Los tres grupos de plántulas (AmarilisAESP1, AmarilisAESP2, Plantas Testigo), fueron sometidos a dos niveles de estrés simulado *in vitro* y fueron comparadas por su tolerancia a tales condiciones, evaluando para ello la longitud de la planta desde la superficie del medio de cultivo hasta el ápice caulinar. Considerando que se contaba con material vegetal potencialmente valioso, las mediciones se realizaron desde el exterior del envase de vidrio, para evitar la contaminación. Los tratamientos para esta etapa se describen en la Tabla 03.

Además de la evaluación del crecimiento de las plantas en condiciones de estrés hídrico simulado *in vitro*, se evaluó de manera descriptiva la apariencia general de las plántulas.

#### Figura 04

Plántulas de dos clones obtenidos mediante variación somaclonal y plántulas testigo, sometidas a estrés por déficit hídrico simulado utilizando manitol.



Nota. 1. Clon AMARILISAESP1, 2 Clon AMARILISAESP2, T=Testigo.

#### Tabla 03

Tratamientos en estudio para la tercera etapa de la investigación

Tratamiento		Descripción
N°	Código	
T1	M1P1	Plántulas regeneradas del tratamiento M2C1E3 en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T2	M1P2	Plántulas regeneradas del tratamiento M1C1E3 en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T3	M1T	Plántulas testigo cultivadas en medio M.S. con 44.59 g/L de manitol
T4	M2P1	Plántulas regeneradas del tratamiento M2C1E3 en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T5	M2P2	Plántulas regeneradas del tratamiento M1C1E3 en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol
T6	M2T	Plantas testigo cultivadas en medio M.S. con 66.88 g/L de manitol

Nota. Se muestra la descripción de cada tratamiento, siendo M el medio de cultivo estresante, P los clones en estudio y T las plantas testigo. Elaboración propia (junio 2024).

La evaluación se realizó mediante observación y conteo del número de explantes que experimentaron callogénesis y el tipo de callo al que dieron origen (callo bien conformado o parcialmente desarrollado); también se evaluó de la misma manera la regeneración por embriogénesis somática, observando el número de explantes que experimentaron diferenciación, según el tipo de explante de procedencia, y posteriormente el número de plántulas procedentes de embriogénesis somática, y desarrolladas en condiciones de estrés por déficit hídrico. Finalmente, se realizó una comparación de las plántulas o explantes obtenidos mediante callogénesis y posterior embriogénesis somática, respecto a su capacidad para soportar estrés por déficit hídrico, con plántulas in vitro que no fueron sometidas a inducción de variación somaclonal (plántulas o explantes testigo). Finalmente, para analizar la información se recurrió a los resultados del procesamiento de los datos, utilizando el programa estadístico “R”, y se expresó la información en cuadros. La información nos permitió conocer la respuesta de los diferentes tejidos para formar embriones y para generar tolerancia a estrés por déficit hídrico.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera etapa, tras el proceso de micropropagación de plántulas de papa de la variedad INIA 302 Amarilis en el laboratorio y la inducción al proceso de desdiferenciación, se obtuvo los resultados referidos a la respuesta de 1000 explantes, según el tipo, al proceso de inducción de callogénesis; teniendo por variable respuesta, la formación de callo bien conformado, callo parcialmente desarrollado, o la no formación de callo.

Los resultados en la segunda etapa del trabajo, mostraron la capacidad de regeneración (formación de plántulas) de los callos obtenidos en la primera etapa sometidos a dos condiciones de estrés por déficit hídrico simulado *in vitro* con la aplicación de manitol.

En la tercera etapa, tras un proceso de micropropagación para incrementar el número de plántulas por cada clon obtenido en la segunda etapa, se sometieron las mismas a un proceso de comparación bajo dos condiciones de estrés por déficit hídrico simulado, los datos de evaluación mostraron la capacidad de crecimiento de las plántulas frente a las diferentes condiciones de estrés por déficit hídrico simulado *in vitro*.

#### **4.1. Inducción callogénica de explantes de papa**

Los datos de la Tabla 4 muestran que de los 1000 explantes iniciales, el 32.4 % dieron origen a callos bien conformados, es decir muestran tejido desdiferenciado en toda su estructura; y el 35.2 % originaron callos parcialmente desarrollados, mostrando estructuras aún no desdiferenciadas (Fig. 05). La Tabla 4 también da a conocer que los explantes con mayor porcentaje de

formación de callos bien conformados fueron las yemas con 93.5 % de sus explantes transformados en callos bien conformados; y los ápices de raíz, con el 47.5 % de sus explantes bien desdiferenciados.

Los resultados antes mencionados eran previsibles debido a que ambos tipos de explantes (yemas y ápices de raíz) están constituidos por tejidos jóvenes, no diferenciados o poco diferenciados; por tanto, no afectados por genes que reprimen la desdiferenciación (Ikeuchi et al., 2015).

**Tabla 04**

*Respuesta de cinco tipos de explantes a la inducción callogénica con medio M.S. más 3.0 ppm de BAP, y 2.0 ppm de ANA, en oscuridad.*

Explante inicial		Respuesta callogénica		
Descripción	Código	Callos bien conformados	Callos parcialmente desarrollados	Explantes muertos o sin callo
Porción de Hoja	E1	10	97	93
Porción de tallo	E2	21	124	55
Yema	E3	187	9	4
Ápice de raíz	E4	95	19	86
Porción de raíz	E5	11	103	86
<b>Total</b>		<b>324</b>	<b>352</b>	<b>324</b>

*Nota.* Se muestra el número de callos bien conformados, callos parcialmente desarrollados o explantes sin respuesta callogénica, tras 19 días de inducción (Elaboración propia. Junio 2024)

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo, aunque referidos a otras especies vegetales, han sido reportados por diversos autores en estudios previos. Tal es el caso de Mostafa et al. (2020), quienes, en base a los datos

obtenidos en su investigación, destacaron que los explantes más adecuados para producir callogénesis fueron las puntas de tallo en plantas de ajo (p. 7), las cuales mostraron un comportamiento favorable en comparación a otros tejidos. De igual manera, los investigadores Gurav et al. (2019) encontraron que las yemas laterales mostraron una respuesta mucho mejor a la inducción de desdiferenciación, alcanzando un porcentaje de callos de 79%, cuando fueron comparadas con otros tejidos vegetales más diferenciados.

### Figura 05

*Fotografías de la respuesta de cinco tipos de explantes a la inducción callogénica con medio M.S. más 3.0 ppm de BAP, y 2.0 ppm de ANA, en oscuridad.*



*Nota.* (A) Callo bien conformado, (B) callo parcialmente desarrollado, (C) sin formación de callo (Elaboración propia. Junio 2024)

Desde hace mucho tiempo ha existido el interés por comprender el potencial de las células vegetales para controlar la regeneración de órganos y organismos completos, capacidad que permite su restauración incluso en caso de daños graves; y aunque este potencial de control, aún no ha sido comprendido en su totalidad se ha realizado avances importantes en su comprensión.

Es evidente que en los tejidos diferenciados, sanos e intactos, no se forma callo o los tejidos no se desdiferencian, lo cual indica que las células maduras poseen mecanismos que evitan esa transformación; sin embargo, ante la aplicación de un medio de cultivo con un balance hormonal basado en el incremento de auxinas y citocininas, ocurre una reactivación del ciclo celular que conduce a la desdiferenciación del tejido, en lo cual participan muchos genes clave, pero sin lograr el efecto óptimo o deseado en todos los casos, debido a varios factores, entre los cuales el control genético es fundamental (Ohtani, 2015; Su et al., 2020).

La mejor aptitud de los tejidos jóvenes para desdiferenciarse y la mayor dificultad de los explantes maduros para lograrlo, se explica por las diferencias estructurales y más aún por las diferencias bioquímicas y de control genético a nivel celular de los diferentes tejidos vegetales. En tal sentido, es necesario comprender primero que las células especializadas que se desdiferencian no vuelven al estado de un óvulo fertilizado, ni siquiera al de una célula embrionaria, pero pueden perder algunas de las características especializadas y aumentar la cantidad de componentes subcelulares involucrados en la síntesis de ADN y proteínas (Evert, 2006, p. 110); por lo tanto, se deduce que aunque la desdiferenciación implica la pérdida de especialización, no en todos los casos da lugar a tejidos meristemáticos con las mismas características morfológicas, o con la misma potencialidad regenerativa por la existencia de mecanismos que previenen la desdiferenciación no programada (Ikeuchi et al., 2015, P. 1; Hugues et al., 2020; Mozgová et al., 2017).

Respecto a la estructura, Vanegas-Espinoza et al. (2020) dejan claro que las células diferenciadas poseen una forma y ultraestructura específicas de su

especialización y siendo que las células de los callos tienen forma redonda, pocos organelos, entre otras características propias, y además también bajo grado de diferenciación, se deduce que éstos deben provenir más fácilmente de células con estructura similar.

Ohtani (2015) expresa que en las células de rápido crecimiento y división celular (meristemáticas) el 80 % del ARN es ARNr, pues en estas células se requiere que la transcripción y procesamiento genético sean rápidos y estables; sin embargo, las células aun no desdiferenciadas, para llegar a este estado deberían pasar por alteración previa de expresión génica conducente al incremento tanto de ARNr y ARNm.

Ikeuchi et al. (2015) y Hugues et al. (2020) expresan que la evidencia científica demuestra que la deficiencia del POLYCOMB REPRESIVE COMPLEX 2 (PRC2) conduce a la reactivación mitótica; y además, en su trabajo de investigación demuestran que PRC2 suprime esta capacidad en células maduras, de lo que se deduce que las células maduras manifiestan o expresan dificultad para abandonar el estado de diferenciación celular debido a PRC2, lo cual sustenta los resultados obtenidos en la primera etapa de nuestra investigación.

Basados en sus estudios, Ikeuchi et al. (2015); Mozgová et al. (2017) y Hugues et al. (2020) afirman también que, aunque la desrepresión de los genes PRC2, puede ser la base de la acción de las auxinas y citocininas para la desdiferenciación celular de células diferenciadas; la investigación científica ha demostrado que en el proceso de formación de callos, éstos provienen de células madre presentes en el periciclo y otros tejidos generadores de meristemas, lo cual indica que la formación de callos no implica necesariamente la

desdiferenciación de células somáticas maduras; esto explicaría el mayor porcentaje de formación de callos parcialmente desarrollados provenientes de tejidos con más diferenciación en nuestra investigación. No obstante, lo dicho, los autores dejan como pregunta abierta como es que la falta o carencia de PRC2 en tejidos no diferenciados o poco diferenciados no impide el desarrollo organizado de los organismos vegetales, arguyendo que tal vez estos genes sólo mantienen una decisión transcripcional en vez de tomar esa decisión.

#### **4.2. Inducción para regeneración por embriogénesis somática bajo estrés por déficit hídrico**

De los 676 callos obtenidos en la primera etapa de la investigación, e inducidos a regeneración por embriogénesis somática bajo dos condiciones de estrés por déficit hídrico simulado *in vitro*, solamente dos dieron lugar a plántulas (Tabla 05, color verde oscuro), uno de ellos originó una estructura parecida a una hoja (color amarillo); los demás callos murieron o no regeneraron plantas u órgano alguno (Fig. 06). Es notable también que una mortalidad bastante alta se manifestó hasta los primeros 30 días de evaluación en todos los casos, siendo más acentuada en los tratamientos provenientes de explantes de raíz.

Las dos únicas plántulas regeneradas se originaron a partir de explantes provenientes de callos bien conformados procedentes de yemas, aunque con distinto nivel de estrés por déficit hídrico simulado *in vitro*.

Son muchos los factores intervinientes sobre la capacidad de regeneración a partir de tejido desdiferenciado; Bidabadi & Jaín (2020) expresan que hay efectos significativos de factores como los componentes del medio, las

fitohormonas, el tipo de explante, la luz, señales moleculares en respuesta a las heridas, muerte celular inducida e interacción de fitohormonas.

**Tabla 05**

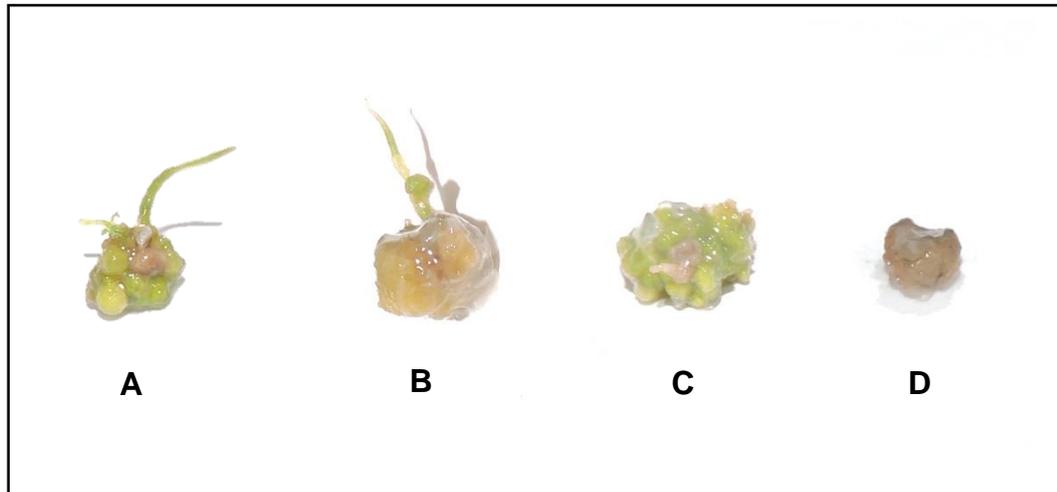
*Respuesta de 324 callos bien conformados (C1), y 352 callos parcialmente desarrollados (C2); provenientes de cinco tipos de explantes (E1, E2, E3, E4, E5) a la inducción de regeneración por embriogénesis somática; bajo dos condiciones de estrés por déficit hídrico simulado in vitro (M1 y M2).*

Tratamiento	N° de callos por trt. 28/08	Respuesta a la inducción embriogénica											
		09 d		17 d		29 d		49 d		64 d			
M1C1E1	5	05	03	02	02	02	02	02	02	02	02		
M1C1E2	11	11	07	04	04	04	04	04	04	04	04		
M1C1E3	94	91	03	91	03	91	1	2	01	02	01	02	
M1C1E4	48	48											
M1C1E5	6	6											
M1C2E1	49	48	01	01	01	01	01	01	01	01	01		
M1C2E2	62	62	61	01	01	01	01	01	01	01	01		
M1C2E3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
M1C2E4	10	09	01	01	01	01	01	01	01	01	01		
M1C2E5	52	52											
M2C1E1	5	05	05	03	02	02	02	02	01	01	01		
M2C1E2	10	10	07	03	03	03	03	03	03	03	03		
M2C1E3	93	93	89	04	1	2	1	1	2	1	1	2	1
M2C1E4	47	47											
M2C1E5	5	5											
M2C2E1	48	48	47	01	01	01	01	01	01	01	01		
M2C2E2	62	62	60	02	02	02	02	02	02	02	02		
M2C2E3	4	04	03	01	03	01	01	01	01	01	01		
M2C2E4	9	08	01	01	01	01	01	01	01	01	01		
M2C2E5	51	51											

*Nota.* Se muestra el desarrollo o deterioro de los explantes sometidos a inducción de regeneración in vitro. El color marrón indica los explantes muertos, el color crema los callos de color cremoso, el color verde claro los callos verdosos, el color amarillo, la formación de órganos vegetativos y el color verde oscuro la formación de una plántula (Elaboración propia. Junio 2024)

## Figura 06

*Explantos obtenidos en la segunda etapa de la investigación.*



*Nota.* (A) Embrión, (B) Hoja, (C) Callo verdosos, (D) Callo cremoso (Elaboración propia. Junio 2024)

La capacidad regenerativa de los tejidos desdiferenciados es entre otros factores, también dependiente del tipo de explante de origen del callo, tal como lo sugiere Ohtani (2015) quien asevera que la actividad regenerativa de las células vegetales puede ser limitada por la regulación del metabolismo de ARN, el cual es diferente según el tipo de explante.

Furukawa et al. (2020) trabajaron utilizando manitol como estresante osmótico en la producción de embriones somáticos en plantas de *Camellia sinensis*, y afirmaron que posiblemente más allá de ciertos límites de la concentración de este carbohidrato (0.2 a 0.4 M), se afectaba negativamente la regeneración embriogénica en esta planta, lo cual expresaron, había sido observado en trabajos anteriores. Lo anteriormente expuesto puede llevarnos a la suposición de que la poca regeneración a partir de los callos se debió a la utilización de una concentración muy elevada en el medio de cultivo para la planta de papa (4.5% y 6.7%), la cual según Chappell et al. (2020) requiere de 2

a 4 % para provocar agobio osmótico en las plántulas de papa induciendo la detención de crecimiento para conservación a corto y mediano plazo.

El estresante osmótico utilizado en nuestro trabajo de investigación fue el manitol, el cual se reportó varios años atrás como inhibidor total del proceso de embriogénesis somática en plantas de *Prunus incisa* (Cheong y Pooler, 2004); no obstante, existen reportes más recientes como el de Choy (2020) que reportan la influencia del manitol entre otros carbohidratos sobre el proceso de embriogénesis somática, no con efectos letales o totalmente inhibitorios, pero sí con efectos negativos crecientes a medida que se incrementan las concentraciones del referido carbohidrato. La utilización del manitol en concentraciones relativamente elevadas en nuestro trabajo ha generado una condición estresante muy fuerte, y con ello ha tenido la intención de forzar la variación somaclonal selectiva, dando muy pocos, pero promisorios, resultados de explantes sobrevivientes.

El origen del explante inicial para la regeneración post formación de callo, ha sido estudiado por varios investigadores (Chen et al., 1987, Bekele et al., 1995, Nas et al., 2010) quienes en general han observado que los explantes provenientes de raíz son los menos aptos para regenerar plantas y por el contrario los explantes regenerados a partir de yemas son los más apropiados. Al respecto es importante considerar que los diferentes tejidos vegetales de una planta, se encuentran bajo un específico control hormonal y bioquímico interno y externo (Taiz et al., 2015; Salaün et al., 2021); en tal sentido, las células de callos provenientes de raíz serían menos responsivas a los balances hormonales externos utilizados para la regeneración celular, los cuales en general son relativamente elevados para ese tipo de explantes o tejidos. Por el contrario, las

células de las yemas por naturaleza responden a concentraciones auxínicas relativamente elevadas, y los callos que proceden de éstas, serían más sensibles de responder a la inducción para regeneración.

#### 4.3. Micropropagación de las plántulas regeneradas (fase de transición)

Los 02 propágulos regenerados y viables, procedentes de la segunda etapa de la investigación, procedentes de los tratamientos “M2C1E3” y “M1C1E3” (identificados como “AmarilisAESP1” y “AmarilisAESP2” respectivamente) fueron colocados en un medio de cultivo M.S. para propagación; no obstante, la reproducción fue mucho más lenta de lo esperado, requiriéndose de 120 días para la producción de 18 explantes por cada propágulo regenerado en la segunda etapa de la investigación, como se muestra en la Tabla 06.

**Tabla 06**

*Resultado de la micropropagación (utilizando medio M.S. 1962) de plántulas regeneradas bajo estrés por déficit hídrico simulado in vitro.*

Trt. de origen	Plántulas regeneradas	Número de explantes			
		30 dds	59 dds	90 dds	120 dds
M1C1E3	01	01	02	06	18
M2C1E3	01	01	02	05	18

*Nota.* Se muestra el número de explantes obtenidos a partir de las plántulas regeneradas a los 30, 59, 90, 120 dds (días después de la siembra) (Elaboración propia. Junio 2024)

Colocar las pequeñas plántulas regeneradas como propágulos en un medio de cultivo Murashigue and Skoog 1962 para propagación y carente de manitol, no implica una eliminación inmediata de las condiciones de ajuste metabólico producido en las células regeneradas bajo estrés por déficit hídrico, incluso hay reportes de que un ajuste metabólico producido por condiciones severas de estrés

hídrico puede causar la total no recuperación de una planta. Abid et al. (2018) reportan que trabajando con plantas de trigo sometidas a estrés por déficit hídrico, las mismas, exhibieron un ajuste osmótico a través de la acumulación de azúcares solubles, prolina y aminoácidos libres y un aumento de las actividades antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas; en esta investigación, después del re-riego, el potencial hídrico de las hojas, la estabilidad de la membrana, los procesos fotosintéticos, la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno), las actividades antioxidantes, la peroxidación lipídica y el potencial osmótico se recuperaron completamente en las plantas moderadamente estresadas, pero no se recuperaron por completo en las plantas severamente estresadas; aun cuando la acumulación de prolina es beneficiosa para las plantas durante la recuperación del estrés hídrico, como lo expresan Jurkonienė et al. (2023).

Sattar et al. (2021) indicaron que en papa, sometida a estrés hídrico simulado utilizando LiCl y manitol, en condiciones in vitro, una respuesta general de las plantas es el incremento total de fenoles; y obviamente el crecimiento de la planta de papa se inhibe bajo estrés salino debido a la toxicidad iónica inducida como respuesta al estrés osmótico (Chourasia et al., 2021); estos mismos autores señalan que las respuestas de la planta incluyen cambios fisiológicos, incluido el desequilibrio de nutrientes, el deterioro por el proceso de desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño de la membrana y reducción de la actividad fotosintética; y todas estas respuestas se manifiestan negativamente como reducción de área foliar, afectación del estado hídrico de la planta, la transpiración disminuida, alteración del equilibrio hormonal y producción de antioxidantes.

Lo anteriormente expresado explica la demora de las plantas regeneradas bajo estrés para incrementarse por micropropagación, utilizando el medio de cultivo apropiado.

#### **4.4. Tolerancia al estrés**

Se ha evaluado la longitud de las plantas que es la característica más inhibida ante estrés osmótico según (Hanász et al., 2022).

Se registró semanalmente y por seis semanas los datos de longitud de planta como indicador de la respuesta de las plántulas al estrés por déficit hídrico y se elaboró los análisis de variancia (ANVA) para cada evaluación. Se observó en general un crecimiento bastante lento, lo cual era previsible con base en lo dicho por Samarina et al. (2020) quienes afirmaron que el estrés osmótico es un factor importante que reduce el crecimiento y el rendimiento de muchos cultivos hortícolas en todo el mundo; y por Hamooh et al. (2021) quienes afirman que la papa es susceptible a las condiciones tanto de salinidad como de sequía.

El análisis estadístico (Anexo 3, Análisis de variancia) cuyos resultados se resume en la Tabla 07, muestra que, existe diferencia significativa, con alta significación estadística, en todas las evaluaciones solamente respecto a la concentración de manitol en el medio de cultivo (ver también las Tablas 16, 19, 23, 27, 31, 36); presentándose la respuesta de mayor altura de planta en el medio de cultivo con menor concentración de manitol (44.59 g/l). Un resultado similar es reportado por Sattar et al. (2021), quienes expresan que el número de brotes, la longitud de los brotes, el número de raíces y la longitud de las raíces se vieron afectados en dos cultivares de papa cuando las concentraciones LiCl y manitol fueron más altas; así mismo Jurkonienė et al. (2023) expresan que las plantas

que han sido sometidas a mayor estrés por déficit hídrico muestran mayor dificultad para recuperarse por el mayor daño causado por dicho estrés.

**Tabla 07**

*Cuadrados medios y significación del ANVA para la longitud de plántula durante seis semanas, de dos clones procedentes de un proceso de regeneración bajo dos niveles de estrés hídrico comparadas con plántulas sin tratamiento especial previo (testigo)*

<b>Fuente</b>	10 dds	17 dds	24 dds	31 dds	38 dds	45 dds
Concentración de manitol	0.0709**	0.2427**	0.7081**	0.9248**	1.7547**	1.9339**
Clon	0.0078	0.0864	0.0990	0.1437	0.3127 *	0.2179
Concentración*Clon	0.0011	0.0185	0.0211	0.0126	0.1482	0.0889
<b>C.V.</b>	<b>17.62</b>	<b>20.10</b>	<b>28.60</b>	<b>28.60</b>	<b>25.88</b>	<b>27.61</b>

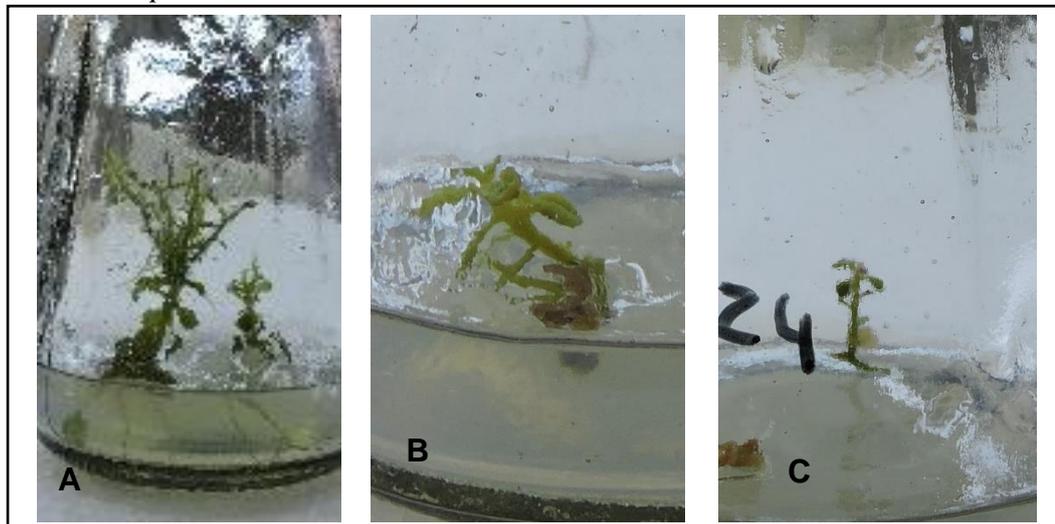
*Nota.* Se muestra el resumen de las seis evaluaciones realizadas respecto a altura de planta, a los 10, 17, 24, 31, 38, 45 dds (días después de la siembra) (Elaboración propia. Diciembre 2024)

Respecto a diferencias en la respuesta de crecimiento debidas al explante de origen (AmarilisAESP1, AmarilisAESP2 o Planta testigo), aunque se ha observado diferencia numérica en la respuesta de crecimiento, solamente se presentó diferencia significativa a los 38 días después de la siembra (Tabla 7 y también Tabla 31 en el Anexo 3); es decir, solamente en una de las seis evaluaciones realizadas en esta etapa de la investigación; aun así, es esperanzador haber obtenido este resultado y constituye una razón para alentar futuras investigaciones con este material (AmarilisAESP1), tanto a nivel de laboratorio, como también de invernadero y campo. Es importante aclarar que muy probablemente la razón para no tener significancia a los 45 días después del

trasplante fue la necrosis apical presentada en los explantes en crecimiento provenientes de la “AmarilisAESP1” (sobresaliente a los 38 días), lo cual se debería al incremento de ROS en respuesta al estrés (Sattar et al., 2021) como aspecto negativo en esos explantes específicos; sin embargo, las plantas afectadas tuvieron la capacidad de rebrotar o ramificarse, compensado de esta manera el deterioro a diferencia de las plantas testigo (Figura 07).

### Figura 07

*Diferencia de crecimiento in vitro de plántulas de papa, provenientes de regeneración por inducción de embriogénesis somática, y plantas testigo a los 45 días después de la siembra in vitro.*



*Nota.* (A) Plántulas procedentes de AmarilisAESP1, (B) Procedentes de AmarilisAESP2, (C) Plántulas testigo (Elaboración propia. Julio 2024)

Además, es necesario precisar que con la utilización de 66.88 g/l de manitol (0.37 M), el comportamiento de todos tratamientos es similar y muy deficiente, muy probablemente debido a que se trata de una concentración bastante elevada, pues Hanász et al. (2022) expresa que las concentraciones de manitol para la selección de genotipos tolerantes al estrés osmótico varían en el rango de 0.2 M a 0.3 M.

Anteriormente se mencionó que hubo plántulas desarrolladas a partir de la “AmarilisAESP1”, que han mostrado muerte apical; sin embargo, cabe mencionar que estas plántulas han generado posteriormente ramas laterales, y entre las plántulas provenientes de la “AmarilisAESP2” se ha observado decoloración apical. En el primer caso se explica por la probable mayor producción de ROS como respuesta al estrés, que también es presentada en las investigaciones de Sattar et al. (2021) y Hammoh et al. (2021); y en el segundo caso, puede deberse a la afectación del proceso fotosintético, que es mencionado como parte de los efectos negativos debidos al crecimiento en condiciones de estrés por déficit hídrico (Abid et al., 2018).

El crecimiento lento, la necrosis apical en algunos explantes en crecimiento y otros efectos negativos observados en las plantas sometidas a estrés, se deben a modificaciones o alteraciones bioquímicas, entre las cuales se tiene el incremento de fenoles, el cual se incrementa con mayores concentraciones de estresante osmótico, incremento de flavonoides, incremento de la capacidad de remoción de radicales libres, incremento de la actividad de la superóxido dismutasa (Sattar et al., 2021).

Aunque en nuestros resultados, no hemos alcanzado el 2%, sino el 1% de plántulas regeneradas, podemos afirmar que las plántulas obtenidas constituyen material muy promisorio para futuros trabajos de investigación y mejoramiento en busca de tolerancia a estrés por déficit hídrico, lo cual confirma la utilidad de la técnica utilizada con el propósito de inducir tolerancia a estreses ambientales. Adicionalmente, nuestro trabajo tiene respaldo suficiente, por los buenos resultados obtenidos en otras especies, como los de Eliane et al. (2019) en Costa de Marfil, quienes evaluaron la respuesta de cacao al estrés hídrico, utilizando

polietilenglicol 6000 como estresante osmótico, en las etapas de inducción y proliferación de callos y embriones somáticos; y obtuvieron embriones somáticos solamente con uno de los tratamientos; concluyendo que ese material constituye una base importante para la selección y posterior producción de variedades de cacao tolerantes al estrés hídrico. Asimismo, Attree et al. (1995) en su trabajo sobre desarrollo de embriones somáticos de *Picea glauca*, concluyen que para inducir la tolerancia a la desecación se requirió un tratamiento de estrés hídrico en el proceso (p. 433). También Valencia – Lozano et al. (2021) concluyeron que la maduración de los embriones somáticos bajo estrés osmótico propició la maduración de los genes implicados en los meristemas apicales, mejorando la robustez de las plantas regeneradas.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

Se logró obtener plántulas de papa con características promisorias de tolerancia al estrés por déficit hídrico mediante la inducción de variación somaclonal por embriogénesis somática, validando así la utilidad de esta estrategia biotecnológica.

La capacidad regenerativa de tejido desdiferenciado *in vitro* es dependiente del tipo de explante utilizado, siendo los explantes de yema, los que muestran mayor capacidad de formación de callos bien conformados y mejor respuesta a los tratamientos de regeneración, en comparación con los explantes obtenidos de raíz, que tuvieron una menor respuesta de desdiferenciación y mayor mortalidad.

El contraste de los explantes iniciales, respecto a su capacidad regenerativa, se explica por diferencias bioquímicas (epigenéticas, enzimáticas y hormonales) en respuesta al entorno o ambiente (condiciones impuestas por el medio de cultivo).

Se alcanzó un porcentaje de regeneración de plantas en condiciones de estrés hídrico, simulado *in vitro* de 50% respecto al esperado; no obstante, los resultados sugieren que el material obtenido es muy promisorio, particularmente respecto a la tolerancia a estrés por déficit hídrico.

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

Considerar el uso de las plántulas regeneradas a partir del clon 'AmarilisAESP1' en futuros ensayos, con el objetivo de evaluar su comportamiento bajo condiciones de estrés por déficit hídrico en laboratorio, invernadero y campo.

Incorporar evaluaciones bioquímicas (fenoles, flavonoides, actividad antioxidante), y pruebas genéticas para identificar marcadores moleculares asociados a posibles modificaciones para tolerancia al estrés hídrico en el material resultado de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Abid, M., Ali, S., Qi, L.K., Zahoor, R., Tian, Z., Jiang, D., Snider, J.L. & Dai, T. (2018). Physiological and biochemical changes during drought and recovery periods at tillering and jointing stages in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports* 8, 4615 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21441-7>
- Arzate-Fernández, A.M., Martínez-Velasco, I., Reyes-Díaz, J.I., Norman-Mondragón, T.H., Corona-Rodríguez, M.C., Cano-Perdono, E.T. y Hernández-Rodríguez, J.L. (2022). Variación somaclonal en plantas de *Phalaenopsis* sp. var. dudú regeneradas por embriogénesis somática directa. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 25 (2022): #051. URL: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/112906>.
- Attree, S.M., Pomeroy, M.K. & Fowke, L.C. (1995). Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage, *Journal of Experimental Botany*, Volume 46, Issue 4, 433–439, <https://doi.org/10.1093/jxb/46.4.433>
- Babadjanova F. I., Ubaydullaeva K. A., Asrorov A. M., Rakhmanov B. K., Abdullaev A. N., Bolkiev A. A., Abdullaev S. A., Eshmurzaev J. B. & Buriev Z. T. (2023). Effects of plant growth regulators on callogenesis and embryogenesis in sarnav and desiree potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Plant Science Today* 11(1): 215–222. <https://doi.org/10.14719/pst.2428>.
- Bekele E., Klock G. & Zimmermann U. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and root explants and from seeds of *Eragrostis tef* (Gramineae). *Hereditas* 123: 183-189. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1995.00183.x>
- Bidabadi S. S. & Jain S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants* 9, 702; doi:10.3390/plants9060702

- Buchanan, B. B., Jones, R. L., & Gruissem, W. (2015). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Biologists. Wiley, New York.
- Caira, C.M., Lopez, C. y Carhuarupay, Y. F. (2021). Efecto de la temperatura y precipitación sobre la agricultura en la cuenca Coata-Puno, Perú. *Alfa Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 5(14), 285-296. <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v5i14.118>
- Chappell, A.L., Koym, J.W., Scheuring, D.C. Miller J.C. y Vales M.I. (2020). Incorporation of Mannitol in Tissue Culture Media for Long-Term Storage of Potatoes at Moderately Low Temperature and Effect on Subsequent Micropropagation. *American Journal of Potato Research*. **97**, 439–446 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12230-020-09780-6>
- Cheong E. J. & M. R. Pooler. (2004). Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Reports* 22:810–815. DOI 10.1007/s00299-004-0771-5.
- Chourasia, K.N., Lal, M.K., Tiwari, R.K., Dev, D., Kardile, H.B., Patil, V.U., Kumar, A., Vanishree, G., Kumar, D., Bhardwaj, V., Meena, J.K., Mangal, V., Shelake, R.M., Kim, J.Y. & Pramanik, D. (2021). Salinity Stress in Potato: Understanding Physiological, Biochemical and Molecular Responses. *Life*. 11(6):545. <https://doi.org/10.3390/life11060545>
- Choy P.S. (2020). Effects of carbohydrates and osmoticum on the somatic embryogenesis and cotyledon morphology of *Codonopsis lanceolata* L. *Journal of Plant Biotechnology*, 47(2): 179-184. <https://doi.org/10.5010/JPB.2020.47.2.179>
- Correa, O. y Coral, R. (2022). Estimación temporal y espacial de las sequías e inundaciones meteorológicas con índice China-Z en la intercuenca alto Apurímac,

- Perú. *Revista Brasileira de Meteorología* 37 (1). Jan-Mar 2022.  
<https://doi.org/10.1590/0102-7786370013>
- Davies, F.T., Geneve, R.L. & Wilson, S.B. (2017). *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 9th Edition. Pearson Education.
- Dorani, E., Dehghanian, Z., Gougerdchi, V., Hamedpour-Darabi, M. (2024). Aplicación de la variación somaclonal en mejoras de cultivos. En: Kumar, N. (eds) *Mutagénesis vegetal. Planificación paisajística sostenible y gestión de recursos naturales*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-50729-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-031-50729-8_8)
- Eliane, M. , Modeste, K. , André, S. , Edmond, K. & Mongomaké, K. (2019) Effect of Water Stress Induced by Polyethylene Glycol 6000 on Somatic Embryogenesis in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Agricultural Sciences*, 10, 1240-1254. doi: [10.4236/as.2019.109092](https://doi.org/10.4236/as.2019.109092).
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Mohammed, D. M., Fahmy, M. A., a, Elesawi, I. E., Ahmed, E. A., Algotpishi, U. B., Elrys, A. S., Desoky, E. M., Mosa, W. F., Abd, T. A., Alhashmi, F. I., Mathew, B. T., AbuQamar S. F. & El-Tarabily K. A. (2024). Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria alleviate drought stress and enhance soil health for sustainable agriculture: A comprehensive review. *Plant Stress*, 14: 100632. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100632>.
- Evert, R. F. (2006). *Esau's Plant Anatomy Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. 3<sup>rd</sup> Edition. Wiley-Interscience.
- Ferreira, M.d. S., Rocha, A.d. J., Nascimento, F.d. S., Oliveira, WD d. S., Soares, JM d. S., Rebouças, TA, Morais Lino, LS, Haddad, F., Ferreira, CF, Santos-Serejo, JA d., Fernández, JS, & Amorim, EP (2023). El papel de la variación somaclonal en el mejoramiento genético de plantas: una revisión sistemática. *Agronomía* , 13 (3), 730. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030730>

- Furukawa K., Koizumi M., Hayashi W., Mochizuki H., & Yamaki K. (2020). Pretreatment and posttreatment in the biolistic transformation of tea plant (*Camellia sinensis*) somatic embryos. *Plant Biotechnology* 37, 195–203. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0404a
- Furusaki, S., & Takeda, T. (2011). Bioreactors for Plant Cell Culture. *Comprehensive Biotechnology*, 361–372. doi:10.1016/b978-0-08-088504-9.00104-5
- Gurav, S. S., Gurav, N. S., Patil, A. T., & Duragkar, N. J. (2019). Effect of Explant Source, Culture Media, and Growth Regulators on Callogenesis and Expression of Secondary Metabolites of *Curcuma Longa*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 1–19. doi:10.1080/10496475.2019.1689542
- Hamooh, B.T., Sattar, F.A., Wellman, G. & Mousa, M.A.A. (2021). Metabolomic and Biochemical Analysis of Two Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars Exposed to In Vitro Osmotic and Salt Stresses. *Plants*. 10(1):98. <https://doi.org/10.3390/plants10010098>
- Hanász, A., Dobránszki, J., Mendler-Drienyovszki, N., Zsombik, L., & Magyar-Tábori, K. (2022). Responses of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Breeding Lines to Osmotic Stress Induced in In Vitro Shoot Culture. *Horticulturae*, 8(7), 591. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae8070591>
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., & Geneve, R.L. (2014). *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 8th Edition. Pearson Education Limited.
- Hernández Amasifuen, Angel David, y Díaz Pillasca, Hermila Belba. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en "papa amarilla" *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26(1), 277-286. <https://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26111>

- Hijmans, R. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*, 80, 271–279. <https://doi.org/10.1007/BF02855363>
- Joshi A., Jacobs C. S. & Roudier F. (2020). Mitotic Inheritance of PRC2-Mediated Silencing: Mechanistic Insights and Developmental Perspectives. *Frontiers in Plant Science*. 11:262. doi: 10.3389/fpls.2020.00262
- Ibrahim, S.I., Naawe, E.K. & Çaliskan, M.E. (2023). Morpho-Physiological Evaluation of Potato Genotypes Reveals Differential Responses to Drought Stress under Field Conditions. *American Journal of Potato Research*. 100, 382–398. <https://doi.org/10.1007/s12230-023-09925-3>
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Harashima, H., Shibata, M., Ohnuma, M., Breuer, C., Morao, A.K., de Lucas, M., De Veylder, L., Goodrich, J., Brady, S.M., Roudier, F. & Sigimoto, K (2015). PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. *Nature Plants*, 1(7). doi:10.1038/nplants.2015.89
- Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC] 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Core Writing Team, R. K. Pachauri and L. A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Jiménez, J., Chaparro-Giraldo, A. y Blanco, J. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 67-74. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752009000200008&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200008&lng=en&tlng=es).

- Joshi S, Paul P, Hartman JM & Perry SE (2022). AGL15 Promotion of Somatic Embryogenesis: Role and Molecular Mechanism. *Plant Science*. 13:861556. doi: 10.3389/fpls.2022.861556
- Jurkonienė S, Mockevičiūtė R, Gavelienė V, Šveikauskas V, Zareyan M, Jankovska-Bortkevič E, Jankauskienė J, Žalnierius T, Kozeko L. (2023). Proline Enhances Resistance and Recovery of Oilseed Rape after a Simulated Prolonged Drought. *Plants*. 12(14):2718. <https://doi.org/10.3390/plants12142718>
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, & Sadh RK. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 *Biotech*. 6(1):54. doi: 10.1007/s13205-016-0389-7.
- Kumlay, A. M. & Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29:6, 1075-1084, DOI: 10.1080/13102818.2015.1077685.
- Lozano-Povis, A. (2023). «Agricultura y cambio climático: principales hallazgos y propuestas para la toma de decisiones en dos regiones naturales del Perú». *South Sustainability*, 4(1), e068. DOI: 10.21142/SS-0401-2023-e068
- Manlé, T. E., Kouassi, K. M., Soumahoro B. A., Koffi, K. E. & Koné, M. (2019). Effect of Water Stress Induced by Polyethylene Glycol 6000 on Somatic Embryogenesis in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Agricultural Sciences*. 10. 1240-1254. <https://doi.org/10.4236/as.2019.109092>.
- Marmolejo, D. y Ruiz, J. (2018). Tolerancia de papas nativas (*Solanum* spp.) a heladas en el contexto de cambio climático. *Scientia Agropecuaria*, 9(3), 393-400. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.03.10>

- Massa, R., Al-Biski, F. & Al-Maarri, K. (2024). Clonal Selection for Salinity Tolerance in Some Potato (*Solanum tuberosum*) Varieties by Callus Culture. *Potato Res.* **67**, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s11540-023-09659-z>
- Merriam–Webster Dictionary. (13 de agosto de 2023). Explante. Merriam-Webster Dictionary. <https://www.merriam-webster.com/dictionary/explant>
- Millones, C. y Vásquez, E. (2022). Tolerancia *in vitro* de cultivares de *Rubus* spp. a estrés hídrico simulado con manitol. *Agronomía Mesoamericana.* **33**, (1), pp. 1-13
- Moreno, L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* **27**(2), 179-191.
- Mostafa, H. H. A., Wang, H., Song, J., & Li, X. (2020). Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones. *Scientific Reports*, **10**(1). doi:10.1038/s41598-020-61564-4
- Mozgová, I., Muñoz-Viana, R., & Hennig, L. (2017). PRC2 Represses Hormone-Induced Somatic Embryogenesis in Vegetative Tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, **13**(1), e1006562. doi:10.1371/journal.pgen.1006562
- Mukherjee, S., Mishra, A. & Trenberth, K. (2018). Climate Change and Drought: a Perspective on Drought Indices. *Current climate change reports* **4**, 145–163. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0098-x>
- Nas, M. N., Bolek, Y., & Sevgin, N. (2010). The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. *Scientia Horticulturae*, **126**(2), 88–94. doi:10.1016/j.scienta.2010.06.012
- Ohtani, M. (2015). Regulation of RNA metabolism is important for *in vitro* dedifferentiation of plant cells. *Journal of Plant Research* **128**, 361–369. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0700-4>

- Paredes, F., La Cruz, F. y Guevara, E. (2014). Análisis regional de frecuencia de las sequías meteorológicas en la principal región cerealera de Venezuela. *Bioagro* 26(1): 21-28. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612014000100003&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612014000100003&lng=es&tlng=es).
- Patiño, C. (2010). Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 1(1): 7 - 15. 7. 10.22490/21456453.893.
- Perera, M., García, M., Noguera, A., Sepúlveda-Tusek, M., Filippone, M., y Castagnaro, A. (2010). Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 87(2), 13-21. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-30182010000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182010000200002&lng=es&tlng=es).
- Pola-Sánchez, E., y Santiz-Gómez, J. (2019). Efecto del ácido indol-3-acético y del tipo de explante en la callogénesis de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Ibciencias* 2 (2): 7-11
- Porta, H., y Jiménez-Nopala, G. (2019). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22, e160. Epub 04 de marzo de 2020. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.160>
- Purcell, F. (2022). Thirsty Country: State, Water, and the “War on Drought” in Chile in the 1960s. *Historia Crítica*, n.º 85: 99-121. <https://doi.org/10.7440/histcrit85.2022.05>
- Ribeiro, D.G., de Almeida, R.F., Fontes, W., de Souza Castro M, de Sousa M.V., Ricart C.A.O., da Cunha, R.N.V., Lopes, R, Scherwinski-Pereira. J.E. & Mehta, A. (2018).

Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. *Journal of Proteomics*. 192:137-146. doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.015.

Rivadeneira, J., Jaramillo, P., Fernandez-Northcote, E. y Cuesta, X. (2020). Identificación de genotipos de papa con tolerancia al déficit hídrico. *Manglar* 17(4): 321-329. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2020.048>

Rodríguez, F., Feinan, W., Cécile, A. Tanksley, S. y Spooner. D. (2009). Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? (en línea) *BMC Evolutionary Biology* 9(191), <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/191>

Rudack, K.; Seddig, S.; Sprenger, S.; Köhl, K.; Uptmoor, R. & Ordon, F. (2017). Drought stress-induced changes in starch yield and physiological traits in potato. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 203: 494-505.

Salauin, C., Lepiniec, L. & Dubreucq, B. (2021). Genetic and Molecular Control of Somatic Embryogenesis. *Plants*, 10, 1467. <https://doi.org/10.3390/plants10071467>

Samarina, L., Matskiv, A., Simonyan, T., Koninskaya, N., Malyarovskaya, V., Gvasaliya, M., Malyukova. L., Tsaturyan, G., Mytdyeva, A., Martinez-Montero, M.E., Choudhary, R. & Ryndin, A. (2020). Biochemical and Genetic Responses of Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) Microplants under Mannitol-Induced Osmotic Stress In Vitro. *Plants*. 9(12):1795. <https://doi.org/10.3390/plants9121795>

Sánchez-Calvo, L., y Alvarenga-Venutolo, S. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), pág. 105–120. <https://doi.org/10.18845/tm.v28i1.2195>

Sattar FA, Hamooh BT, Wellman G, Ali MA, Shah SH, Anwar Y, Mousa MAA.(2021). Growth and Biochemical Responses of Potato Cultivars under In Vitro Lithium

- Chloride and Mannitol Simulated Salinity and Drought Stress. *Plants*. 2021; 10(5):924. <https://doi.org/10.3390/plants10050924>
- Schafleitner, R., Gutierrez, R., Espino, R., Gaudin, A., Pérez, J., Martínez, M., Dominguez, A., Tincopa, L., Alvarado, C., Numberto, G. & Bonierbale, M. (2007). Field Screening for Variation of Drought Tolerance in *Solanum tuberosum* L. by Agronomical, Physiological and Genetic Analysis. *Potato Research*. **50**, 71–85 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11540-007-9030-9>
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S., & Maraffa, S. B. (1980). The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis. *Horticultural Reviews*, 268–310. doi:10.1002/9781118060759.ch6
- Su, Y.H., Liu, Y.B., Bai, B., and Zhang, X.S. (2015). Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin responses during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*. **5**: 792. doi:10.3389/fpls.2014.00792
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y. & Zhang, X. S. (2020). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*. **63**, 228 – 240. <https://doi.org/10.1111/jipb.12972>
- Sunaryo, W., Widoretno, W., Nurhasanah, N. & Sudarsono, S. (2016). Drought tolerance selection of soybean lines generated from somatic embryogenesis using osmotic stress simulation of poly-ethylene glycol (PEG). *Nusantara Bioscience*. **8**. 45-54. 10.13057/nusbiosci/n080109.
- Taiz, L. Zeiger, E., Moller, I.M. and Murphy, A. (2015) *Plant Physiology and Development*. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT.

- Tang, L.P., Zhang, X.S. & Su, Y.H. (2020). Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis. *aBIOTECH 1*, 185–193. <https://doi.org/10.1007/s42994-020-00029-8>
- Tardieu, F., Simonneau, T., & Muller, B. (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 733–759. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>
- Tombion, L. (2023). El cultivo de tejidos vegetales y su empleo en plantas y cultivares ornamentales INTA. INTA CIRN-CNIA.
- Trujillo-Meza, Y., Mendoza-Nieto, E., Palomares-Anselmo, E., Luis-Olivas D., Gomes da Silva, E. y Fardim-Christo, B. (2022). Fuentes orgánicas y producción de papa en la región andina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13(4): 735 – 740.
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization [UNESCO]. 2020. The United Nations World Water Development Report 2020. 219 pp.
- Valencia-Lozano, E., Ibarra, J.E., Herrera-Ubaldo, H. De Folder, S. & Cabrera-Ponce, J.L. (2021). Osmotic stress-induced somatic embryo maturation of coffee *Coffea arabica* L., shoot and root apical meristems development and robustness. *Sci Rep 11*, 9661. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88834-z>
- Vanegas-Espinoza, P.E., Bazaldúa, C., Ríos-Salomé, L.B., Paredes-López O., Camelo-Mendez, G.A., y Del Villar-Martinez, A.A. (2020). Cellular and morphological changes during leaf explant dedifferentiation and plant regeneration of *Tagetes erecta*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 61, 407–414 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00210-z>
- Wójcikowska, B., Jaskóła, K., Gąsiorek, P., Meus, M., Nowak, K., and Gaj, M.D. (2013). LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues

of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *AmarilisAESP238* (3): 425-440. doi:10.1007/s00425-013-1892-2

Zhang, H.; Xu, F.; Wu, Y.; Hu, H. & Dai, X. (2017). Progress of potato staple food research and industry development in China. *Journal of integrative agriculture* 16(12): 2924-2932

## ANEXOS

### ANEXO 1

**Tabla 08.**

*Constituyentes del medio de cultivo base utilizado (Murashigue y Skoog, 1962 modificado).*

CONSTITUYENTES	CANTIDAD (mg/L)
1. Sales	
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
NaSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	0.025
2. Vitaminas	
Tiamina HCl	0.4
Mio-Inositol	100
3. Azúcares	
Sacarosa	30 (g/L)

## ANEXO 2

### 1. Tercera etapa

**Tabla 09.** *Evaluaciones de comparación de longitud de planta (11 de marzo de 2024)*

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	0.7	0.7	0.5	0.5	0.3	0.3	0.5	0.4	0.4	0.3	0.7	0.4	0.4	0.3	0.5	0.5	0.3	0.4
II	0.6	0.5	0.3	0.3	0.5	0.9	0.3	0.5	0.5	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.6	0.3
III	0.4	0.5	0.6	0.6	0.8	0.6	0.6	0.6	0.4	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3

**Tabla 10.** *Evaluaciones de comparación de longitud de planta (18 de marzo de 2024)*

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	1.5	1.6	0.7	0.7	0.4	0.4	0.7	0.4	0.7	0.4	0.9	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.3	0.6
II	1.2	0.9	0.3	0.3	0.6	1.2	0.4	0.6	0.6	0.6	0.8	0.3	0.6	0.6	0.3	0.3	0.8	0.3
III	0.7	0.5	0.8	0.9	1.1	0.8	0.6	0.7	0.4	0.9	0.3	0.3	0.5	0.3	0.6	0.5	0.3	0.4

**Tabla 11.** *Evaluaciones de comparación de longitud de planta (25 de marzo de 2024)*

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	1.9	2.3	0.7	0.9	0.8	0.6	1.1	1.2	1.4	0.6	1.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.5	0.7
II	1.6	1.1	0.3	0.4	1.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.8	0.3	0.6	0.7	0.3	0.3	0.8	0.3
III	0.9	0.5	1.3	1.0	1.1	0.8	0.9	1.1	0.5	1.1	0.3	0.3	0.6	0.3	0.7	0.8	0.4	0.4

**Tabla 12. Evaluaciones de comparación de longitud de planta (01 de abril de 2024)**

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	2.1	2.5	0.9	1.7	0.8	0.6	1.1	1.2	1.7	1	1.2	1.2	0.6	0.7	0.7	0.8	0.5	0.9
II	1.7	1.2	0.4	0.6	1.5	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.3	0.8	0.9	0.3	0.3	0.8	0.3
III	1	0.6	1.6	1.1	1.2	0.9	1.1	1.2	0.5	1.2	0.3	0.3	0.6	0.3	0.9	0.8	0.4	0.6

**Tabla 13. Evaluaciones de comparación de longitud de planta (08 de abril de 2024)**

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	2.3	3.5	1.2	2.0	1.0	0.6	1.2	1.3	1.8	1.1	1.2	1.2	0.7	1.0	0.7	1.0	0.6	1.1
II	2.1	1.7	0.6	1.0	1.5	0.6	1.0	0.7	0.7	0.9	0.7	0.4	0.9	0.9	0.3	0.3	1.0	0.4
III	1.2	0.6	3.0	1.2	1.3	1.0	1.3	1.5	0.7	1.2	0.3	0.3	0.6	0.3	0.9	1.1	0.6	0.6

**Tabla 14. Evaluaciones de comparación de longitud de planta (15 de abril de 2024)**

Repetición	C1: -0.6 MPa									C2: -0.9 MPa								
	AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo			AmarilisAESP1			AmarilisAESP2			Testigo		
	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3	Explante 1	Explante 2	Explante 3
I	2.3	3.5	1.2	2.0	1.2	0.6	1.2	1.7	2.1	1.1	1.3	1.3	0.8	1.0	0.5	1.1	0.9	1.4
II	2.1	1.7	0.6	1.0	1.7	0.5	1.1	0.7	0.7	1.0	0.7	0.5	0.9	0.9	0.3	0.3	1.0	0.4
III	1.3	0.7	2.7	1.3	1.6	1.1	1.5	1.7	0.7	1.2	0.3	0.3	0.7	0.3	0.9	1.2	0.6	0.6

### ANEXO 3

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO – TERCERA ETAPA DE LA INVESTIGACIÓN

#### Análisis de la varianza

**Tabla 15**

*Resumen de la variable evaluada a los diez días después de la siembra*

DDS	Variable	N	R2	R2Aj	CV
10	Promedio de longitud	18	0.5421	0.3513	17.6257

**Tabla 16**

*Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los diez días después de la siembra*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.0887	5	0.0177	2.8415	0.0642
Concentración	0.0709	1	0.0709	11.3603	0.0056**
Planta	0.0156	2	0.0078	1.2491	0.3215
Concentración*Planta	0.0022	2	0.0011	0.1744	0.8421
Error	0.0749	12	0.0062		
Total	0.1637	17			

**Tabla 17.**

*Prueba de significancia para concentración de manitol a los diez días después de la siembra. Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.08116.*

*Error: 0.0062 gl: 12*

Concentración	Medias	n	E.E.	
44.59	0.5111	9	0.0263	A
66.88	0.3856	9	0.0263	B

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

**Tabla 18.**

*Resumen de la variable evaluada a los diecisiete días después de la siembra*

DDS	Variable	N	R2	R2Aj	CV
17	Promedio de longitud	18	0.5949	0.4261	26.1029

**Tabla 19.**

*Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los 17 días después de la siembra*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.4525	5	0.0905	3.5244	0.0343*
Concentración	0.2427	1	0.2427	9.4507	0.0096**
Planta	0.1728	2	0.0864	3.3656	0.0691
Concentración*Planta	0.0370	2	0.0185	0.7200	0.5066
Error	0.3081	12	0.0257		
Total	0.7606	17			

**Tabla 20.**

Prueba de significancia para concentración de manitol a los diecisiete días después de la siembra. *Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.16459.*

Error: 0.0257 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.	
44.59	0.7300	9	0.0534	A
66.88	0.4978	9	0.0534	B

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

**Tabla 21.**

Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los diecisiete días después de la siembra *Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.43947*

Error: 0.0257 gl: 12

Concentración		Medias	n	E.E.	
44.59	1	0.9133	3	0.0925	A
44.59	2	0.7100	3	0.0925	A B
44.59	T	0.5667	3	0.0925	A B
66.88	1	0.5567	3	0.0925	A B
66.88	2	0.5133	3	0.0925	A B
66.88	T	0.4233	3	0.0925	B

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

**Tabla 22.**

Resumen de la variable evaluada a los veinticuatro días después de la siembra

DDS	Variable	N	R2	R2Aj	CV
24	Promedio de longitud	18	0.6207	0.4626	28.6022

**Tabla 23.**

Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los 24 días después de la siembra

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.9483	5	0.1897	3.9272	0.0243*
Concentración	0.7081	1	0.7081	14.6611	0.0024**
Planta	0.1980	2	0.0990	2.0503	0.1714
Concentración*Planta	0.0422	2	0.0211	0.4372	0.6557
Error	0.5795	12	0.0483		
Total	1.5279	17			

**Tabla 24.**

Prueba de significancia para concentración de manitol a los veinticuatro días después de la siembra. *Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.22572.*

Error: 0.0483 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.	
44.59	0.9667	9	0.0733	A
66.88	0.5700	9	0.0733	B

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

**Tabla 25.**

Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los veinticuatro días después de la siembra **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.60270**

Error: 0.0483 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.		
44.59 1	1.1767	3	0.1269	A	
44.59 2	0.8867	3	0.1269	A	B
44.59 T	0.8367	3	0.1269	A	B
66.88 1	0.6567	3	0.1269	A	B
66.88 2	0.5533	3	0.1269		B
66.88 T	0.5000	3	0.1269		B

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

**Tabla 26.**

Resumen de la variable evaluada a los treinta y un días después de la siembra

DDS	Variable	N	R2	R2Aj	CV
31	Promedio de longitud	18	0.6176	0.4583	28.6047

**Tabla 27.**

Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los treinta y un días después de la siembra

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.2375	5	0.2475	3.8765	0.0253*
Concentración	0.9248	1	0.9248	14.4852	0.0025**
Planta	0.2874	2	0.1437	2.2510	0.1479
Concentración*Planta	0.0252	2	0.0126	0.1976	0.8233
Error	0.7661	12	0.0638		
Total	2.0036	17			

**Tabla 28.**

Prueba de significancia para concentración de manitol a los treinta y un días después de la siembra. **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.25952.**

Error: 0.0638 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.		
44.59	1.1100	9	0.0842	A	
66.88	0.6567	9	0.0842		B

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

**Tabla 29.**

Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los treinta y un días después de la siembra **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.69297**

Error: 0.0638 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.		
44.59 1	1.3333	3	0.1459	A	
44.59 2	1.0000	3	0.1459	A	B
44.59 T	0.9967	3	0.1459	A	B
66.88 1	0.7867	3	0.1459	A	B
66.88 2	0.6367	3	0.1459		B
66.88 T	0.5467	3	0.1459		B

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

**Tabla 30.**

Resumen de la variable evaluada a los treinta y ocho días después de la siembra

DDS	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
38	Promedio de longitud	18	0.7537	0.6511	25.8756

**Tabla 31**

Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los treinta y ocho días después de la siembra

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.6764	5	0.5353	7.3443	0.0023**
Concentración	1.7547	1	1.7547	24.0753	0.0004**
Planta	0.6253	2	0.3127	4.2897	0.0393*
Concentración*Planta	0.2964	2	0.1482	2.0335	0.1736
Error	0.8746	12	0.0729		
Total	3.5510	17			

**Tabla 32.**

Prueba de significancia para concentración de manitol a los treinta y ocho días después de la siembra. **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.27729.**

Error: 0.0729 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.		
44.59	1.3556	9	0.0900	A	
66.88	0.7311	9	0.0900		B

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

**Tabla 33.**

Prueba de significancia para Planta a los treinta y ocho días después de la siembra. **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41583.**

Error: 0.0729 gl: 12

Planta	Medias	n	E.E.		
1	1.3067	6	0.1102	A	
2	0.9217	6	0.1102	A	
T	0.9017	6	0.1102	A	

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

**Tabla 34.**

Prueba de significancia para la interacción concentración - Planta a los treinta y ocho días después de la siembra **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.74040**

Error: 0.0729 gl: 12

Concentración - Planta		Medias	n	E.E.	
44.59	1	1.8000	3	0.1559	A
44.59	T	1.1333	3	0.1559	A B
44.59	2	1.1333	3	0.1559	A B
66.88	1	0.8133	3	0.1559	B
66.88	2	0.7100	3	0.1559	B
66.88	T	0.6700	3	0.1559	B

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

**Tabla 35.**

Resumen de la variable evaluada a los cuarenta y cinco días después de la siembra

DDS	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
45	Promedio de longitud	18	0.6963	0.5698	27.6073

**Tabla 36.**

Cuadro de Análisis de la Varianza para longitud de planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.5476	5	0.5095	5.5027	0.0073**
Concentración	1.9339	1	1.9339	20.8856	0.0006**
Planta	0.4358	2	0.2179	2.3533	0.1373
Concentración*Planta	0.1779	2	0.0889	0.9605	0.4103
Error	1.1111	12	0.0926		
Total	3.6587	17			

**Tabla 37.**

Prueba de significancia para concentración de manitol a los cuarenta y cinco días después de la siembra. **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.31254.**

Error: 0.0926 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.	
44.59	1.4300	9	0.1014	A
66.88	0.7744	9	0.1014	B

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

**Tabla 38.**

Prueba de significancia para Planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra. **Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46870.**

Error: 0.0926 gl: 12

Planta	Medias	n	E.E.	
1	1.3217	6	0.1242	A
T	1.0067	6	0.1242	B
2	0.9783	6	0.1242	B

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

**Tabla 39.**

Prueba de significancia para la interacción Concentración - Planta a los cuarenta y cinco días después de la siembra **Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.83454**

Error: 0.0926 gl: 12

Concentración - Planta		Medias	n	E.E.		
44.59	1	1.7900	3	0.1757	A	
44.59	T	1.2667	3	0.1757	A	B
44.59	2	1.2333	3	0.1757	A	B
66.88	1	0.8533	3	0.1757		B
66.88	T	0.7467	3	0.1757		B
66.88	2	0.7233	3	0.1757		B

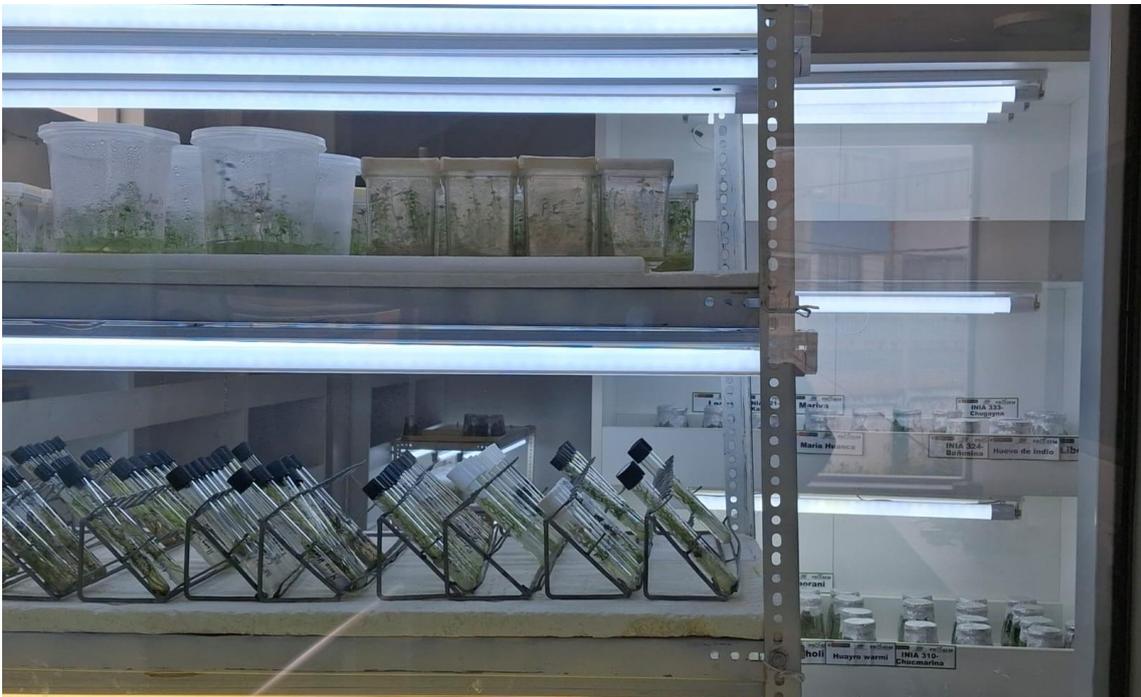
Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## ANEXO 4

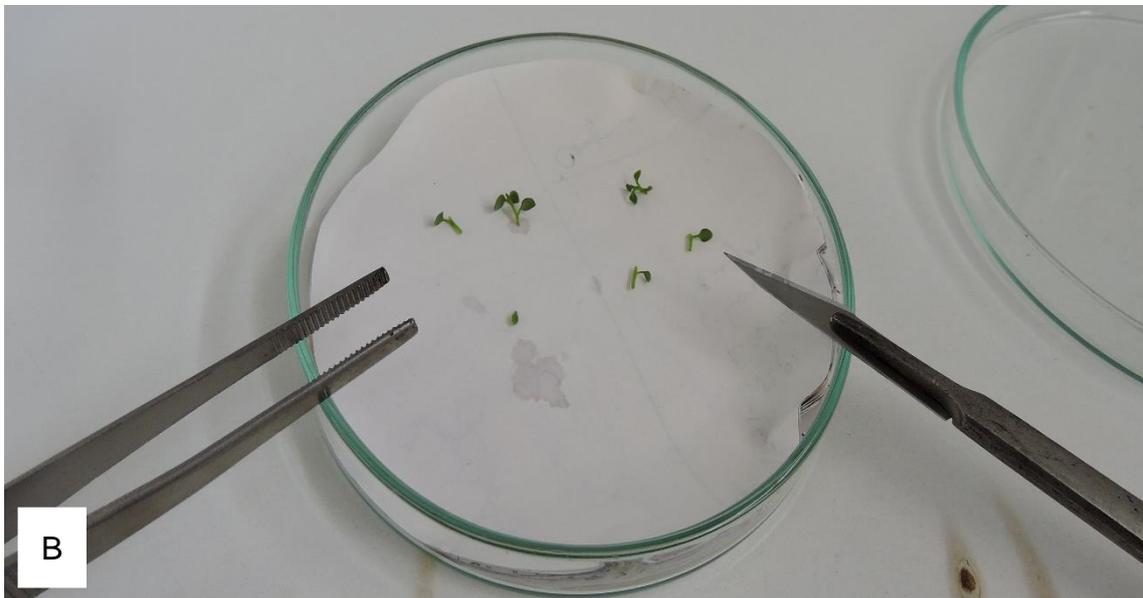
### FOTOGRAFÍAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



**Figura 08.** *Vista exterior del Laboratorio de Cultivos In Vitro de la EEA. BI.*



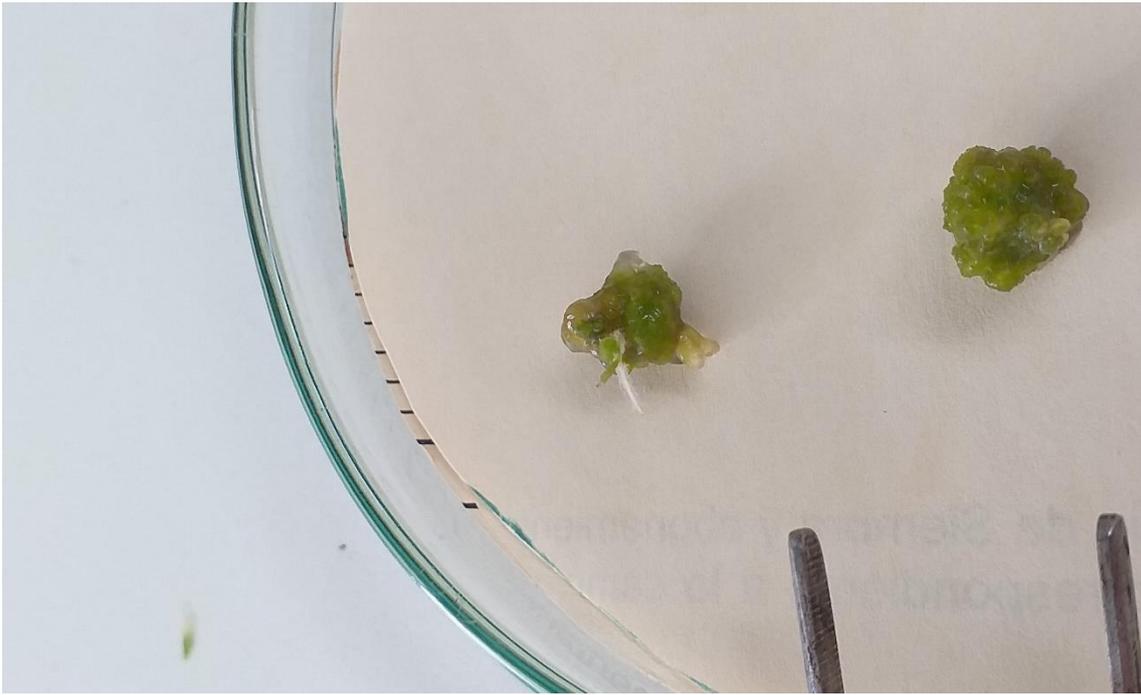
**Figura 09.** *Vista interior del Laboratorio de Cultivo In Vitro. Materiales en incubación.*



**Figura 10.** *Micropropagación: A. Plántula in vitro. B. Explantes obtenidos a partir de la plántula in vitro.*



**Figura 11.** *Plántulas del experimento en incubación.*



**Figura 12.** *Desdiferenciación de tejidos. Obtención de callos.*



**Figura 13.** *Clon AMARILISAESP1, con tolerancia a estrés por déficit hídrico simulado in vitro: A. Fotografía lateral del envase conteniendo los explantes. B. Fotografía tomada desde la parte superior del envase.*



**Figura 14.** *Evaluación de la sanidad de las plántulas obtenidas.*



**Figura 15.** *Plántula con tolerancia a estrés por déficit hídrico simulado in vitro.*