PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PAPA CRIOLLA (*SOLANUM TUBEROSUM* GRUPO PHUREJA) VARIEDAD "PUENDA" A PARTIR DE BROTES DE TUBÉRCULOS

PIER EDUARDO GUERRERO MELO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PAMPLONA, COLOMBIA

2023

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PAPA CRIOLLA (*SOLANUM TUBEROSUM* GRUPO PHUREJA) VARIEDAD "PUENDA" A PARTIR DE BROTES DE TUBÉRCULOS

PIER EDUARDO GUERRERO MELO

TRABAJO DE GRADO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARA

OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR

GIOVANNI ORLANDO CANCINO ESCALANTE

PhD.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PAMPLONA, COLOMBIA

2023

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado a mi querida familia. Especialmente a mis padres, Yeiny Melo Sanjuan y Giovanny Guerrero Bayona, a mi hermano Jorge Alejandro Guerrero y a mi pareja Elena Jaimes. Gracias a su apoyo continuo e incondicional en todo este tiempo de formación académica pude llevar a término este trabajo investigativo. Ellos son el motor de mi vida para seguir adelante y, a su vez, para superarme cada día más como profesional. Así mismo, espero que la vida me dé muchos años de vida para seguir honrando su compañía, apoyo y ayuda permanente. De igual forma, estoy seguro de que, con la formación que he recibido por parte de ellos como académicamente, les podré retribuir algún día con creces todo el bien que me han hecho.

"*El objetivo de la ciencia es descubrir e iluminar la verdad"*

Rachel Carson.

AGRADECIMIENTOS

Expreso con gran gratitud la colaboración, orientación y formación que he recibido, durante todo este tiempo, del doctor Giovanni Orlando Cancino Escalante. Su profundo conocimiento y experiencia en los procesos biológicos y en la biotecnología vegetal fueron fuente de inspiración continua durante el tiempo de formación académica. Así mismo, gracias a sus aportes magistrales, sugerencias y consejos me permitieron incrementar el gusto por el conocimiento científico, en la formación continua en el área de la investigación y en la realización de este trabajo de grado. En suma, solo tengo palabras de agradecimiento para el doctor Giovanni Orlando Cancino por su labor y compromiso con mi formación académica y personal.

A la Universidad de Pamplona que me permitió conocer el increíble mundo del conocimiento científico y, al mismo tiempo, descubrir personas gratificantes en el proceso formativo.

A mi familia por siempre confiar en mis capacidades y destrezas. Además de su continuo apoyo y sacrificio por sacarme a adelante.

Finalmente, a aquellas personas que tuve la oportunidad de conocer y aprender durante el proceso formativo las cuales dejaron una huella invaluable en mi ser. Entre ellos a mi colega Diego Díaz quien siempre estuvo conmigo tanto en las buenas como en las malas y quien brindó una excelente amistad y nobleza durante toda la etapa de formación. Por último, a Elena Jaimes, mi pareja, por estar conmigo en todo momento, brindándome su amor, atención, paciencia y cariño, ayudándome a encontrar la mejor versión de mí mismo y acompañándome durante todo este tiempo en mi formación intelectual y personal.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN………………………………………………………………………………… 8

ABSTRACT……………………………………………………………………………….10

1. INTRODUCCIÓN……………………………………………………………………12

    1. Planteamiento del problema……………………………...………….……12

    2. Justificación……………………………………………..……………. 13

    3. Marco referencial…………………………………………..………….. 14

        1. Marco conceptual…………………..…………………………….....14

        2. Estado del arte…………………………..………………………..…..26

2. OBJETIVOS…………………………………………..……..………….....29

    1. Objetivo general……………………......…………………………...……29

    2. Objetivos específicos……………………………………………………….29

3. MÉTODOS……………………………………..……………………........30

    1. Obtención del material………………...………..………….…………….30

    2. Pretratamiento hormonal……………….……….……….……...………… 30

    3. Fases de propagación …………..…………………….……………………… 31

        1. Fase de desinfección…….……………………………………….. 31

        2. Fase de inducción de brotes………………….………………………. 32

        3. Fase de enraizamiento……………….……..……….....……………….33

    4. Análisis estadístico…………..…………………………………….....…… 33

4. RESULTADOS……………………………………………………………...…. 34

5. DISCUSIÓN…………………………………………………………….….... 42

6. CONCLUSIONES…………………………………………...………………… 50

7. RECOMENDACIONES……………………………….……………………….. 51

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…………………………………………… 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución departamental de la producción de papa en Colombia……..……..15

Figura 2. Características morfológicas de la especie *S. tubersoum* Grupo Phureja variedad "Puenda" ……..18

Figura 3. Tubérculos de la especie *S. tubersoum* Grupo Phureja variedad "Puenda" sometidas a concentración hormonal de AG3……...31

Figura 4. Tubérculos de la especie *S. tubersoum* Grupo Phureja variedad "Puenda" dejados en vasos plásticos con agua destilada…….……..…… 32

Figura 5. Brotación múltiple de los tubérculos de la especie *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda"…….35

Figura 6. Establecimiento *in vitro* de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda"…….. 36

Figura 7. Diferencias entre el porcentaje de viabilidad de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" sometidos a varias concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y a diferentes tiempos de exposición…….37

Figura 8. Formación de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" a los 20 días después de la siembra……38

Figura 9. Diferencias entre el número de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al combinar dos reguladores de crecimiento…….39

Figura 11. Formación de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" a los 20 días después de la siembra……..……. 39

Figura 12. Diferencias entre el número de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al utilizar un fitorregulador de crecimiento……. 42

Figura 13. Diferencias entre la longitud de las raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al utilizar un fitorregulador de crecimiento……42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los trabajos a nivel internacional realizados en micropropagación de *S. tuberosum*……..27

Tabla 2. Resumen de los trabajos a nivel nacional realizados en micropropagación de *S. tuberosum*……..28

Tabla 3. Tratamientos de desinfección (D) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda"…….…….....33

Tabla 4. Combinación de dos reguladores del crecimiento vegetal en la inducción de brotes (B) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja "Variedad Puenda"……..…… 33

Tabla 5. Dosis del regulador de crecimiento en el enraizamiento (C) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja "Variedad Puenda"…….34

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" sometidos a varias concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y a diferentes tiempos de exposición…….……. 36

Tabla 7. Número y longitud de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al combinar dos reguladores de crecimiento…… 38

Tabla 8. Número y longitud de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al emplear un fitorregulador de crecimiento…… 41

RESUMEN

El cultivo de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja, junto con otros cultivares, hacen parte del pilar de la economía y nutrición de los colombianos. Sin embargo, la falta de tecnificación, las fluctuaciones meteorológicas y la proliferación de plagas conlleva a la disminución del rendimiento de producción de la papa. Así mismo, las diferentes variedades y genotipos de la papa como la variedad "Puenda" no cuentan con adaptaciones para su supervivencia generando pérdidas, a los agricultores, en la producción de tubérculos. A partir de lo anterior, la biotecnología vegetal surge como una herramienta para contrarrestar este tipo de situaciones adversas que afectan el rendimiento de los cultivos mediante la propagación *in vitro*. En este orden de ideas, el objetivo general de este estudio fue determinar el efecto estimulante de los reguladores del crecimiento vegetal AG_3, BAP y ANA en la propagación *in vitro* de la especie *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" mediante la utilización de brotes de tubérculos como explantes. Para ello, se empleó brotes de tubérculos que se sometieron a soluciones de 10 mg/L de AG_3 por 3 horas como pretratamiento hormonal. Los brotes generados se cortaron en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad de Pamplona y se sometieron al tratamiento de desinfección usando Tween-20 con hipoclorito de sodio (NaOCl) a diferentes concentraciones (1; 3; 5,25 %) y a distintos tiempos (1, 5, 10 min). Posteriormente, los explantes establecidos se sembraron en un medio de cultivo Murashige Skoog, 1962 (MS) con AG_3 (0,1 mg/L) y a diferentes concentraciones de BAP (1,0; 3,0; 5,0 mg/L) para inducir la formación de brotes. Seguidamente, el material obtenido se sembró en otro medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de ANA (0,1; 0,5; 1,0 mg/L) para la fase de enraizamiento. En este sentido, los parámetros evaluados fueron el porcentaje de viabilidad, número y longitud de brotes y de raíces. Finalmente, los datos

obtenidos se procesaron en el software GraphPad Prism 9 y se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y se comprobó la significancia estadística con el post hoc de Dunn's para múltiples tratamientos. Se encontró que el tratamiento de desinfección más efectivo fue el de máxima concentración (5,25 %) de NaOCl y a un menor tiempo (1 min) con una viabilidad del 70%. Finalmente, los resultados mostraron que, tanto la formación de brotes como el enraizamiento, en este genotipo de papa criolla, no se ve afectado por los reguladores de crecimiento. Por lo tanto, la variedad "Puenda" de *S. tuberosum* Grupo Phureja no depende de fitorreguladores para su propagación *in vitro*. En síntesis, esta variedad solo requiere la aplicación de sales basales MS al 100% de su concentración, ácido ascórbico (100 mg/L) y sacarosa (30 g/L) para su propagación.

Palabras claves: Propagación *in vitro*, regulador de crecimiento, *S. tuberosum* Grupo Phureja

ABSTRACT

The cultivation of *Solanum tuberosum* Phureja Group, together with other cultivars, is a mainstay of the Colombian economy and nutrition. However, the lack of technology, weather fluctuations and the proliferation of pests have led to a decrease in potato production yields. Likewise, the different potato varieties and genotypes such as the "Puenda" variety do not have adaptations for their survival and end up dying, generating losses for the farmers of these potato varieties. Based on the above, plant biotechnology emerges as a tool to counteract this type of adverse situations that affect crop yields through *in vitro* propagation. The general objective of this study was to determine the stimulating effect of the plant growth regulators AG_3, BAP and ANA in the *in vitro* propagation of the species *S. tuberosum* Phureja Group "Puenda" using tuber sprouts as explants. For this purpose, tuber sprouts were subjected to solutions of 10 mg/L AG_3 for 3 hours as a hormonal pre-treatment. The generated shoots were cut in the plant biotechnology laboratory and subjected to disinfection treatment using Tween-20 with sodium hypochlorite (NaOCl) at different concentrations (1; 3; 5.25 %) and at different times (1, 5, 10 min). Subsequently, the established explants were sown on Murashige Skoog, 1962 (MS) culture medium with AG_3 (0.1 mg/L) and at different concentrations of BAP (1.0; 3.0; 5.0 mg/L) to induce shoot formation. Then, the material obtained was sown in another MS culture medium with different concentrations of ANA (0.1; 0.5; 1.0 mg/L) for the rooting phase. In this sense, the parameters evaluated were the percentage of viability, number and length of shoots and roots. Finally, the data obtained were processed in GraphPad Prism 9 software and the Kruskal-Wallis test was performed and statistical significance was tested with Dunn's post hoc for multiple treatments. The most effective disinfection treatment was found to be the highest concentration (5.25%) of NaOCl

and the shortest time (1 min) with a viability of 70%. Finally, the results showed that both shoot formation and rooting in this creole potato genotype is not affected by growth regulators. Therefore, the variety "Puenda" of *S. tuberosum* Grupo Phureja does not depend on phyto-regulators for *in vitro* propagation. In summary, this variety only requires the application of basal MS salts at 100% concentration, ascorbic acid (100 mg/L) and sucrose (30 g/L) for its propagation.

Key words: *In vitro* propagation, growth regulator, *S. tuberosum* Phureja group.

1. INTRODUCCIÓN

1. Planteamiento del problema

El uso indiscriminado de la agricultura a nivel mundial ha conllevado a la pérdida de la fertilidad de la tierra, al empobrecimiento de los países en vía de desarrollo y a la proliferación de agentes fitopatógenos que en últimas terminan afectando las características organolépticas y, en el peor de los casos, acabando con los cultivos agrícolas (Kome et al., 2018, Pontes et al., 2020). Así mismo, los factores climáticos inciden, a su vez, sobre esta problemática dado que imponen condiciones meteorológicas adversas y hostiles como fluctuaciones en la precipitación, temperatura, humedad relativa y radiación lo cual conlleva a sequías, olas de calor, incendios e inundaciones que afectan no solo a los diferentes ecosistemas, sino que también a los diferentes cultivos que se emplean en la agricultura (Del Buono, 2021; Karimi et al., 2018). Por otro lado, la especie *Solanum tuberosum* grupo Phureja (papa criolla), se distribuye en muchas regiones de Colombia de clima frío como Nariño, Boyacá, Cundinamarca, Antioquia y los Santanderes (Minagricultura, 2020). Esta distribución se debe a que la especie es de fácil manejo agronómico, presenta tasas de crecimiento y desarrollo rápidas, tiene elevado interés comercial y económico y es de alto consumo debido a que contiene nutrientes esenciales que cumplen con los requerimientos nutricionales básicos de los colombianos (CerónLasso et al., 2018; Narváez-Cuenca et al., 2018). A pesar de ello, los diferentes genotipos y variedades de *S. tuberosum* Grupo Phureja son vulnerables a temperaturas bajas debido a que no poseen adaptaciones fisiológicas como, por ejemplo, la presencia elevada de enzimas desaturasas que aumentan la insaturación de los ácidos grasos lo cual se traduce en un aumento de la fluidez de la membrana plasmática aun cuando la temperatura ambiental es baja (Berestovoy & Goldenkova-Pavlova, 2020; Kou

et al., 2018). Sumado a ello, las prácticas agronómicas del cultivo por parte de los operarios son deficientes haciendo que la producción de la especie tenga muchas limitaciones (Chilma Fernández, 2018). Así mismo, las variedades de papa criolla se ven afectadas por microorganismos como *Rhizoctonia solani* que causa chancro del tallo y sarna negra, *Phytophthora infenstans* que produce la enfermedad del tizón tardío y los virus potato virus Y (PVY), X (PVX) y potato leafroll virus (PLRV) que causan daños irreversibles tanto en los tubérculos como en las semillas de la papa (Chavarro-Mesa et al., 2021; Grisales-Vásquez & Cotes-Torres, 2019; Mejía et al., 2020). Por lo tanto, a partir de lo anterior, surge la siguiente pregunta: ¿La implementación de reguladores de crecimiento vegetal influye en la propagación *in vitro* de la especie *Solanum tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda" empleando brotes de tubérculos?

Ho: Ninguno de los reguladores de crecimiento vegetal influyen en la propagación *in vitro* de la especie *Solanum tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda" empleando brotes de tubérculos.

Ha: La aplicación de los reguladores de crecimiento vegetal influyen en la propagación *in vitro* de la especie *Solanum tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda" empleando brotes de tubérculos.

2. Justificación

La aplicación de la biotecnología vegetal mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* resulta ser una herramienta eficaz para solventar necesidades de tal índole, esto es, contrarrestar los efectos que causan los fitopatógenos de manera *in vivo*, producir a gran escala plantas seleccionadas y axénicas (Brar & Khush, 2021), controlar el rendimiento de producción mediante el uso de fitohormonas (Raspor et al., 2020), propagar a bajo costo este

tipo de plantas agrícolas sin tener que emplear áreas grandes de siembra y mantener el acervo genético de las especies mediante los bancos de germoplasma (Lázaro et al., 2021). En este orden de ideas, el establecimiento y la propagación en condiciones *in vitro* solo se ha utilizado en las especies de papa *Solanum tuberosum* L (Moreno & Oropeza, 2017), pero muy poco en las distintas variedades de los grupos cultivares como Phureja, Chaucha, Ajanhuiri, Cortilobum, Andigenum, entre otros (Araque Barrera et al., 2018; Lopéz-Medina et al., 2019).

3. Marco referencial

1. Marco conceptual

Solanum tuberosum Grupo Phureja según Machida-Hirano (2015) se caracteriza por ser plantas semierectas, con una altura que oscila entre los 0,4 a 1,4 metros de altura, el grosor del tallo tiene un rango de 5- 19 milímetros aproximadamente, hojas pinnadas, no tolerante a las heladas, plantas adaptadas a la floración y tuberización de tiempo corto, son diploides y son organismos con tubérculos que brotan fácilmente y de color amarillo tanto el exterior del tubérculo como de la carne (de los Angeles Bohórquez-Quintero et al., 2022) . De igual manera, su fenología agronómica se destaca por desarrollarse a una temperatura entre los 15 a 25 °C, humedad relativa del 70 a 80 %, pH moderadamente ácido (5 a 6), precipitación mínima de unos 900 mm cada año y una altitud promedio de 2500 a 2900 msnm (Aksenova et al., 2020) Así mismo, esta planta tiene una gran distribución en latinoamérica que va desde México hasta el norte de Argentina; sin embargo, la especie silvestre es originaria de Perú y es dónde hay más variedades de este cultivar (Marquez-Vasallo *et al.,* 2020). No obstante, cada país posee actualmente diferentes variades de este grupo de papas debido a los cruces realizados y a las adaptaciones que han tenido a los diversos ecosistemas. Tales adaptaciones

se ven reflejadas en la morfología de las hojas, el color de las flores y las propiedades organolépticas del tubérculo (Araque Barrera et al., 2018). En Colombia, este grupo de las Phurejas se cultiva en distintas regiones del país, en donde los lugares más predominantes y con una tasa de rendimiento elevada son: Cundinamarca, Boyacá y Nariño como se observa en la figura 1 (Araque Barrera et al.,2018; FEDEPAPA & FNFP, 2022). En el caso de la variedad "Puenda" es un genotipo de papa nativa de Colombia la cual es muy apetecida por los colombianos por sus propiedades gastronómicas y organolépticas haciéndola un alimento esencial de la canasta familiar. Cabe resaltar que la descripción de la variedad y sus características serán profundizadas más adelante.

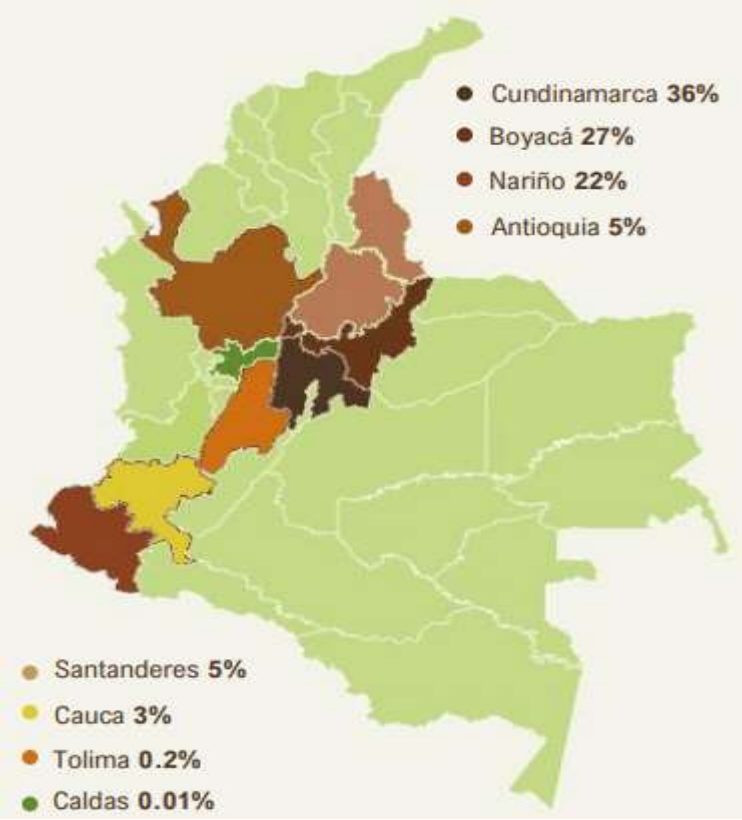

Figura 1. Distribución departamental de la producción de papa en Colombia (FEDEPAPA & FNFP, 2021)

En cambio, en Norte de Santander, la producción no es tan notable dado que el cultivo de papa está en manos, en gran medida, de pequeños productores sin tecnificación que equivale al 95 % de los agricultores, seguidamente por los medianos productores con semitecnificación con un porcentaje del 4 % y finalmente por los grandes productores que poseen tecnificación, pero solo cuentan con el 1 % de los agricultores. En este sentido, los municipios de Norte de Santander como Silos, Chitagá y Pamplona son los que tienen mayor producción de papa con un total de 58.920 toneladas (Ton). En donde Silos posee 1662 hectáreas (Ha) con una producción de 41.210 Ton, Chitagá con 942 Ha y 11.580 Ton y Pamplona con 298 Ha y 5.920 Ton (FEDEPAPA & FNFP, 2020). En este sentido, Silos es el municipio predominante en el cultivo papa criolla con un porcentaje del 52 %, seguidamente de Chitagá con un 16 %, Pamplona con un 15 %, Mutiscua con un 14 % y, por último, Cácota con un 3 % (FEDEPAPA & FNFP, 2022b). Empero, este cultivo tiene sus desventajas en cuanto que es susceptible a plagas y fluctuaciones de variables climáticas debido a su propagación vegetativa (GIRALDO *et al*., 2022), esto es, al emplear una reproducción asexual se obtienen clones de una misma planta lo cual disminuye en gran medida el acervo genético y, por ende, la capacidad de adaptación se reduce y se vuelve frágil frente a este tipo de presiones tanto abióticas como bióticas.

Por otro lado, la papa criolla tiene un valor de importancia muy alto dado que hace parte de la canasta familiar de los colombianos debido a sus aportes nutricionales. Estos aportes se traducen en grandes cantidades de carbohidratos (almidón), minerales esenciales como el K, Ca, Zn, vitaminas como el ácido ascórbico y otras sustancias como los antioxidantes, carotenoides y fenoles. Además, de poseer un sabor agradable y de alta calidad culinaria (Araque Barrera et al., 2018; Lázaro et al., 2021). En este orden de ideas, la papa ocupa el

tercer lugar de área cosechada en el país con 133.570 hectáreas aproximadamente (27,4%) y el primer lugar en producción con unas 3.123.804 toneladas (48,8%). En general, este cultivo participa con el 3,5 % del PIB agropecuario y genera cerca de 230 millones de empleos directos como indirectos (Dane, 2020a).

En Norte de Santander, el área cosechada es relativamente bajo pues solo cuenta con 5.448 hectáreas (4,1%) y producción de 99.974 toneladas (3,2%) (Dane, 2020b). Así pues, la papa al ser un cultivo de gran importancia a nivel nacional debido a sus aportes nutricionales, económicos y culturales como se mencionó con anterioridad requiere de gran interés por parte de la comunidad científica en la aplicación de las herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* y la edición génica, ya sea con microorganismos como *Agrobacterium tumefaciens* (Bruce & Shoup Rupp, 2019) o con herramientas como CRISPR/Cas (Mali & Zinta, 2022) que se llevan a cabo en condiciones *in vitro*. Esta aplicabilidad al cultivo de papa implicaría incrementar el rendimiento de producción logrando resistencia no solo al estrés abiótico sino que también al estrés biótico como lo menciona Concepción-Hernández (2018). Todas estas ventajas que produce la biotecnología potenciarían este producto de la canasta familiar en un país donde el cultivo de papa no está tecnificado en su totalidad (FEDEPAPA & FNFP, 2020b), presenta pérdidas en el rendimiento del 5 al 20 % por culpa de microorganismos patógenos (Mejía et al., 2020) y por heladas debido a las bajas temperaturas (Song *et al.,* 2021).

1. Variedad “Puenda”

Esta variedad de papa se caracteriza por presentar una altura no superior a los 58 cm, es semierecta, tallo de color verde, la floración se da aproximadamente a los 60 días de haberse sembrado, las flores son de pigmentación morada y con forma de corola rotada, el tubérculo

normalmente es redondo, el color predominante de la piel es el rojo intermedio y el secundario el amarillo alrededor de los ojos, el color de la carne es amarillo y con ojos profundos como se observa en la figura 2 (Moreno Mendoza *et al.,* 2009).

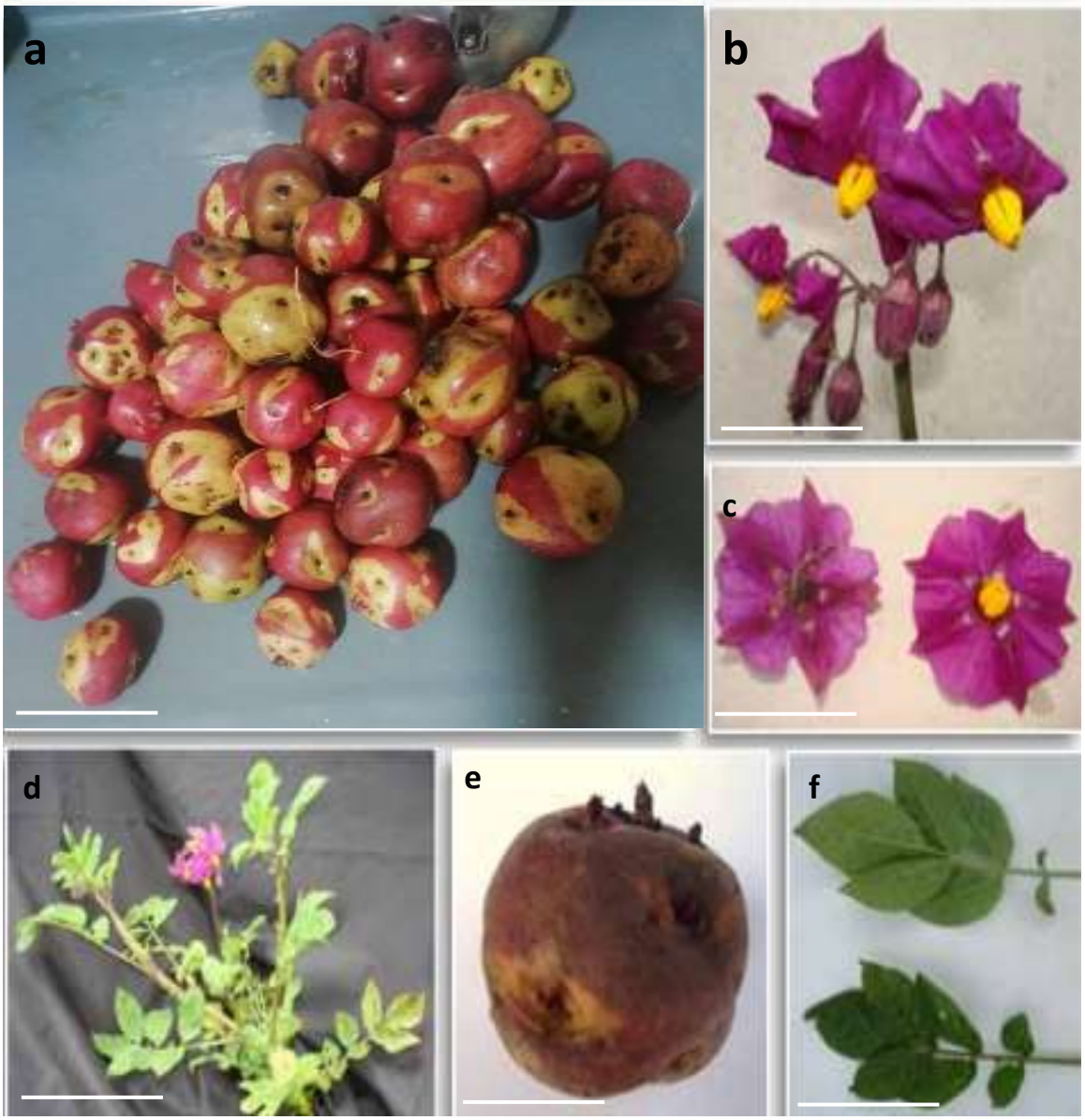

Figura 2. Características morfológicas de la especie *Solanum tubersoum* grupo Phureja Variedad "Puenda". a) tubérculos; b) Inflorescencia; c) flor; d) vástago de la planta e) tubérculo en brotación; f) hojas (Moreno *et al.,*2009). Barra= 2 cm.

2. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

El cultivo *in vitro* de plantas o de tejidos vegetales es un compendio de técnicas biotecnológicas que sirven no solo para la propagación clonal a gran escala de organismos vegetales, sino que también para el mejoramiento genético, producción de metabolitos secundarios, eliminación de virus y conservación del material genético a partir de un explante o parte de la planta (Kher et al., 2020; Oseni et al., 2018; Teixeira da Silva et al., 2019). Así mismo, este material seleccionado debe estar bajo condiciones controladas de laboratorio como, por ejemplo, la temperatura, radiación, humedad relativa, fotoperiodo, pH, velocidad de crecimiento, viabilidad bioquímica y regeneración vegetativa mediante reguladores de crecimiento (Hashim et al., 2021). Este proceso de propagación se debe a la totipotencialidad que tienen las células vegetales para generar un clon que tiene las mismas características genéticas del organismo original (Oseni et al.,2018). Sin embargo, para que las células vegetales puedan lograr este proceso el explante debe crecer en un ambiente ideal (Prajwala et al., 2021), es decir, en un medio con macro y micronutrientes, reguladores de crecimiento, control de las variables físicas y la esterilidad del medio (Abdalla *et al.,* 2022). En este orden de ideas, dependiendo de lo que se quiera llevar a término con el explante, se pueden realizar 6 tipos de técnicas de cultivo vegetal según lo expone Suárez-Padrón (2020): la embriogénesis somática directa e indirecta, la organogénesis directa e indirecta, la siembra de meristemos y la micropropagación. La embriogénesis directa consiste en someter a la semilla a altas concentraciones de auxinas para generar varios embriones que darán como resultado varios clones del mismo individuo (Oseni et al., 2018); sin embargo, la indirecta, al someter a la semilla a concentraciones altas de reguladores de crecimiento provoca la formación de callo celular del cual aparecerán más embriones con las mismas características

genéticas del organismo original. Por otro lado, la organogénesis directa consiste en utilizar un explante (hoja, peciolo, entrenudo, parte de raíz) con el objetivo de generar brotes, pues cada brote será un clon del organismo donador; en cambio, la indirecta entra en la fase de callo celular para luego formar brotes que se convertirán en futuras plántulas clonales (Abdalla *et al.,* 2022). Diferente a lo anterior, está la siembra de meristemos que es el mejor método de propagación. Esto se debe a que no requiere de tratamientos de desinfección puesto que las células meristemáticas carecen de microorganismos patógenos; no obstante, el inconveniente que presenta esta técnica es el método de obtener el tejido vegetal debido a corto tamaño. De igual manera, realizar una escisión errónea provocará que la célula obtenida pierda su totipotencialidad (Kher et al., 2020).

2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo contienen todos los requerimientos nutricionales que necesita el explante para crecer, desarrollarse y formar plantas clonales. Normalmente, estos medios contienen tanto macro y micronutrientes, vitaminas como otros compuestos orgánicos de vital importancia para la planta. Actualmente, hay una variedad de medios que se emplean en el cultivo *in vitro*; no obstante, el medio por antonomasia para la propagación de una gran cantidad de especies en el laboratorio es el Murashige and Skoog (MS) el cual se destaca por tener altas concentraciones de macronutrientes (Oseni et al., 2018; Phillips & Garda, 2019).

En contraste con lo anterior, este medio en particular no es apropiado para ciertas especies como es el caso de las plantas forestales. Éstas plantas no requieren de altas concentraciones de macromoléculas y pueden generar patologías fisiológicas por el exceso de sales, tales como: la senescencia apical y la necrosis celular (Teixeira da Silva et al., 2020). Por consiguiente, para evitar estos daños en este tipo de vegetales, se utilizan otros medios no tan

concentrados de sales como el Gamborg (G5), White (W) o el Woody Medium Plant (WMP) (Abiri et al., 2020).

2.2.Selección del explante

Para que el establecimiento y la propagación *in vitro* tengan resultados óptimos el explante debe tener ciertas condiciones necesarias, entre las cuales están: la planta madre debe tener una buena condición fisiológica, el explante debe ser juvenil, de tamaño mediano y cortado en un ángulo específico (Kher et al., 2020). Empero, en muchas ocasiones no se cumplen estas condiciones con organismos forestales o en peligro de extinción por lo cual el operario debe optar por colectar el material disponible y someterlo a tratamientos de desinfección fuertes (sin dañar el tejido) para aumentar el éxito de propagación.

2.3. Composición de los reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son compuestos químicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Cabe resaltar que ciertas especies son capaces de liberar estos reguladores de forma endógena cuando se estimulan bajo factores físicos; mientras que otras, los necesitan de manera exógena para realizar la elongación, división, proliferación y diferenciación celular. No obstante, los óptimos resultados dependen exclusivamente de la concentración que se use de estas fitohormonas puesto que en dosis altas como, por ejemplo, en las auxinas, termina generando el efecto contrario; es decir, la inhibición del crecimiento y desarrollo de la planta. Así pues, los reguladores que normalmente se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales están: las citoquininas, auxinas y las giberelinas (Prajwala et al., 2021).

2.3.1. Citoquininas

Este tipo de regulador de crecimiento está encargado de la división celular, el desarrollo de yemas axilares, la reducción del envejecimiento de las hojas y en la interrupción de la dominancia apical. En efecto, estas citoquininas son producidas endógenamente por las plantas según el estímulo físico que se les dé; no obstante, en el cultivo *in vitro* son de vital importancia debido a que el explante, en la mayoría de las ocasiones, no es capaz de liberar estos compuestos endógenamente por lo que se agrega de forma exógena para inducir la formación de brotes (Suárez Padrón, 2020).

2.3.2. Auxinas

Este regulador de crecimiento se destaca porque estimula en gran medida la dominancia apical, el crecimiento y la división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos. En el cultivo *in vitro* produce el enraizamiento del explante cuando se aplica de forma exógena. Las auxinas naturales que se conocen son el ácido indol acético (AIA) y el ácido indol butírico (AIB); sin embargo, también existen auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). La acción de estas auxinas está determinada por la concentración que se utilice puesto que en grandes concentraciones de este regulador de crecimiento puede generar la formación de callos (Suárez Padrón, 2020).

2.3.3. Giberelinas

Las giberelinas son sustancias químicas que producen en la planta el alargamiento o la elongación de los entrenudos mediante la inducción de la división celular. En este sentido, la giberelina más empleada es la AG_3 la cual se agrega a los medios de cultivo *in vitro* para

generar la elongación de los segmentos nodales que han sido micropropagados y también en la transformación de los embriones somáticos en plantas. (Suárez Padrón, 2020).

2.4.Factores físicos

Los factores físicos que juegan un papel primordial en la propagación *in vitro* son: la temperatura, radiación, humedad relativa, fotoperiodo y el pH. Todos estos factores pueden afectar o beneficiar los procesos fisiológicos del explante induciendo o anulando la producción de reguladores de crecimiento endógenos que sirven para la diferenciación celular (Hashim et al., 2021; Prajwala et al., 2021; Suárez Padrón, 2020).

2.4.1. Temperatura

La temperatura es una variable física que influye notablemente en la expresión y síntesis de reguladores de crecimiento de forma endógena. Empero, este factor depende exclusivamente del genotipo de la especie y el tipo de explante, ya que si se somete siempre a la misma temperatura a todos los explantes y genotipos pueden ocurrir efectos secundarios como el retardo en el crecimiento o la inhibición del mismo. Por lo tanto, al emplear la temperatura en el cultivo *in vitro* es de vital importancia revisar los trabajos e investigaciones realizadas sobre la especie en particular para brindarle la temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo (Suárez Padrón, 2020).

2.4.2. Humedad relativa

La humedad relativa (HR) es otro factor importante en la propagación *in vitro* puesto que permite, al igual que la temperatura, provocar en el explante la expresión y síntesis de reguladores de crecimiento de manera endógena. Por el contrario, esta variable puede provocar también la proliferación de microorganismos como los hongos que al final terminan

dañando el medio de cultivo y el explante empleado. Por consiguiente, tanto el medio de cultivo como el explante deben estar lo más axénico posible para que al emplear este factor en alta proporción (80% HR) pueda generar el efecto deseado que se mencionó con anterioridad (Suárez Padrón, 2020).

2.4.3. Fotoperiodo

El fotoperiodo es la duración de la luz y oscuridad en el ciclo circadiano. En el caso de las plantas, esta variable física influye tanto en el crecimiento como en el desarrollo de éstas. Sin embargo, tal efecto depende de circunstancias internas como externas. En las internas, se halla el genotipo y la parte hormonal de las plantas; mientras que, en las externas, se encuentran factores como la intensidad, duración y calidad de la luz, la temperatura y humedad relativa. Así pues, como se mencionó con antelación, el fotoperiodo depende de ciertas condiciones que son determinadas principalmente por el genotipo de la especie. No obstante, los valores de referencia del fotoperiodo son: 16/8; 14/10 y 12/12 los cuales se aplican en la mayoría de las plantas cultivadas *in vitro* obteniendo valores significativos en la inducción de brotes y raíces (Prajwala et al., 2021).

2.4.4. pH

El pH es otro factor importante en el cultivo *in vitro* ya que permite la absorción y la traslocación de las sustancias químicas empleadas como los macro y micronutrientes, las vitaminas y otros compuestos a toda la planta. Normalmente, se maneja un pH que oscila entre los 5,4 a los 6 puesto que es el pH óptimo de absorción por parte del explante. Un pH menor a 5 puede hacer que los nutrientes no se absorban y que el gel no se solidifique por

completo provocando que el explante no se establezca en el medio de cultivo (Suárez Padrón, 2020).

2.4.5. Radiación

Esta variable física juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo y obtención de metabolitos secundarios de las plantas en condiciones *in vitro*. Sin embargo, este elicitor puede causar efectos nocivos según la longitud de onda de la luz generando estrés en el organismo y provocando la liberación de otras sustancias no deseables como alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenoides. Entre estas longitudes de onda se encuentra la ultravioleta (UV), la cual estimula la producción de metabolitos secundarios en una plétora de cultivos. Esta luz UV se divide en tres: UV-A (320 a 390 nm), UV-B (280 a 320 nm) y UV-C (menor a 280 nm). Todo este rango de luz incide sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas sometidas a condiciones de laboratorio (Hashim et al., 2021).

2.4.6. Oxidación de los explantes

La oxidación es el proceso mediante el cual el tejido sufre un proceso de ennegrecimiento y oscurecimiento debido a la liberación de compuestos químicos concentrados como los polifenoles debido a estímulos estresantes. Esta respuesta fisiológica les permite a ciertas especies vegetales defenderse de los organismos herbívoros; sin embargo, en condiciones *in vitro* este proceso termina siendo desfavorable porque en últimas termina dañando al explante o, en otras palabras, induciendo la muerte celular del tejido. Para contrarrestar este efecto adverso se emplean sustancias químicas como los antioxidantes que mitigan la oxidación del tejido y salvaguardan el material seleccionado. Los antioxidantes más utilizados son: el ácido

ascórbico (100 mg/L), el ácido cítrico (150 mg/L) y el carbón activado (3g/L) (Teixeira da Silva et al., 2019).

3. Estado del arte

1. Antecedentes internacionales

Especie	Técnica	Explante	Medio + Regulador (mg/L)		Referencias
			Multiplicación de brotes	Enraizamiento	
S. tuberosum Grupo Phureja	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + AG_3 (0,5)	Ms + AG_3 (0,5)	Lázaro *et al.*, 2021
S. tuberosum	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + AG_3 (0,5) + AIA (0,1)	MS + AG_3 (0,5) + AIA (0,1)	Lopéz-Medina *et al.*, 2019
S. tuberosum Grupo Chaucha	Micropropagación	Yemas axilares	MS + AG_3 (0,1) + KIN (0,5)	MS + AG_3 (0,1) + KIN (0,5)	Díaz-Pillasca *et al.*, 2022

Tabla 1. Resumen de los trabajos a nivel internacional realizados en micropropagación de *S. tuberosum*

A partir de la tabla 1 se evidencia de manera resumida los trabajos realizados en la especie *S. tuberosum* en relación con la propagación *in vitro*. En este sentido, el medio más utilizado

por los distintos investigadores es el MS; sin embargo, utilizan distintas fitohormonas y a diferentes concentraciones para lograr el objetivo planteado. Así pues, tanto para la inducción de brotes como el enraizamiento de los explantes utilizan AG_3 combinados con otros reguladores de crecimiento como el AIA o la KIN. En este sentido, se manifiesta que el explante que más se utiliza son los segmentos nodales dado que esta parte del órgano del tallo es más resistente a la oxidación provocada por los agentes de desinfección.

2. Antecedentes nacionales

Especie	Técnica	Explante	Medio + Regulador (mg/L)		Referencias
			Multiplicación de brotes	Enraizamiento	
S. tuberosum ssp Andígena	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + ANA (0,02)	MS + AIB (0,05)	Araque Barrera *et al.*, 2018
S. tuberosum Grupo Phureja	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + BAP (0,04) + AG_3 (0,1)	No evaluado	Villa *et al.*, 2007
S. tuberosum Grupo Phureja "Criolla Colombia"	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + AG_3 (0,1)	No evaluado	Barrero-farfán & giraldo, 2008

S. tuberosum Grupo Phureja "Criolla Colombia"	Micropropagación	Segmentos nodales	MS + ZR (2) + AG_3 (0,02) + ANA (0,02)	No evaluado	Bernal & Giraldo, 2004

Tabla 2. Resumen de los trabajos a nivel nacional realizados en micropropagación de *S. tuberosum*

A partir de la tabla 2 se visualiza los resúmenes de los trabajos realizados en propagación *in vitro* de la especie *S. tuberosum* en el país. Cabe resaltar que las investigaciones sobre esta especie y sus variedaes es limitado en Colombia y, a su vez, no se encuentran escritos científicos recientes sobre esta temática excepto por el trabajo realizado por Araque Barrera *et al.*2018. En este orden de ideas, el investigador mencionado con anterioridad se enfocó en la estandarización del protocolo de propagación *in vitro* de la subespecie *S. tuberosum ssp* Andígena. Por el contrario, el resto de las publicaciones se basaron en la propagación *in vitro* para la inducción de brotes en la especie con el objetivo de hacer pruebas de manipulación genética con *Agrobacterium tumefaciens*. Es por ello, que no se observa en sus trabajos el resto de las fases que conlleva la propagación de tejidos vegetales.

4. OBJETIVOS

4.2. Objetivo general

4.2.1. Determinar el efecto estimulante de los reguladores del crecimiento vegetal AG_3, BAP y ANA en la propagación *in vitro* de la especie *Solanum tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" mediante la utilización de brotes de tubérculos como explantes.

4.3. Objetivos específicos

4.3.1. Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de desinfección superficial en el establecimiento *in vitro* de *S. tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda".

4.3.2. Analizar el efecto que tiene la combinación de AG_3 con diferentes concentraciones de BAP en la inducción de brotes de *S. tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda".

4.3.3. Estimar el efecto del ANA a diferentes concentraciones en el enraizamiento de los brotes de *S. tuberosum* grupo Phureja variedad "Puenda".

5. MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro* GBV de la Universidad de Pamplona a partir de tubérculos de la variedad "Puenda" de la especie *Solanum tuberosum* Grupo Phureja.

5.2. Obtención del material

Se recolectaron tubérculos de la variedad "Puenda" en el mercado principal de Pamplona, Norte de Santander en excelentes condiciones fitosanitarias.

5.3. Pretratamiento hormonal

Las papas de la variedad "Puenda" se sometieron a soluciones de AG_3 a una concentración de 10 mg/L y por 3 horas para romper la dormancia y la brotación única siguiendo el procedimiento de Huamán *et al.* (2017) el cual se modificó el tiempo de exposición a la hormona (figura 3). Finalmente, se depositaron en frascos plásticos con agua destilada por 10 días para acelerar el crecimiento de los brotes (figura 4).

Figura 3. Tubérculos de la variedad "Puenda" de la especie *Solanum tubersoum* Grupo Phureja sometidas a concentración hormonal de AG_3

Figura 4. Tubérculos de la variedad "Puenda" de la especie *Solanum tubersoum* Grupo Phureja colocados en vasos plásticos con agua destilada. Barra= 2 cm

3.3. Fases de propagación

3.3.1. Fase de desinfección

Los brotes de los tubérculos se llevaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Pamplona y se cortaron a una longitud entre 1 a 3 cm de largo aproximadamente removiendo raíces y hojas. Finalmente, se agregaron los brotes seccionados en frascos con soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1, 3 y 5,25 % y a diferentes tiempos de exposición 1, 5, 10 min combinados con 3 gotas de Tween 20 (Tabla 3). Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con agua destilada para retirar del tejido el exceso de desinfectante y evitar la oxidación de los explantes. El material utilizado se estableció en el medio MS, en frascos de vidrio, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar, 100 mg/L de ácido ascórbico, 0.1 mg/L de AG_3 y pH ajustado a 5,8. Todo este proceso fue realizado en una cabina de flujo laminar para garantizar una mayor asepsia.

Tratamiento	Tween 20 (gotas)	Concentración (%)	Tiempo (min)
A1	3	5,25	1
A2	3	3	5
A3	3	1	10

Tabla 3. Tratamientos de desinfección (D) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda"

3.2.2. Fase de inducción de brotes

Los explantes viables obtenidos de la fase anterior se emplearon para esta fase. En este sentido, el material seleccionado se estableció en el medio MS, en frascos plásticos, suplementado con 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar, 100 mg/L de ácido ascórbico, 0.1 mg/L de AG_3, a diferentes concentraciones de BAP para la inducción de brotes (Tabla 4) y pH ajustado a 5,8. Los explantes fueron incubados en una cámara de crecimiento con fotoperiodo (16/8) h de luz/oscuridad, temperatura de 20 +/- 2 °C y humedad relativa del 80 %.

Tratamiento	AG_3 (mg/L)	BAP (mg/L)
B1	0,1	1,0
B2	0,1	3,0
B3	0,1	5,0
Control	0,1	0,0

Tabla 4. Combinación de reguladores hormonales en la inducción de brotes (B) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja "Variedad Puenda"

3.2.3. Fase de enraizamiento

Los brotes obtenidos de la fase de inducción se escindieron en la cámara de flujo laminar y se colocaron en frascos plásticos con medio de cultivo MS, con 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar, 100 mg/L de ácido ascórbico, a diferentes concentraciones de ANA para el enraizamiento (Tabla 5) y pH ajustado a 5,8. Los explantes fueron incubados en una cámara de crecimiento con fotoperiodo (16/8) h de luz/oscuridad, temperatura de 20 +/- 2 °C y humedad relativa del 80 %.

Tratamiento	ANA (mg/L)
C1	0,1
C2	0,5
C3	1
Control	0,0

Tabla 5. Dosis del regulador de crecimientos en el enraizamiento (C) *in vitro* de *S. tuberosum* Grupo Phureja "Variedad Puenda"

3.3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos del tratamiento de desinfección se emplearon para calcular el porcentaje de viabilidad y su significancia estadística. Así mismo, los datos de las mediciones del número y tamaño de brotes y raíces fueron sometidos a la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk donde se determinó el comportamiento de los datos para saber qué estadísticos emplear. Posteriormente, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y se comprobó estadísticamente con el post hoc de Dunn's para múltiples tratamientos. Cabe resaltar que los datos fueron tratados con el programa GraphPad Prism 9.

6. RESULTADOS

6.2. Pretratamiento hormonal

La aplicación de soluciones de AG_3 a una concentración de 10 mg/L y por un tiempo de exposición de 3 horas permitió el rompimiento de la dormancia y la brotación única de los tubérculos de la variedad "Puenda" (figura 5), con lo cual se pudo obtener la mayor cantidad de brotes posibles de este tubérculo en 2 semanas para llevar a término este trabajo investigativo.

Figura 5. Brotación múltiple de los tubérculos de la especie *Solanum tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda". Barra= 2 cm

6.3. Fases de propagación

6.3.1. Fase de desinfección

Pasados los 20 días de la siembra del material se realizó el conteo de los explantes que no manifestaron algún tipo de contaminación por microorganismos o por oxidación (Figura 6). En este sentido, el tratamiento que exhibió una mayor viabilidad fue tratamiento A1 con un porcentaje de viabilidad del 70 % mostrando diferencias estadísticamente significativas. En este sentido, se comprobó estas diferencias del tratamiento A1 con los demás tratamientos.

Sin embargo, los demás tratamientos fueron ineficaces en el control de la contaminación generando un porcentaje de viabilidad por debajo del 50 % (Tabla 5; figura 7).

Tratamiento	Tween 20 (gotas)	Concentración (%)	Tiempo (min)	% Viabilidad
A1	3	5,25	1	70***
A2	3	3	5	30*
A3	3	1	10	10^{ns}

Nota: n= 80; los datos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis y se compararon los tratamientos con la prueba post hoc Dunn's para múltiples comparaciones a un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los (*) manifiestan el nivel de significancia entre los tratamientos en relación con el porcentaje de viabilidad.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" sometidos a varias concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y a diferentes tiempos de exposición

Figura 6. Establecimiento *in vitro* de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda". Barra= 2 cm

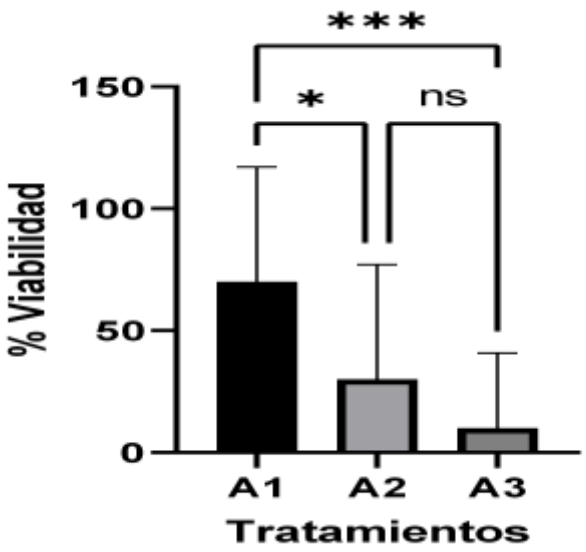

Figura 7. Diferencias entre el porcentaje de viabilidad de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" sometidos a varias concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y a diferentes tiempos de exposición

6.3.2. Fase de inducción de brotes

Luego de 3 semanas de establecidos los explantes en los medios de inducción de brotes se evidenció que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni con el control (Figura 9). En efecto, la brotación máxima en promedio fue de 1; mientras que la longitud máxima, fue de más o menos 2 cm (Tabla 7). Así mismo, la variable longitud tampoco exhibió diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni con el control (Figura 10).

Tratamiento	AG_3 (mg/L)	BAP (mg/L)	Brotes (#)	Longitud (cm)
B1	0,1	1,0	$0,83 \pm 0,30^{ns}$	$1,92 \pm 0,42^{ns}$
B2	0,1	3,0	$1,13 \pm 0,48^{ns}$	$1,93 \pm 0,52^{ns}$
B3	0,1	5,0	$0,76 \pm 0,37^{ns}$	$1,89 \pm 0,52^{ns}$
Control	0,1	0,0	0,80 ± 0,45	2,17 ± 0,89

Nota: n= 80; los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se compararon los tratamientos con la prueba post hoc Dunn's de múltiples comparaciones a un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los (*) manifiestan el nivel de significancia entre los tratamientos en relación con el número de brotes y su longitud. Las letras (^{ns}) indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ni con el control.

Tabla 7. Número y longitud de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al combinar dos reguladores de crecimiento

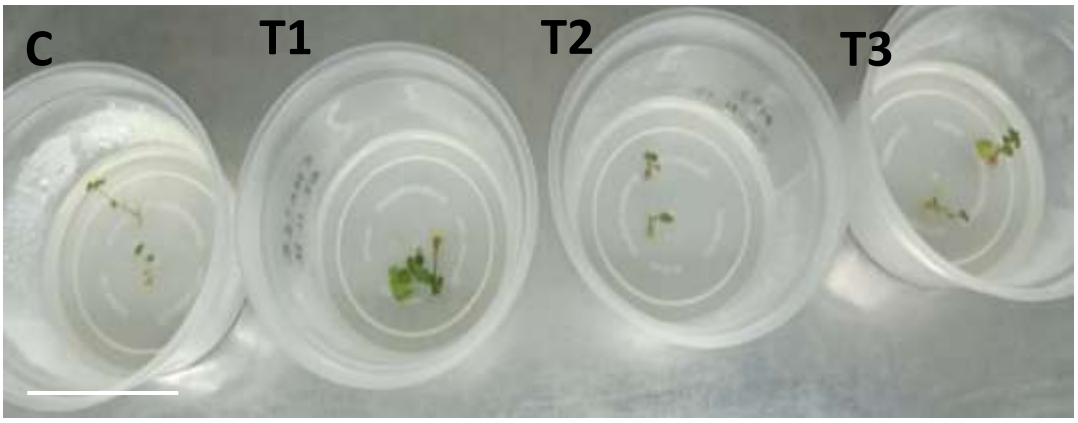

Figura 8. Formación de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" a los 20 días después de la siembra. Barra= 2 cm.

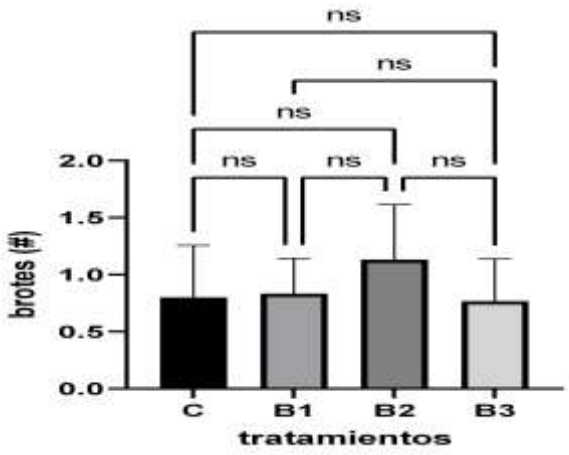

Figura 9. Diferencias entre el número de brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al combinar dos reguladores de crecimiento

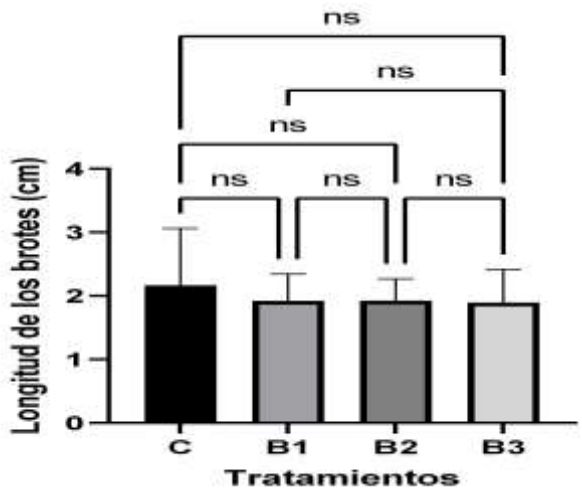

Figura 10. Diferencias entre la longitud de los brotes de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al combinar dos reguladores de crecimiento

6.3.3. Fase de enraizamiento

Después de 3 semanas de la inducción de brotes se determinó que, mediante la prueba de Kruskal-Wallis, en el número de raíces, hubo diferencias estadísticamente significativas con un $p<0,05$. Así pues, para saber cuáles grupos exhibieron estas diferencias se empleó el post hoc de Dunn's para múltiples tratamientos. En este sentido, el tratamiento C3 manifestó diferencias significativas solo con el tratamiento C1 en el número de raíces, pero no con el tratamiento C2 ni con el control. Mientras que los tratamientos C1 y C2 no mostraron diferencias con el control (Figura 11). En este sentido, la máxima cantidad de raíces en promedio fue de 11,73 (C3) aunque fue el tratamiento que manifestó la menor longitud promedio de las raíces (0,80 cm); por el contrario, el tratamiento que exhibió mayor longitud media fue C1 (4,68 cm) pero la cantidad de raíces fue similar al control (Tabla 8).

Por otro lado, en la variable longitud de raíces también se presentó diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) mediante el uso de la prueba de Kruskal-Wallis. De igual manera, se comprobó estas diferencias con el post hoc de Dunn's para múltiples tratamientos. En este sentido, el tratamiento C1 exhibió diferencias entre los demás tratamientos pero no con el control. Finalmente, el tratamiento C3 fue el que mostró diferencias con el control dado que fue el tratamiento que desarrolló la longitud mínima promedio de las raíces. (Figura 12).

Tratamiento	ANA (mg/L)	Raíces (#)	Longitud (cm)
C1	0,1	10,23 ± 1,45*	4,68 ± 0,39***
C2	0,5	11,50 ± 1,57^{ns}	1,19 ± 0,12^{ns}
C3	1,0	11,73 ± 2,15^{ns}	0,80 ± 0,11***
Control	0,0	10,40 ± 1,93	3,09 ± 0,24

Nota: n= 60; los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y se compararon los tratamientos con la prueba post hoc Dunn's de múltiples comparaciones a un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los (*) manifiestan el nivel de significancia entre los tratamientos en relación con el número de raíces y su longitud. Las letras (^{ns}) indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ni con el control.

Tabla 8. Número y longitud de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al emplear un fitorregulador de crecimiento

Figura 11. Formación de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" a los 20 días después de la siembra. Barra= 2 cm.

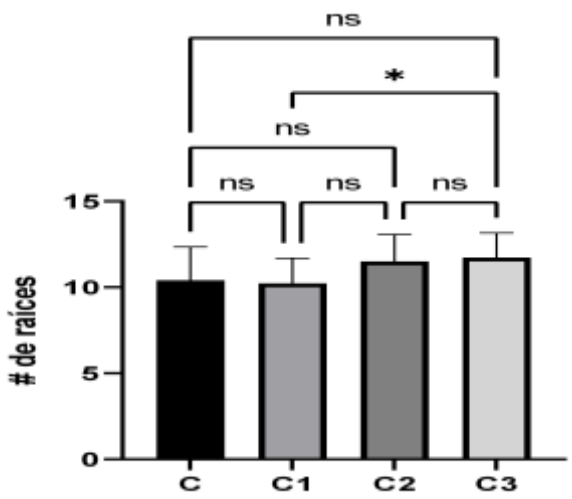

Figura 12. Diferencias entre el número de raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al utilizar un fitorregulador de crecimiento

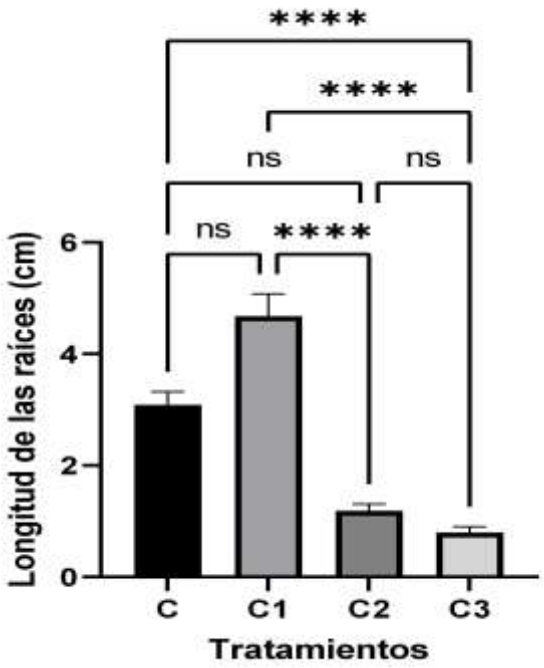

Figura 13. Diferencias entre la longitud de las raíces de *S. tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" al utilizar un fitorregulador de crecimiento

7. DISCUSIÓN

5.5. Pretratamiento hormonal

Todos los tubérculos de la especie *Solanum tuberosum* Grupo Phureja variedad "Puenda" manifestaron una brotación múltiple y rápida en este estudio como se observa en la figura 5. Este se debió al efecto provocado por la aplicación de la concentración de 10 mg/L del regulador de crecimiento AG_3 y al tiempo de exposición (3h). ahora bien, de no haberse implementado el AG_3 es probable que los resultados hubiesen sido contrarios, esto es, la aparición de brotes únicos y un mayor tiempo para la formación de los brotes. En este sentido, Degebasa (2020) encontró diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de emergencia y número de brotes de *Solanum tuberosum* al aplicar distintas soluciones de este regulador de crecimiento. Obteniendo que la concentración de 50 mg/L tuvo el mejor resultado respecto al control. De igual manera, Ahimed K *et al.* (2022) también encontraron que la aplicación de soluciones de AG_3 (30 y 70 mg/L) redujo significativamente la latencia de los brotes, pero no en el número de brotes. Por lo tanto, hay divergencias entre estos estudios con el de este trabajo en relación con la brotación múltiple empleando GA_3. Así mismo, se debe tener en cuenta que cada variedad de papa responde de distintas maneras a los reguladores de crecimiento debido a la variabilidad génica de las especies y, por ende, los resultados no siempre serán similares. De igual forma, las investigaciones mencionadas dejaron los tubérculos por periodos de tiempo cortos (menores a 30 min). A diferencia de este trabajo que se dejaron por un lapso de 3 horas. De lo anterior, surge la siguiente hipótesis: el tiempo de exposición prolongado al regulador de crecimiento influye en la formación de múltiples brotes. Por consiguiente, es necesario probar diferentes tiempos de exposición del AG_3 para determinar la influencia del tiempo en la formación del número de brotes. En

general, la aplicación de soluciones de AG_3 es indispensable en la reducción de la latencia de los brotes, con lo cual se puede acelerar el proceso de brotación y, por ende, obtener resultados más rápidos.

A partir de lo anterior, se puede afirmar que el retardo en la formación de brotes se debe al letargo o dormancia que posee el tubérculo. Este suceso es provocado por otro regulador de crecimiento conocido como ácido abscísico (ABA) el cual, en esta etapa de latencia, se encuentra en altas concentraciones dentro del tubérculo y ejerce un efecto inhibitorio sobre el ciclo celular con la finalidad de evitar la brotación apical cuando las condiciones ambientales no son las idóneas (Haider *et al.,* 2022). En otras palabras, el ABA reprime la actividad de los complejos quinasas dependientes de ciclinas (CDKA) impidiendo la entrada a la fase S del ciclo celular. Es por esto que, el ácido giberélico (AG_3), al bloquear la acción del ABA, tiene lugar la expresión de citoquininas endógenas permitiendo la entrada de las células a la división celular. Por lo tanto, la multiplicación celular inducida por el AG_3 da origen a los múltiples brotes (Che *et al.,* 2022; Tuan *et al.,* 2018).

5.6. Fase de propagación

5.6.1. Fase de desinfección

Se comprobó estadísticamente que el tratamiento A1 (figura 7) exhibió la mayor desinfección del material con un porcentaje del 70%; mientras que el 30 %, se debió a la contaminación por microorganismos. Este resultado correspondió a la alta concentración (5,25 %) de NaOCl y menor tiempo de exposición. En este sentido, Mora *et al.* (2022) obtuvieron un porcentaje de viabilidad superior al 30 % aplicando NaOCl al 5,25 % por 10 min en 16 genotipos de papa nativa del Grupo Andígena. Por el contrario, Araque Barrera *et al.* (2018) obtuvieron

un porcentaje de viabilidad del 100 % empleando NaOCl al 10 % por 20 min en las variedades de papa Diacol Capiro y Parda Pastusa. Ahora bien, los resultados son divergentes dado que se aplican diferentes concentraciones de NaOCl a diversos tiempos y, a su vez, las características genotípicas y fenotípicas de las papas evaluadas son contrastantes. Por tal motivo, cada variedad requiere de un protocolo de desinfección específico para poder lograr un alto porcentaje de establecimiento en condiciones de laboratorio. En suma, el uso de NaOCl en procesos de desinfección resulta indispensable en la propagación *in vitro* de las variedades de *Solanum tiberosum*.

En este orden de ideas, el NaOCl es un desinfectante altamente oxidante y al estar en dosis altas permite la eliminación de los microorganismos indeseados incluyendo las estructuras vegetativas como las esporas. Sin embargo, también genera daños o lesiones en el tejido provocando la oxidación del mismo o la pérdida de la viabilidad celular (Cuba-Díaz *et al.,* 2022). Por consiguiente, es de vital importancia el correcto implemento de las dosis y los tiempos de exposición para lograr la desinfección del material y, a su vez, evitar la oxidación del tejido. En concordancia con lo anterior, existen otras sustancias de desinfección que podrían ser utilizar en este trabajo como el hipoclorito de calcio ($CaOCl_2$), el alcohol al 70 %, la yodopovidona y el HgCl (Suárez Padrón, 2020). En el caso del $CaOCl_2$, Santos *et al.* (2019) encontraron que no existen diferencias estadísticamente significativas con el NaOCl en la desinfección de semillas. No obstante, la desinfección con NaOCl resulta más factible que con $CaOCl_2$ en relación con el costo-beneficio. Por el contrario, el alcohol al 70 % no elimina las estructuras vegetativas como las esporas, la yodopovidona termina siendo altamente oxidante para el tejido y el HgCl es una sustancia tóxica no solo para el tejido, sino que también para el medio ambiente (Suárez Padrón, 2020). Por ende, el mejor desinfectante

para eliminar los microorganismos y sus estructuras vegetativas sin causar daños severos al tejido y al medio ambiente termina siendo el NaOCl.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la contaminación por microorganismos es difícil de controlar en su totalidad dado que el material recolectado provino de lugares con poca o nula asepsia y muchos patógenos encuentran las formas para sobrevivir a los tratamientos de desinfección. Es por ello, que el 30 % de la contaminación obtenido en el trabajo se haya dado por tal razón. Así pues, se podría pensar que las investigaciones mencionadas con anterioridad, en la fase de desinfección, aplicaban concentraciones altas de NaOCl por tiempos largos para eliminar la totalidad de los patógenos albergados en los brotes. No obstante, se debe tener en cuenta que la resistencia del material a la desinfección depende del genotipo, estado fisiológico y morfología del explante (Genene *et al.,* 2018).

5.6.2. Fase de inducción de brotes

En esta fase de propagación los explantes empleados no exhibieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni con el control en la formación de brotes y longitud de estos como se visualiza en la figura 9 y 10. Este resultado es congruente con el de Araque *et al.* (2018), López-Medina *et al.* (2019), López-Medina *et al.* (2020) y Lázaro *et al.* (2021) dado que en sus trabajos no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con el control empleando reguladores de crecimiento en las variables de longitud y número de brotes. Finalmente, concluyen que las variedades de la especie *S. tuberosum* pueden propagarse *in vitro* sin la necesidad de fitorreguladores. Por el contrario, Singh *et al.* (2017) obtuvieron la mayor formación de brotes de los genotipos Kufri Bahar y Kufri Surya de *S. tuberosum* empleando BAP (1,5 mg/L) y Sulfato de Adenina ($AdSO_4$: 25 mg/L). Así mismo, Kazemiani *et al.* (2018) encontraron que el máximo número

de brotes obtenidos de *S. tuberosum* se consiguió aplicando vitaminas (nicotinamida, piridoxina y tiamina) combinadas con BAP (4 mg/L). Por su parte, KUMLAY *et al.* (2021) descubrieron diferencias estadísticas significativas combinando más de dos reguladores de crecimiento en las variedades "Caspar", "Granola" y "Pasinler-92" de *S. tuberosum*, en donde el mayor número y longitud de los brotes, en todas las variedades, lo obtuvo la combinación de AG_3 (0,1 mg/L), ANA (0,1 mg/L) y JA (0,5 mg/L). A partir de lo anterior, se puede afirmar que las variedades de *S. tuberosum* pueden o no depender del uso de fitorreguladores para optimizar los procesos de brotación múltiple y elongación. En efecto, esta dependencia se subordina a factores como el genotipo, la morfología, el estado fisiológico, la calidad y tipo del explante de la variedad de papa. Por ende, las respuestas de las variedades de *S. tuberosum* son distintas al ser sometidas a concentraciones de reguladores hormonales (Hajare *et al.,* 2021). En suma, la variedad "Puenda" del Grupo Phureja de la especie *S. tuberosum* termina siendo viable su propagación *in vitro* debido al costo-beneficio dado que no requiere de la aplicación de reguladores de crecimiento para estimular la inducción de brotes. Así mismo, esta variedad se puede multiplicar masivamente para estudios de modificación génica y para la conservación del acervo genético.

En concordancia con lo anterior, Raspor *et al.* (2020) encontraron grandes cantidades de citoquininas (CK) isoprenoídicas endógenas en brotes de tubérculos de *S. tuberosum* cultivados *in vitro*, en donde las CK más abundantes fueron la isopenteniladenina (iP) y la zeatina en forma cis (cZ). A partir de lo anterior, se deduce que la inducción de brotes, en la mayoría de las variedades de papa nativa, no requiere de fuentes externas de fitorreguladores; sino que, por el contrario, las concentraciones internas son suficientes para estimular este proceso. Así pues, estas CK promueven en las células del explante la división, expansión u

proliferación celular, neoformación de órganos y el desarrollo de los cloroplastos. Todos estos mecanismos son controlados por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), implicadas en la regulación del ciclo celular, las cuales son activades por la presencia de las CK endógenas como exógenas (Saidi & Hajibarat, 2021). En síntesis, las citoquinas inducen la expresión de la proteína quinasa cdc2, esta a su vez promueve la división y la desdiferenciación celular lo cual provoca que las células se tornen totipotentes para luego diferenciarse en el tejido específico. Por lo tanto, las CK ya sean endógenas como exógenas generar la formación de brotes (Bidabadi & Jain, 2020).

5.6.3. Fase de enraizamiento

En esta fase se evidenció que hubo diferencias estadísticamente significativas en la longitud de la raíz entre el tratamiento C1 (4,68 cm) con el resto de los tratamientos C2 (1,19 cm) y C3 (0,80 cm), pero no con el control (3,09 cm). Esto indica que las dosis 0,5 mg/L o superiores causan una disminución de la longitud de las raíces pero no un aumento notorio en la cantidad de las mismas. Por el contrario, concentraciones bajas (0,1 mg/L) o nulas (0 mg/L) provocan una mayor elongación de las raíces pero una disminución en la cantidad y el grosor de éstas (Figura 10). Por lo tanto, el empleo de fitorreguladores de enraizamiento afecta la morfología de este órgano, es decir, provoca cambios en el grosor, tamaño y longitud de las raíces.

En este orden de ideas, las variables longitud y número de las raíces de esta investigación son convergentes con los resultados obtenidos por Araque *et al.* (2018) quienes obtuvieron el mayor número de raíces 7.08 y la menor longitud 5,46 cm en la variedad de papa Diacol Capiro empleando la máxima concentración de auxinas (AIB: 0,1 mg/L); sin embargo, en el mismo estudio obtuvieron el mínimo número de raíces 2,40 y de longitud 1,06 cm en la

variedad Parda Pastusa. Por el contrario, López-Medina (2019) *et al.* no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control empleando reguladores de crecimiento en el número y longitud de las raíces en la variedad de papa "Maria Reiche" y terminaron afirmando que esta variedad no requiere el uso de fitorreguladores para su propagación. Así pues, todos estos resultados indican que las variedades a pesar de ser de la misma especie responden de forma diferente a la acción de los fitorreguladores de crecimiento. Por lo tanto, cada variedad requiere de un protocolo diferente de propagación.

En concordancia con lo anterior, esta respuesta al enraizamiento se puede atribuir a las condiciones fisiológicas de los brotes dado que estos explantes contienen una mayor concentración de reguladores hormonales especialmente auxinas y fotoasimilados (Raspor *et al.,*2020). Por consiguiente, los meristemos apicales de estos brotes al tener estas dos sustancias exhiben una alta capacidad de enraizamiento.

Por otro lado, Lázaro *et al.* (2021) afirman que el mayor número y longitud de las raíces se relaciona con un mayor éxito de aclimatación *ex vitro* debido a una mayor absorción de los nutrientes por parte del sistema radicular. No obstante, en este estudio el tratamiento con la dosis más alta de ANA (1 mg/L) obtuvo la mayor cantidad de raíces pero la menor longitud; mientras que, la concentración mínima (0,1 mg/L), generó raíces de mayor tamaño pero en menor cantidad. Esto indicaría que los explantes sometidos a concentraciones bajas o nulas de auxinas compensan la disminución del número de raíces con el aumento en la longitud de éstas. Del mismo modo, los explantes estimulados con altas concentraciones de fitorreguladores de enraizamiento como ANA, generan más raíces de mayor grosor pero con menor longitud para suplir su tamaño reducido. Estos resultados son similares a los Elmongy

et al. (2018) y Nazir *et al.* (2022) los cuales encontraron que altas concentraciones de ANA (mayor a 1 mg/L) previenen el alargamiento de la raíz y, en cambio, aumentan la formación de raíces adventicias y concluyen que las dosis altas de ANA inhiben el alargamiento de las raíces. La explicación a este fenómeno a nivel fisiológico es poco clara, según Fendrych *et al.* (2018) y Li *et al.* (2021); empero, expresan que las altas concentraciones de auxinas inhiben el crecimiento radicular debido a la activación específica del correceptor TIR1/AFB-Auxin-Aux/IAA que bloquea los procesos transcripcionales encargados de la elongación de las raíces. En general, al no haber diferencias estadísticamente significativas entre el control con los diferentes tratamientos esto sugiere que la variedad "Puenda" de *S. tuberosum* Grupo Phureja no requiere de fitorreguladores como las auxinas para el enraizamiento.

8. CONCLUSIONES

El establecimiento en condiciones de laboratorio de la variedad “Puenda” de *S. tuberosum* Grupo Phureja se logra con tratamientos de desinfección que incluyen NaOCl a una concentración de 5,25 % y un lapso de tiempo de 1 min para obtener un porcentaje de viabilidad del 70%.

El empleo de citoquininas exógenas (BAP) combinados con AG_3 no influyen en la inducción de brotes de la variedad “Puenda” de *S. tuberosum* Grupo Phureja debido a que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con el control en el número y tamaño de los brotes.

La aplicación de auxinas (ANA) no inciden en la formación de raíces de la variedad “Puenda” de *S. tuberosum* Grupo Phureja dado que solo hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos pero no con el control en el tamaño y cantidad de las raíces. No obstante, el uso de concentraciones de ANA superiores a 0,1 mg/L tiende a disminuir la longitud de las raíces.

La variedad “Puenda” de *S. tuberosum* Grupo Phureja no quiere de reguladores de crecimiento para su propagación; sino que, por el contrario, solo es necesario la aplicación de sales basales MS al 100% de su concentración, ácido ascórbico (100 mg/L) y sacarosa (30 g/L) para su propagación.

En términos de costo-beneficio termina siendo adecuada la variedad “Puenda” para propagarla masivamente en condiciones axénicas para proyectos investigativos y sociales. Al mismo tiempo, resulta necesario su propagación para la conservación de su acervo genético debido a que es un material nativo.

9. RECOMENDACIONES

Es importante tener en cuenta que este estudió se llevó a cabo empleando material externo y no en condiciones de invernadero debido a que, en el tiempo que se llevó el trabajo investigativo, la universidad no contaba con este recurso. En este sentido, trabajar con un material que no está en un invernadero contribuye a un aumento de la contaminación microbiológica y a una disminución en el establecimiento *in vitro*. Por lo tanto, es indispensable obtener el material de un invernadero para reducir la contaminación microbiológica y, esta manera, aumentar el porcentaje de viabilidad de los explantes.

Así mismo, es necesario utilizar otros tipos de reguladores de crecimiento y a diferentes dosis tanto en la inducción de brotes como en el enraizamiento para comprobar si se obtiene resultados diferentes o, por el contrario, resultados semejantes. Cabe resaltar que las variedades de papa tienden a tener una respuesta distinta a cada fitorregulador de crecimiento.

De igual manera, es indispensable realizar estudios sobre esta papa nativa evaluando el efecto que tiene otras sustancias como la cantidad de sacarosa en el medio tanto en la formación de brotes como en el enraizamiento de las plántulas. Esto con el fin de comprobar si existe otra variable que influye en la propagación *in vitro* de esta variedad. Finalmente, se deben hacer estudios *ex vitro* para comprobar la efectividad que tiene la propagación *in vitro* en esta variedad de papa.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., ... & Dobránszki, J. (2022). An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, *8*(8), 677.

Abiri, R., Atabaki, N., Abdul-Hamid, H., Sanusi, R., Ab Shukor, N. A., Shaharuddin, N. A., ... & Malik, S. (2020). The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus sp. Forests*, *11*(11), 1211.

Ahimed, K., Mengistu, F. G., & Asella, E. (2022). Effects of Plant Growth Regulators on Tuber Dormancy and Sprouting of Potato (*Solanum tuberosum L*.) Varieties at Kulumsa, Southeast Ethiopia.

Minagricultura (2020). Ministerio de Agricultura y riego (MINAGRI). Recuperado el 5 de diciembre de 2022 de: https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Recomendaciones-de-Corpoica.aspx

Aksenova, N. P., Konstantinova, T., Golyanovskaya, S. A., Sergeeva, L. I., Romanov, G. A., Barman, B., ... & Langer, F. (2020). 6. Referencias introducción y discusión general. *Desarrollo, crecimiento y rendimiento de cultivares de papa diploide en ambientes contrastantes por altitud*, *59*(4), 89.

Araque Barrera, E. J., Bohórquez Quintero, M. D. L. A., Pacheco Díaz, J. E., Correa Mora, L. Y., Urquijo Ruiz, J. S., Castañeda Garzón, S. L., & Pacheco Maldonado, J. C. (2018). Propagación y tuberización *in vitro* de dos variedades de papa. *Ciencia en Desarrollo*, *9*(1), 21-31.

Barrero-farfán, I. D., & Giraldo, A. C. (2008). Expresión GUS en explantes de

Solanum phureja (Juz. et. Buk) Var. Criolla Colombia, transformados con *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biológica Colombiana*, *13*(1), 119-130.

Berestovoy, M. A., Pavlenko, O. S., & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2020). Plant fatty acid desaturases: Role in the life of plants and biotechnological potential. *Biology Bulletin Reviews*, *10*, 127-139.

Bernal, D. A. C., & Giraldo, A. C. (2004). Estudios orientados a la transformación de papa criolla (*Solanum phureja*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biológica Colombiana*, *9*(2), 90-91.

Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, *9*(6), 702.

Brar, D. S., & Khush, G. S. (2021). Cell and tissue culture for plant improvement. In *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity* (pp. 229-278). CRC Press.

Bruce, M. A., & Shoup Rupp, J. L. (2019). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum tuberosum L*., potato. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 203-223.

Concepción-Hernández, M. (2018). CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Biotecnología vegetal*, *18*(3).

Cerón-Lasso, M., Alzate-Arbeláez, A. F., Rojano, B. A., & Ñuztez-Lopez, C. E. (2018). Composición fisicoquímica y propiedades antioxidantes de genotipos nativos de papa criolla (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). *Información tecnológica*, *29*(3), 205-216.

Chavarro-Mesa, E., Herrera-Blanco, N. A., Beltrán-Acosta, C. R., Cotes-Prado, A. M., & Ángel-Díaz, J. E. (2021). Diversidad genética de *Rhizoctonia solani* GA-3PT, causa

etiológica del chancro del tallo y la sarna de la papa en Colombia. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, *22*(3), e1888-e1888.

Chilma Fernández, M. D. (2018). Evaluación de la influencia de la densidad de siembra en el tamaño del tubérculo y producción del cultivo de papa criolla variedad "Yema de huevo" (*Solanum phureja* Juz Et Buk. et.) en el corregimiento Santa Leticia municipio de Puracé departamento del Cauca.

Cuba-Díaz, M., Rivera-Mora, C., Navarrete, E., & Klagges, M. (2020). Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Scientific Reports*, *10*(1), 3845.

Dane. (2020a). Encuesta Nacional Agropecuaria. Boletín Técnico Primer semestre 2019. Recuperado el 9 de 17 de junio de 2023 de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2019/boletin_ena_2019.pdf

Dane. (2020b). Encuesta Nacional Agropecuaria. Boletín Técnico Primer semestre 2019. Departamento Norte de Santander. Recuperado el 17 de junio de 2023 de: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2019/presentacion-ena-nte-santander-2019.pdf

Degebasa, A. C. (2020). Treatments of Gibberellic Acid for Vegetative Growth, Tuber Yield and Quality of Potato (*Solanum tuberosum L.*) in the Central Highlands of Ethiopia. *Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development*, *7*, 1-11.

de los Angeles Bohórquez-Quintero, M., Galvis-Tarazona, D. Y., Arias-Moreno, D. M., Ojeda-Peréz, Z. Z., Ochatt, S., & Rodríguez-Molano, L. E. (2022). Morphological and

anatomical characterization of yellow diploid potato flower for effective breeding program. *Scientific reports*, *12*(1), 1-12.

Del Buono, D. (2021). Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. *Science of the Total Environment*, *751*, 141763.

Díaz-Pillasca, H. B., Vásquez, A. D. C. G., & Bazalar, G. D. (2022). Efecto de tres medios de cultivo en la propagación *in vitro* de *Solanum chaucha* Juz. & Bukasov. *Aporte Santiaguino*, 9-21.

Elmongy, M. S., Cao, Y., Zhou, H., & Xia, Y. (2018). Root development enhanced by using indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of in vitro Azalea microshoots. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*, 813-825.

FEDEPAPA & Fondo Nacional de Fomento de la Papa [FNFP]. (2020). Boletín Regional No. 5 Santander y Norte de Santander. Recuperado el 17 de junio de 2023 de: https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2021/09/SANTANDER-2019.pdf

FEDEPAPA & Fondo Nacional de Fomento de la Papa [FNFP]. (2022a). Boletín Regional No. 6 Nacional. Recuperado el 17 de junio de 2023 de: https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2023/01/Boleti%CC%81n-Nacional.pdf

FEDEPAPA & Fondo Nacional de Fomento de la Papa [FNFP]. (2022b). Boletín Regional No. 6 Santanderes. Recuperado el 17 de junio de 2023 de: https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2022/09/Regional-Santanderes.pdf

FEDEPAPA & Fondo Nacional de Fomento de la Papa [FNFP]. (2021). Informes interactivos del subsector papa. Recuperado el 17 de junio de 2023 de:

https://observatoriofnfp.com/estadisticas/

Fendrych, M., Akhmanova, M., Merrin, J., Glanc, M., Hagihara, S., Takahashi, K., & Friml, J. (2018). Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling. *Nature plants*, *4*(7), 453-459.

Giraldo Ramírez, S., Sierra Mejía, A., Ospina Ortiz, M. I., Higuita Valencia, M., Gallo García, Y., Gutiérrez Sánchez, P. A., & Marín Montoya, M. (2022). Detección y caracterización molecular del potato virus b (pvb) en papa criolla (*Solanum phureja*) en Antioquia. *Acta Biológica Colombiana*, *27*(2).

Genene, G., Mekonin, W., Meseret, C., Manikandan, M., & Tigist, M. (2018). Protocol optimization for in vitro propagation of two Irish potato (*Solanum tuberosum L.*) varieties through lateral bud culture. *African Journal of Plant Science*, *12*(8), 180-187.

Grisales-Vásquez, N. Y., & Cotes-Torres, J. M. (2019). General and Specific Combinatorial Aptitude in a F1 Population of *Solanum phureja* with Resistance to Phytophthora infestans. *American Journal of Potato Research*, *96*(1), 55-61.

Haider, M. W., Nafees, M., Ahmad, I., Ali, B., Maryam, Iqbal, R., & Elshikh, M. S. (2022). Postharvest dormancy-related changes of endogenous hormones in relation to different dormancy-breaking methods of potato (Solanum tuberosum L.) tubers. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 945256.

Hajare, S. T., Chauhan, N. M., & Kassa, G. (2021). Effect of growth regulators on *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum L.*) Gudiene and Belete varieties from Ethiopia. *The Scientific World Journal*, *2021*.

Hashim, M., Ahmad, B., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2021).

Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants *in vitro* cultures. *Plants*, *10*(8), 1521.

Huamán, E. H., Contreras, L. D. P. J., Chavez, J. C. N., & Silva, R. C. (2017). Aplicación de la giberelina (Ryz up), para inducir la brotación en tubérculos de la papa (*Solanum tuberosum*) variedad canchán INIA. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, *1*(2), 17-24.

Karimi, V., Karami, E., & Keshavarz, M. (2018). Climate change and agriculture: Impacts and adaptive responses in Iran. *Journal of Integrative Agriculture*, *17*(1), 1-15.

Kazemiani, S., Motallebi-Azar, A. R., Panahandeh, J., Mokhtarzadeh, S., & Ozdemir, F. A. (2018). Shoot proliferation from potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) under different concentration of MS include vitamins and BAP medium. *Prog. Nutr*, *20*, 160-166.

Kher, M. M., Shekhawat, M. S., Nataraj, M., & Teixeira da Silva, J. A. (2020). Indian sarsaparilla, Hemidesmus indicus (L.) R. Br. ex Schult: tissue culture studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(15), 6463-6479.

Kome, G. K., Enang, R. K., & Yerima, B. P. K. (2018). Knowledge and management of soil fertility by farmers in western Cameroon. *Geoderma regional*, *13*, 43-51.

Kou, S., Chen, L., Tu, W., Scossa, F., Wang, Y., Liu, J., ... & Xie, C. (2018). The arginine decarboxylase gene ADC 1, associated to the putrescine pathway, plays an important role in potato cold-acclimated freezing tolerance as revealed by transcriptome and metabolome analyses. *the plant journal*, *96*(6), 1283-1298.

Kumlay, A. M., Canan, K. A. Y. A., & Yildirim, B. (2021). Different plant growth regulators on improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Institute of*

Science and Technology, *11*(2), 1603-1615.

Lázaro, A. J. P., Amasifuen, A. D. H., & Pillasca, H. B. D. (2021). Multiplicación y reducción del crecimiento *in vitro* de papa chaucha (*Solanum tuberosum* L. grupo Phureja). *Manglar*, *18*(2), 123-128.

Li, L., Verstraeten, I., Roosjen, M., Takahashi, K., Rodriguez, L., Merrin, J., & Friml, J. (2021). Cell surface and intracellular auxin signalling for H+ fluxes in root growth. *Nature*, *599*(7884), 273-277.

Lopéz-Medina, E., Mostacero-León, J., Gil-Rivero, A., Lopéz-Zavaleta, A., & De La Cruz-Castillo, A. (2019). Efecto del ácido giberélico y del ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de *Solanum tuberosum* var. Maria Reiche. *Revista Científica REBIOL, 39*(1), 4-9.

López-Medina, S. E., Mostacero-León, J., Gil-Rivero, A. E., Lopéz–Zavaleta, A., Anthony, J., & Villena-Zapata, L. (2020). Concentraciones de 6-Bencilaminopurina en la propagación *in vitro* de *Solanum tuberosum* var. Cochacina, en sistemas líquidos estacionario y en agitación. *Manglar*, *17*(4), 337-340.

Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breeding science*, *65*(1), 26-40.

Mali, S., Dutta, M., & Zinta, G. (2022). Genome editing advancements in potato (*Solanum tuberosum* L.): operational challenges and solutions. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-13.

Marquez-Vasallo, Y., Salomon-Diaz, J. L., & Acosta-Roca, R. (2020). Analysis of the genotype environment interaction in the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos*

Tropicales, *41*(1), e10.

Mejía, A. S., García, Y. G., Arteaga, M. E., Gutiérrez, P. A., & Montoya, M. M. (2020). Detección molecular de seis virus de ARN en brotes de tubérculos de papa criolla (*Solanum phureja*) en Antioquia, Colombia. *Bioagro*, *32*(1), 3-14.

Mora, L. Y. C., Tarazona, D. Y. G., Bohórquez Quintero, M. D. L. A., Barrera, E. J. A., Ruíz, J. S. U., Moreno, D. M. A., & Pérez, Z. Z. O. (2022). Impact of initial explants on *in vitro* propagation of native potato (*Solanum tuberosum*, Andigena group). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *150*(3), 627-636.

Moreno Mendoza, J. D., Lasso, C., del Socorro, M., & Valbuena Benavidez, R. I. (2009). Papas nativas colombianas/catálogo de 60 variedades. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica

Moreno, M., & Oropeza, M. (2017). Efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(2), 25-34.

Narváez-Cuenca, C. E., Peña, C., Restrepo-Sánchez, L. P., Kushalappa, A., & Mosquera, T. (2018). Macronutrient contents of potato genotype collections in the *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Journal of Food Composition and Analysis*, *66*, 179-184.

Nazir, U., Gul, Z., Shah, G. M., & Khan, N. I. (2022). Interaction effect of auxin and cytokinin on in vitro shoot regeneration and rooting of endangered medicinal plant Valeriana jatamansi jones through tissue culture. *American Journal of Plant Sciences*, *13*(2), 223-240.

Oseni, O. M., Pande, V., & Nailwal, T. K. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International*

journal of current microbiology and applied sciences, *7*(7), 3778-3786.

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *55*(3), 242-257.

Pontes, J. G. D. M., Fernandes, L. S., dos Santos, R. V., Tasic, L., & Fill, T. P. (2020). Virulence factors in the phytopathogen–host interactions: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(29), 7555-7570.

Prajwala, K. A., Subbaramamma, P., & Viswanath, M. (2021). *In vitro* propagation techniques in pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *The Pharma Innovation Journa,* 10 (6), 1217-1223.

Raspor, M., Motyka, V., Ninković, S., Dobrev, P. I., Malbeck, J., Ćosić, T., & Dragićević, I. Č. (2020). Endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in *in vitro* grown potato: A contribution to potato hormonomics. *Scientific reports*, *10*(1), 1-13.

Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2021). Phytohormones: plant switchers in developmental and growth stages in potato. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 1-17.

Santos Pérez, U. I., Pedraza Santos, M. E., Salgado Garciglia, R., Martínez Palacios, A., Chávez Bárcenas, A. T., & González Arnao, M. T. (2019). Efectividad de métodos para desinfestar semillas de *Laelia autumnalis* para la conservación en nitrógeno líquido. *Nova scientia*, *11*(23).

Singh, A. K., Sharma, M. K., Chaudhary, R., & Sengar, R. S. (2017). Effects of BAP and adenine sulphate on shoot regeneration from callus in potato (*Solanum Tuberosum*

L.). *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*, *7*(1), 49-51.

Song, Q., Wang, X., Li, J., Chen, T. H., Liu, Y., & Yang, X. (2021). CBF1 and CBF4 in *Solanum tuberosum L*. differ in their effect on low-temperature tolerance and development. *Environmental and Experimental Botany*, *185*, 104416.

Suárez-Padrón, I. E. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Fondo editorial Universidad de Córdoba. Montería, Colombia.

Teixeira da Silva, J. A., Gulyás, A., Magyar-Tábori, K., Wang, M. R., Wang, Q. C., & Dobránszki, J. (2019). *In vitro* tissue culture of apple and other Malus species: recent advances and applications. *Planta*, *249*(4), 975-1006.

Teixeira da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., & Dobránszki, J. (2020). Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. *Planta*, *252*(3), 1-35.

Tuan, P. A., Kumar, R., Rehal, P. K., Toora, P. K., & Ayele, B. T. (2018). Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 668.

Villa, A. L., Sánchez, A. M., Valbuena, R. I., & Escobar, R. (2007). Evaluación preliminar de técnicas de crioconservación en una accesión *de Solanum phureja*. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, *8*(2), 50-59.