

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“USO DE MANITOL Y SORBITOL EN LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE DOS ECOTIPOS COMERCIALES DE AGUAYMANTO  
(*Physalis peruviana*)”**

Presentada por:

**Jonathan David Ventura Quispe**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“USO DE MANITOL Y SORBITOL EN LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE DOS ECOTIPOS COMERCIALES DE AGUAYMANTO  
(*Physalis peruviana*)”**

Presentada por:

**Jonathan David Ventura Quispe**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Mg. Sc. Abelardo Calderón Rodríguez  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Sc. María de Lourdes Tapia Figueroa  
**MIEMBRO**

---

Dr. Alfredo Rodríguez Delfín  
**MIEMBRO**

---

Dra. Antonietta Gutiérrez Rosati  
**ASESORA**

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	5
2.2. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA .....	6
2.3. IMPORTANCIA .....	8
2.4. ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS.....	8
2.5. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	10
2.6. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> A MEDIANO PLAZO.....	11
2.7. INFLUENCIA DE LOS AGENTES OSMÓTICOS EN LOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	13
2.8. MANITOL Y SORBITOL .....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	17
3.2. MATERIAL VEGETAL.....	17
3.3. AMBIENTES, MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS .....	18
3.3.1. AMBIENTES.....	18
3.3.2. MATERIALES-REACTIVOS.....	18
3.3.3. EQUIPOS.....	19
3.4. METODOLOGÍA UTILIZADA.....	19
3.4.1. UNIFORMIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL .....	19
3.4.2. MEDIOS DE CULTIVOS QUE CONFORMAN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS .....	20
3.4.3. CORTE DE LOS EXPLANTES Y SIEMBRA DE LOS MISMOS ....	21

3.5.	MEDICIÓN DE LAS VARIABLES Y DISEÑO ESTADÍSTICO APLICADO.....	21
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	23
4.1.	ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PRINCIPALES .....	23
4.1.1.	EFECTO PRINCIPAL DEL FACTOR TRATAMIENTO .....	23
4.1.2.	EFECTOS PRINCIPALES DE LOS FACTORES PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL Y DÍA DE EVALUACIÓN.....	28
V.	CONCLUSIONES .....	34
VI.	RECOMENDACIONES .....	35
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
VIII.	ANEXOS .....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Physalis peruviana</i> L.....	6
Tabla 2. Procedencia del material vegetal empleado en el estudio - Codificación establecida por CIRGEBB. ....	18
Tabla 3. Diferencias estadísticas entre los niveles del Factor Tratamiento obtenidas mediante análisis Tukey .....	24
Tabla 4. Similitudes estadísticas obtenidas mediante análisis Tukey de los Factores Procedencia de material vegetal y Día de evaluación en cada una de las variables de estudio. ....	29
Tabla 5. Altitudes promedio de las provincias de procedencia del material vegetal .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de la planta de aguaymanto (a), flor (b) y frutos maduros (c).....7

Figura 2. Diagrama de barras de los promedios obtenidos en las variables a. Longitud de plántula, b. Número de nudos por plántula, y c. Número de explantes vivos por frasco, debidos al efecto del factor Tratamiento. Las líneas sobre las barras indican el error estándar. ....25

Figura 3. Diagrama de barras de los promedios de cada variable registrados de acuerdo al tipo de material vegetal (a, b, c) y a los días de evaluación (d, e, f). ....30

## **ANEXOS**

ANEXO 1: COMPONENTES DEL MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962) .....	49
ANEXO 2: VALORES PROMEDIO DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO.....	50
ANEXO 3: CUMPLIMIENTO DE LOS SUPUESTOS DEL ANOVA .....	52
ANEXO 4: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS TRES VARIABLES EN ESTUDIO.....	53

## RESUMEN

*Physalis peruviana* L., “Aguaymanto”, es una especie oriunda de los andes peruanos que en los últimos años ha cobrado importancia comercial debido a las propiedades de su fruto como alimento funcional. El presente trabajo evaluó el efecto de la adición de dos agentes osmóticos, manitol y sorbitol, sobre el crecimiento y desarrollo de microesquejes cultivados *in vitro*. El estudio se desarrolló utilizando material vegetal procedente de las regiones Cajamarca y Junín (Caj 04, Caj 05, Jun 01 y Jun 03), para la futura elaboración de un medio de cultivo que permita la conservación a mediano plazo de esta especie. En el estudio se utilizó el medio formulado por Murashige y Skoog (1962), al que se le adicionó una concentración de 20 g/L de manitol, sorbitol, o ambos osmolitos al mismo tiempo. Los experimentos contaron con controles negativos de medio MS (1962) sin reguladores osmóticos. Evaluaciones realizadas a los 50, 100 y 130 días para las variables: longitud de plántula, número de nudos y número de explantes vivos fueron analizadas estadísticamente utilizando un Diseño Completo al Azar (DCA) en arreglo factorial. Los explantes pudieron ser conservados efectivamente durante el periodo de evaluación. Los resultados experimentales mostraron que tanto el medio *in vitro* conteniendo ambos reguladores osmóticos como el material vegetal procedente de la región Cajamarca mostraron las mejores respuestas a las variables en estudio.

Palabras clave:

*Physalis peruviana*, conservación *in vitro*, ecotipos, manitol, sorbitol.



## ABSTRACT

*Physalis peruviana* L., "Aguaymanto", is a native species of Peruvian Andes that in recent years has gained commercial importance due to the properties of its fruit as a functional food. The present work evaluated the effect of the addition of two osmotic agents, mannitol and sorbitol, on the growth and development of shoots cultivated in vitro. The study was developed using plant material from Cajamarca and Junín regions (Caj 04, Caj 05, Jun 01 and Jun 03), for the future development of a culture medium that allows the medium-term conservation of this species. In the study, the medium formulated by Murashige and Skoog (1962) was used, to which was added a concentration of 20 g / L of mannitol, sorbitol, or both osmolytes at the same time. The experiments had negative controls of MS medium (1962) without osmotic regulators. Evaluations performed at 50, 100 and 130 days for the variables: seedling length, number of nodes and number of live explants were analyzed statistically using a Complete Random Design (DCA) in factorial arrangement. The explants were effectively preserved during the evaluation period. The experimental results showed that both the in vitro medium containing both osmotic regulators and the plant material from Cajamarca showed the best responses to the variables under study.

### Key Words:

*Physalis peruviana*, in vitro conservation, ecotypes, mannitol, sorbitol.

## I. INTRODUCCIÓN

*Physalis peruviana* L. conocido con los nombres comunes de “Aguaymanto”, “Uchuva” o “Uvilla”, es una especie tropical originaria de los Andes Peruanos que presenta múltiples características de interés comercial. Se le puede encontrar en estado silvestre, acondicionada a múltiples ambientes. Fischer *et al.* (2014) mencionan que, en el informe del Proyecto de Desarrollo Rural Sostenible/GIZ del año 2011, se reconoció a la cordillera de los andes como el principal factor que ha contribuido a la generación de la gran diversidad de ecotipos de Aguaymanto.

De acuerdo con Málaga *et al.* (2013), el fruto del Aguaymanto es valorado en el mercado por ser un alimento funcional, ya que brinda al consumidor no sólo beneficios nutricionales sino también beneficios para su salud, y por ello su estudio ha despertado gran interés a nivel nacional.

Los frutos de Aguaymanto son fuente de vitaminas A y C, así como minerales que incluyen al hierro y potasio, y es utilizado en la medicina popular para el tratamiento de cáncer, leucemia, hepatitis y otras enfermedades como la diabetes, debido a su alto contenido de polifenoles y carotenoides con actividad antiinflamatoria (Zhang *et al.*, 2013; Yücesan *et al.*, 2015). Las características nutricionales y propiedades medicinales descritas hacen del cultivo y producción comercial del Aguaymanto una alternativa económica para pequeños y medianos agricultores en países como Perú (Fischer *et al.*, 2014).

Dentro de la especie existen genotipos adaptados a diferentes climas y estos genotipos son denominados “ecotipos”, los cuales difieren entre sí en cuanto a tamaño, color y forma del fruto, forma de la flor, y altura y tamaño de la planta (Dostert *et al.*, 2011).

La producción comercial de Aguaymanto en el Perú es reciente y adolece de una adecuada

tecnificación y manejo agronómico considerable (Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque, 2014). Las principales regiones donde se cultiva son Cajamarca, Cuzco, Junín, La libertad y Ancash, los cuales atienden el consumo en fresco del mercado interno, con poco volumen que es procesado y exportado (Fischer *et al.*, 2014).

A pesar de estos inconvenientes, las investigaciones para el aprovechamiento del fruto de Aguaymanto, relacionadas al manejo agronómico, manejo post-cosecha y transformación, contribuyeron al incremento en las exportaciones del mismo durante el periodo 2010-2014 desde US\$ 160 mil a US\$ 1.6 millones de dólares americanos (Sierra Exportadora, 2015). En setiembre del 2016 la cifra anual por exportaciones de Aguaymanto alcanzó los US\$ 2.4 millones (Sierra y Selva Exportadora, 2016).

A nivel mundial Colombia es el primer productor de este fruto y además ha logrado posicionarse en el mercado europeo como el primer proveedor, seguido por Zimbabue (Espinoza, 2015). El fruto del ecotipo colombiano es dulce y con una coloración amarillo intensa (Dostert *et al.*, 2011). En el año 2015 las exportaciones del fruto fresco de Uchuva colombiano alcanzaron cerca de US\$ 25 millones de dólares americanos (AGRONET, 2016), mientras que en el 2016 alcanzaron la cifra de US\$ 23.6 millones de dólares (Ramos, 2017).

Aun cuando Colombia tiene mucha experiencia sistematizada tanto en el cultivo y exportación de Uchuva, todavía no ha ingresado al nicho de productos exóticos orgánicos, cuyo tamaño de mercado mundial alcanzó en el 2014 el valor de 80 billones de dólares (FIBL y IFOAM, 2016). Esto se ha considerado como una oportunidad al corto plazo para el Perú, dado que al crecer esta planta en forma silvestre, tiene todas las condiciones para la certificación orgánica (Espinoza, 2015).

Otra de las alternativas para elevar la competitividad del Aguaymanto peruano en el mediano plazo es el empleo de las técnicas de fitomejoramiento, las cuales, según Vallejo y Estrada (2002), tienen como objetivo la obtención de cultivares mejorados genéticamente que puedan estar adaptados a condiciones específicas, que posean mayores rendimientos económicos y que gocen de mayor calidad que las variedades nativas o criollas. Los fenómenos actuales en el mundo, como la globalización y el Tratado de Libre Comercio, exigen una mejor competitividad de los cultivos y por ello el mejoramiento genético de

plantas busca formar cultivares que respondan a las exigencias diversas de los consumidores tanto en el Perú como en el Mundo (Camarena *et al.*, 2012).

Para el fruto del Aguaymanto las características prioritarias a mejorarse son: el tamaño, el color, los grados *brix*, y el contenido nutricional (Rodríguez y Bueno, 2006). Con ese motivo, desde hace algunos años en el Perú se han iniciado estudios, entre los que destaca el cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos en esta especie, además de constituir un mecanismo de conservación *ex situ*, representa una alternativa para la uniformización del producto cosechado, que es el fruto, partiendo de la micropropagación vegetativa de ecotipos con hábitos particulares de crecimiento, calidad uniforme y alta productividad. Sin embargo, el crecimiento rápido de los explantes hace necesario un continuo refrescamiento del medio de cultivo, y ello aumenta la posibilidad de pérdidas debidas a accidentes o a contaminación microbiana durante las operaciones. Por ello es necesario reducir al mínimo la frecuencia de los subcultivos, con lo cual se logra además reducir la posibilidad de variación genética (CIAT, 1991).

La reducción del número de subcultivos es lograda a través de la técnica denominada Conservación *in vitro* a mediano plazo, la cual, de acuerdo con García-Águila *et al.* (2007), constituye una parte esencial de la estrategia general de conservación e intercambio de recursos genéticos. Al momento, existe muy poca información sobre la aplicación de ésta técnica en el Aguaymanto.

La estrategia de la conservación *in vitro* está orientada a la disminución de la tasa de crecimiento por modificación de los componentes del medio de cultivo, lo cual ofrece distintas ventajas, como el almacenamiento de un gran número de muestras en un espacio de tamaño reducido, facilidad en el manejo de un cultivo al extender el periodo de subcultivos en varios meses o incluso años, y la garantía de sanidad de las muestras.

Específicamente, los cultivos (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) son mantenidos en condiciones físicas (factores ambientales) o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a medios frescos nuevos, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos (CIAT, 1991). Este método permite así conservar el material vegetal bajo condiciones

controladas durante periodos extensos, con el fin de asegurar el aprovechamiento sostenible de la especie.

El presente trabajo pretende contribuir con la conservación de material genético de Aguaymanto bajo condiciones *in vitro* a través de la evaluación del efecto del Manitol y Sorbitol en el desarrollo y crecimiento de plántulas *in vitro*, lo cual aportará datos para la futura elaboración de un medio de conservación a mediano plazo que no sólo ralentice el crecimiento de la planta sino que también garantice la estabilidad genética de la misma.

El objetivo general del presente estudio fue evaluar el efecto a mediano plazo del Manitol y Sorbitol en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de cuatro ecotipos comerciales de Aguaymanto, para la posterior obtención de un medio de conservación que permita plazos de subcultivos de más de cuatro meses.

Los objetivos específicos incluyeron la determinación de los efectos que genera la presencia del Manitol, Sorbitol o ambos azúcares al mismo tiempo en un medio de cultivo *in vitro*, respecto a las variables “Longitud de plántula”, “Número de nudos por plántula” y “Número de explantes vivos”, tomando en consideración un lapso de cuatro meses de incubación *in vitro* aproximadamente para los ecotipos en evaluación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Los estudios taxonómicos de Linnaeus (1763) publicados en el volumen dos de la segunda edición de *Species Plantarum*, se basaron en muestras colectadas de plantas de Aguaymanto provenientes de Perú. De acuerdo con Legge (1974), este y otros registros indican que la especie *Physalis peruviana* se originó en los andes peruanos. Sin embargo, otros estudios sugieren un área más extensa para el territorio de origen, incluyendo los Andes ecuatorianos (Brito, 2002; Puente *et al.*, 2011).

En el Perú, el cultivo de Aguaymanto fue conocido desde la época de los incas, sirviendo el fruto como alimento silvestre en épocas precolombinas (NRC, 1989). En los últimos años se ha reportado su difusión en niveles andinos y costeros, pudiéndose encontrar en departamentos como Cajamarca, La Libertad, Huánuco, Apurímac, Cuzco, Lima y otros (Palacios, 1993), extendiéndose óptimamente entre los 2400 y 2800 m.s.n.m. de altitud (Roca, 2013).

Por otro lado, el cultivo de *Physalis peruviana* L. en Europa comenzó en el Reino Unido durante los primeros años del siglo XVIII (1700-1708), y luego se extendió a otros países con los primeros inmigrantes. Al respecto, Morton (1987) destaca que la planta fue cultivada en el Cabo de Buena Esperanza, al sur de África, antes de 1807, y desde esta región se extendió hacia los países de Australia y Nueva Zelanda. Posteriormente, existen registros que datan de antes de 1825 respecto al cultivo de esta especie en China, India, las islas Filipinas y Hawaianas. Actualmente la especie es cultivada en varios países a nivel mundial, en áreas tropicales, subtropicales y de clima templado (CONAFRUT, 2000).

## 2.2. TAXONOMÍA Y BOTÁNICA

*Physalis peruviana* L. pertenece a la familia Solanaceae, género *Physalis* (Tabla 1). El género comprende entre 75 a 90 especies, los cuáles se caracterizan por presentar frutos que se forman y permanecen dentro de un cáliz acrescente durante todo su desarrollo (Almanza-Merchán y Fischer, 2012).

La planta presenta un tipo de crecimiento indeterminado, lo cual implica que el desarrollo del tallo y las ramas prosigue luego de ocurrida la floración. El Aguaymanto posee un tallo erecto, poco ramificado, cilíndrico y densamente pubescente, que alcanza alturas de entre 0.45 a 1.8 m; y además un sistema radicular principalmente fibroso que se desarrolla a una profundidad de 50-80 cm (Bean, 2006; Paksi *et al.*, 2007).

La planta tiene un crecimiento herbáceo durante el primer año, luego de lo cual paulatinamente se torna en un arbusto semileñoso, perenne, con hojas simples, alternas, acorazonadas, pubescentes y de un tamaño entre cinco y quince centímetros de largo y cuatro y diez centímetros de ancho (Fischer *et al.*, 2014).

**Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Physalis peruviana* L.**

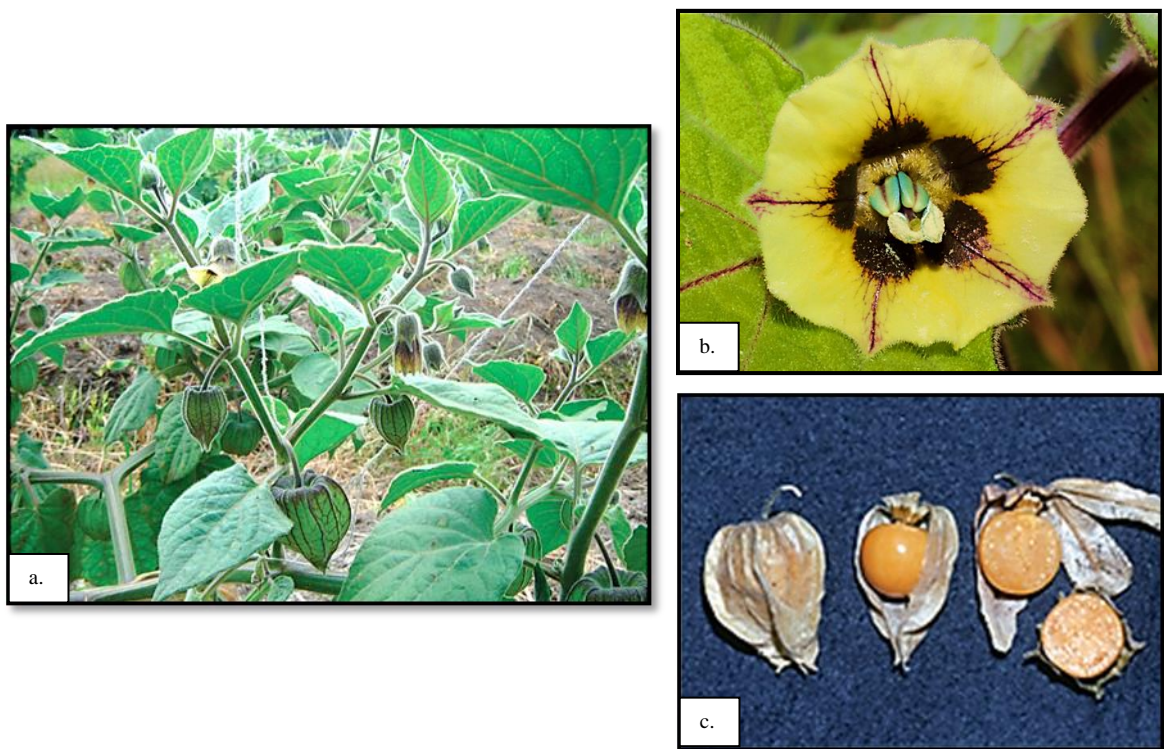
<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Subfamilia</b>	Solanoideae
<b>Tribu</b>	Physaleae
<b>Subtribu</b>	Physalinae
<b>Género</b>	<i>Physalis</i>

FUENTE: Schreiber (2012).

Las flores crecen en las axilas de las hojas y son acampanadas, pedunculadas y hermafroditas (Almanza-Merchán y Fischer, 2012). La flor es completa, con el cáliz conformado por cinco sépalos fusionados, y la corola de forma tubular, de color amarillo, con los pétalos fusionados y la presencia de cinco máculas púrpuras en la garganta del tubo (Dostert *et al.*, 2011).

El tipo de polinización es mixta, tiene polinización cruzada (principalmente entomófila y anemófila). La autopolinización también es común.

Los frutos son bayas esféricas de hasta dos centímetros de diámetro, y están rodeados por el cáliz, que se desarrolla conforme madura el fruto (León, 2000). Estas bayas contienen numerosas semillas lenticulares, aplanadas y de color amarillo. La vida del fruto después de la cosecha con el cáliz dura un mes, mientras que sin el cáliz sólo dura de cuatro a cinco días (Isla, 2016). Imágenes del aguaymanto pueden visualizarse en la Figura 1.



**Figura 1. Imágenes de la planta de aguaymanto (a), flor (b) y frutos maduros (c).**

**FUENTE: Fischer *et al.* (2014) y Dostert *et al.* (2011).**



### **2.3. IMPORTANCIA**

Al Aguaymanto se le ha encontrado una importante capacidad antioxidante debido a los compuestos fenólicos presentes en el fruto, los cuales pueden disminuir el efecto nocivo que los radicales libres causan en componentes importantes de la célula. La capacidad antioxidante del Aguaymanto se debe a compuestos fenólicos. Al favorecer entonces el desarrollo normal de las actividades celulares y mejorar las funciones del organismo, el Aguaymanto es considerado un alimento funcional con expectativas muy prometedoras para el pequeño y mediano agricultor en el Perú

Los alimentos funcionales cuentan con un mercado emergente de creciente importancia económica ya que poseen propiedades que mejoran el estado de salud y bienestar de un individuo.

Por otro lado, el fruto del aguaymanto es considerado como fuente de provitamina A, minerales, vitamina C y vitaminas del complejo B. Asimismo, se ha demostrado que los bioactivos presentes en el fruto, como vitanólidos y physalinas, presentan actividad citotóxica contra diferentes tipos de cáncer (Marín *et al.*, 2010; Quispe-Mauricio *et al.*, 2009).

Actualmente, la industria alimentaria emplea al fruto del Aguaymanto en la elaboración de bebidas, mermeladas, yogurts (Fawzy, 2011) y otros productos dietéticos con bajo nivel de calorías.

Otros autores mencionan otras propiedades medicinales al fruto de Aguaymanto tales como antiespasmódico, diurético, analgésico, antiséptico (Puente *et al.*, 2011). En la medicina tradicional peruana el fruto también es empleado empíricamente para tratar la hepatitis, asma, malaria, dermatitis, entre otras enfermedades, aunque estas propiedades no han sido científicamente probadas todavía (Zavala *et al.*, 2006).

### **2.4. ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS**

Los recursos filogenéticos pueden ser conservados a través de dos estrategias:

a) La conservación *in situ*

La conservación *in situ* involucra el mantenimiento de recursos genéticos silvestres en los hábitats naturales en los que éstos se encuentran, así como la conservación de especies domesticadas y cultivadas en el campo o en los alrededores donde ellas han desarrollado sus características distintivas (Cruz-Cruz *et al.*, 2013).

b) La conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* implica conservar las especies fuera de su hábitat natural y es empleado generalmente para salvaguardar poblaciones en peligro de destrucción, sustitución o deterioro (Rao, 2004).

Existen varias modalidades para llevar a cabo la conservación *ex situ* de las especies (Conservación de semillas, Conservación de plantas a nivel de campo, Bancos *in vitro*, etc.). Seleccionar la modalidad dependerá del tipo de material vegetal, duración de su ciclo de vida, modo de reproducción y el tamaño de sus individuos.

Aquellas semillas que se pueden secar a un bajo contenido de humedad y almacenar a temperaturas bajas, sin dañarse, se denominan semillas ortodoxas. Las técnicas para conservar semillas ortodoxas se han venido perfeccionando durante varias décadas e incluyen el secado de las semillas hasta lograr un contenido de humedad bajo (tres-siete por ciento de peso fresco, dependiendo de la especie) y al almacenamiento en recipientes herméticos, a bajas temperaturas, preferiblemente a  $-18^{\circ}\text{C}$  o menos (Rao *et al.*, 2007).

Sin embargo, aunque muchas especies producen semillas ortodoxas que pueden ser desecadas y almacenadas, un número de especies, predominantemente tropicales y subtropicales, poseen semillas recalcitrantes o intermedias, las cuales son sensibles a la desecación y a menudo también a las bajas temperaturas por lo que no pueden ser almacenadas por largos periodos (Engelmann y Engels, 2002).

Una desventaja del uso de semillas en programas de conservación es la dificultad para obtener esta estructura en algunas especies que presentan un largo período juvenil. Además, existen plantas que se propagan principalmente de forma vegetativa, como la

yuca, papa, cebolla, ajo, plátano, etc. en las cuáles no es tan fácil la obtención de semillas sexuales (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). De la misma manera, existen especies que son estériles o no producen semillas fácilmente, o la semilla es altamente heterocigota y la propagación clonal es preferida para conservar genotipos élites (Rao, 2004).

Otras opciones de conservación *ex situ* incluyen los bancos de genes en campo y los jardines botánicos (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Estas modalidades de conservación presentan desventajas como: extensiones amplias de terreno, los altos costos de mantenimiento, baja representatividad genética de las especies, estrés ambiental, y pérdida de material genético por ataque de enfermedades (Wang *et al.*, 2005).

## **2.5. CONSERVACIÓN *IN VITRO***

Las técnicas de conservación *in vitro* han permitido la preservación de recursos fitogenéticos para su uso ulterior con fines de mejoramiento genético, investigación y seguridad alimentaria (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010).

Tales técnicas se basan en la introducción de diferentes genotipos en medios de cultivo bajo condiciones asépticas, manteniendo su crecimiento y desarrollo en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y luminosidad. Si el medio de cultivo contiene todos los elementos nutritivos y hormonales necesarios y óptimos, la plántula desarrollará vigorosamente, siguiendo un ciclo de desarrollo vegetativo. Completado dicho ciclo, se deberá micropropagar o clonar a las plántulas a fin de que estas mantengan su viabilidad.

Según Sánchez-Chiang y Jiménez (2010), la conservación *in vitro* puede ser: i) De corto plazo, es decir, los ciclos de micropropagación corresponden al tiempo en que las plántulas permanecen viables o vigorosas en el medio óptimo de propagación; ii) De mediano plazo, las cuales se basan en la disminución de la actividad metabólica de las células, tejidos u órganos vegetales, a través de la adición de elementos osmóticos, como el manitol, sorbitol, sucrosa, etc., de tal manera que se haga más lento el crecimiento y desarrollo de la plántula manteniendo la viabilidad y capacidad regenerativa de sus órganos; iii) Conservación *in vitro* a largo plazo, la cual se realiza a través del congelamiento de órganos o células vegetales mediante la utilización de nitrógeno líquido (-196°C), haciendo

posible mantener al genotipo a conservarse en forma indefinida; dicha técnica es conocida también como criopreservación.

La conservación *in vitro*, además de favorecer la conservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos ofrece la posibilidad de poder limpiar de todo patógeno al material vegetal, requisito que es indispensable para la realización de ciertas investigaciones como son: la inducción de mutaciones *in vitro* y también para los bancos internacionales que intercambia recursos fitogenéticos entre sí.

## **2.6. CONSERVACIÓN *IN VITRO* A MEDIANO PLAZO**

La disminución de la capacidad metabólica de las células vegetales redundando en la disminución de la frecuencia de sub cultivos periódicos que son necesarios realizar para mantener la viabilidad de las plántulas que se conservan en bancos *in vitro*. Esta disminución de la frecuencia de sub cultivos es muy importante ya que minimiza los costos de mantenimiento de los bancos y de mano de obra, así como la posibilidad de incurrir en errores humanos por manipulación de las muestras.

De acuerdo con Cruz-Cruz *et al.* (2013), las técnicas *in vitro* empleadas para lograr la conservación a mediano plazo permiten el almacenamiento de material biológico desde algunos meses hasta dos-tres años sin la realización de algún sub-cultivo. Tales técnicas han sido aplicadas extensamente en diferentes especies, entre los que se puede mencionar los casos de *Saccharum officinarum*. (Caña de azúcar) (Taylor y Dukin, 1993), *Manihot esculenta* (Yuca) (Roca *et al.*, 1994) y *Solanum tuberosum* (papa) (Toledo y Golmirzaie, 1998).

Según Ozudogru *et al.* (2010), el método más extensamente empleado para la reducción del crecimiento *in vitro* resulta de la combinación de bajas temperaturas (generalmente, dos-cinco grados Celsius para especies de clima templado y entre 15 - 25°C para especies de climas tropicales) y baja o nula intensidad de luz (menor a 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Estas condiciones tienen consecuencias en la fisiología de la planta, como las reducciones en la respiración, la pérdida de agua, la desecación, la producción de etileno, etc. lo cual conduce a la prolongación segura del tiempo de conservación del cultivo.

El mantenimiento prolongado de los cultivos *in vitro* a temperaturas bajas puede ocasionarles daños fisiológicos que afectan al metabolismo, el contenido de proteínas, y la composición y funcionamiento de las membranas (Engelmann, 1991). Para el caso particular de plantas tropicales, la sensibilidad a daños por el frío es mayor y es necesario encontrar la temperatura de almacenamiento óptima para conservar a cada especie.

Otra variable relacionada con la reducción de la tasa de crecimiento de las plántulas *in vitro* es la composición del medio de cultivo. Cruz-Cruz *et al.* (2013) y Ozudogru *et al.* (2010) mencionan que modificando el medio de cultivo, diluyendo los elementos minerales, reduciendo la concentración de azúcar, cambiando la concentración y composición de los reguladores, utilizando retardantes del crecimiento (Cloruro de cloro colina, ácido abscísico), o adicionando compuestos osmóticamente activos (Manitol, Sorbitol), se logra retardar el crecimiento de las plántulas.

El crecimiento lento en cultivos *in vitro* puede propiciarse mediante la adición de agentes osmóticos, sustancias que inducen cambios en el potencial osmótico del medio de cultivo *in vitro* sin interferir con el metabolismo de carbono en la planta (Márquez, 2013). La limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe a la reducción de la absorción de agua y nutrientes desde el medio de cultivo, y consecuente reducción del metabolismo.

Otro método para la disminución del crecimiento de plántulas *in vitro* es la reducción de la presión parcial de oxígeno (Corredoira *et al.*, 2017). El modo más fácil de conseguirlo es cubriendo a los explantes con una capa de aceite mineral, aunque también puede lograrse disminuyendo la presión atmosférica de la cámara de cultivo o inyectando una mezcla de aire y nitrógeno (Engelmann, 1991; Rao, 2004).

Finalmente, otros factores reconocidos como importantes en el control del crecimiento *in vitro* son: el tamaño de los recipientes de cultivo, la calidad y concentración del agente gelificante y la adición de carbón activado al medio, tal como lo discuten Roca *et al.* (1991).

Para la conservación *in vitro* a mediano plazo, lo ideal es que la plántula tenga poco incremento en longitud, posea raíces con poco o nulo desarrollo y presente un aspecto

saludable. Sin embargo, la conservación a mediano plazo muchas veces provoca el cambio en el fenotipo del material conservado, el debilitamiento de la estructura de las hojas y los tallos, e inclusive el oscurecimiento de los tejidos por oxidación fenólica. Por esta razón, en los laboratorios en donde esta técnica se utiliza rutinariamente se intercalan fases de revitalización del material vegetal, reintroduciéndolo en los medios de propagación óptimo de la especie, a fin de vigorizar a la plántula antes de ingresar al siguiente ciclo de almacenamiento.

## **2.7. INFLUENCIA DE LOS AGENTES OSMÓTICOS EN LOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO***

El potencial osmótico influye directamente en el crecimiento de las células vegetales debido a su relación con la presión de turgencia, principal fuente motriz para la elongación celular. De acuerdo con Cárdenas y Villegas (2002), el potencial osmótico de un medio de cultivo disminuye conforme la concentración total de sales y componentes orgánicos del medio se incrementa.

La relación entre el potencial osmótico y la presión de turgencia es discutido por Thorpe *et al.* (2008), quienes señalan que cuando el potencial osmótico es más negativo en el interior de la célula que en el medio de cultivo, el agua ingresa a la célula, aumenta el volumen vacuolar y se ejerce presión de turgencia sobre las paredes celulares, induciendo a que éstas se expandan y la longitud de la célula aumente. Por lo dicho anteriormente, cuando la concentración de los solutos en el medio se ve incrementada, el potencial osmótico del medio se hace más negativo que en el interior de la célula, y la absorción de agua disminuye. Esto ocasiona una reducción en la presión de turgencia y, en consecuencia, también una reducción en el crecimiento de la planta.

Las células mantenidas en un ambiente con bajo potencial osmótico pierden agua, y por ello se activan procesos moleculares, celulares o fisiológicos que culminan en la tolerancia al estrés hídrico. Tal como lo discute Lara (2015), algunas de las estrategias para contrarrestar los efectos adversos involucran la síntesis de solutos compatibles, la inducción de enzimas antioxidantes y la producción de fitohormonas, los cuales se comentan brevemente a continuación.

En primer lugar, las plantas pueden sintetizar y acumular compuestos solubles de bajo peso molecular en respuesta al estrés hídrico. Estos compuestos son muchas veces referidos como “solutos compatibles” ya que pueden acumularse hasta elevadas concentraciones sin interferir con el metabolismo celular (Stoop *et al.*, 1996) y al mismo tiempo elevar el potencial hídrico de la célula para evitar la pérdida de agua (Hannes y Dirk, 2013). Ejemplo de estos solutos son algunos compuestos cuaternarios de amonio, la prolina, el manitol, etc. (Rabe, 1990).

En segundo lugar, la síntesis de enzimas antioxidantes, como la Glutación-S-Transferasa o la Ascorbato peroxidasa, es llevada a cabo principalmente en tejidos jóvenes para contrarrestar los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los tejidos maduros en cambio, tienden a acumular protectores como las proteínas LEA, el aminoácido prolina y los flavonoides, los cuáles evitan la oxidación de macromoléculas en la célula (Skirycz *et al.*, 2010, 2011, Harb *et al.*, 2010, mencionados por Hannes y Dirk, 2013).

Finalmente, se ha demostrado que las hormonas desempeñan un rol importante en el ajuste del crecimiento bajo condiciones de estrés hídrico. En particular, el ácido abscísico (ABA), la hormona de estrés canónica, desempeña un papel confuso pero el consenso actual sugiere que puede inhibir directamente el crecimiento apical, o, en condiciones de estrés severo, puede indirectamente estimular el crecimiento mediante la disminución de la biosíntesis del etileno y activando la expresión de acuaporinas (Tardieu, *et al.*, 2010; Wilkinson y Davies, 2010). El ABA también restringe la entrada de células epidérmicas de las hojas al linaje meristemoide, precursores de las células guardianas, disminuyendo así la producción de estomas y también la pérdida de agua por evaporación (Tanaka *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque el ABA regula muchas respuestas que confieren protección contra la deshidratación, no es el único regulador implicado en la respuesta al estrés hídrico, ya que muchos de los cambios inducidos por la sequía no se inducen cuando se aplica ABA de forma exógena (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

## **2.8. MANITOL Y SORBITOL**

Los polialcoholes o azúcares-alcohol son carbohidratos hidrogenados no cíclicos, producidos cuando los grupos aldehído o cetona de algunos monosacáridos son reducidos a

grupos hidroxilo. Así, tanto el manitol cuanto el sorbitol surgen de la reducción de los monosacáridos manosa y glucosa, respectivamente (Park *et al.*, 2016).

De acuerdo con lo discutido por Stoop *et al.* (1996), el manitol es el azúcar alcohol más ampliamente distribuido en la naturaleza y ha sido reportado en más de 100 especies de plantas vasculares, incluyendo muchos cultivos agronómicos de importancia como *Apium graveolens* (apio), *Brassica oleraceae*, (coliflor), *Olea europea* (olivo), o *Coffea arabica* (café). Adicionalmente, se ha mostrado en algunos experimentos que las plantas que sintetizan manitol exhiben un alto grado de tolerancia a estrés salino, posiblemente como resultado de la función que desempeña este azúcar-alcohol por ser un soluto compatible y osmoprotector. Se ha sugerido que puede imitar la estructura del agua y mantener una esfera de hidratación artificial alrededor de las macromoléculas debido a la cantidad y disposición de sus grupos hidroxilo, protegiéndolas de este modo del ataque de especies oxidativas y estabilizándolas estructuralmente en condiciones de bajo potencial osmótico (Takshay y Williamson., 2016).

Se tiene conocimientos del rol que desempeñan los polialcoholes como fuentes de carbono en algunas especies. En *Apium graveolens*, por ejemplo, la mitad del CO<sub>2</sub> fijado es convertido a manitol, y junto con la sucrosa es metabolizado en los tejidos no fotosintéticos (Stoop *et al.*, 1996). Además, especies de la familia Rosaceae producen sorbitol como principal producto fotosintético metabolizable, tal como señalarían los experimentos de Ruzic *et al.* (2008), quienes mostraron que en la fase de multiplicación *in vitro* de las especies *Prunus avium* (cerezo dulce), *Prunus cerasus* (portainjerto de cerezo Edabriz) y *Prunus amygdalus x Prunus persica* (portainjerto de melocotonero GF677), el sorbitol fue una fuente de carbono más eficiente que la sucrosa.

Ambos azúcares-alcohol han venido siendo utilizados en los medios de cultivo como agentes osmóticos para inducir el crecimiento lento de especies que no las emplean como fuentes de carbono, como en los casos de *Malus domestica* (manzano) (20 g.L<sup>-1</sup> sucrosa + 20 g.L<sup>-1</sup> manitol) (Hao y Deng, 2003); *Solanum tuberosum* (papa) (20-40 g.L<sup>-1</sup> manitol) (Sarkar y Naik, 1998; Sarkar *et al.*, 1999); *Vanilla planifolia* (vainilla) (15 g.L<sup>-1</sup> sucrosa + 15 g.L<sup>-1</sup> manitol) (Divakaran *et al.*, 2006); *Dioscorea trifida* (ñame blanco) (20 g.L<sup>-1</sup> sorbitol) (Carmona *et al.*, 2013); *Oxalis tuberosa* (oca) (20 g.L<sup>-1</sup> sucrosa + 20 g.L<sup>-1</sup> sorbitol) (Herrera *et al.*, 2004); *Epidendrum chlorocorymbos* (orquídea) (10 g.L<sup>-1</sup> sorbitol)



(López-Pue, 2013); *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) ( $10 \text{ g.L}^{-1}$  sucrosa +  $30 \text{ g.L}^{-1}$  sorbitol) (Watt *et al.*, 2009); entre muchas otras.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El experimento fue desarrollado en las instalaciones del Centro de Investigación de Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, en el periodo comprendido entre los meses de agosto del 2016 a enero del 2017.

#### **3.2. MATERIAL VEGETAL**

Los explantes necesarios para el establecimiento del experimento fueron obtenidos a partir de plántulas *in vitro* de *Physalis peruviana* provistas por el banco del CIRGEBB. El origen geográfico de éstas se detalla en el Tabla 2.

Las plántulas utilizadas fueron clones de primeras generaciones obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas de aguaymanto. Los frutos desde los que se extrajeron las semillas fueron adquiridos en expendios comerciales de las provincias que se mencionan en el Tabla 2. Es necesario comentar que, con alta posibilidad, estos frutos pudieron ser cultivados en zonas diferentes a las indicadas.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Observación adicionada a solicitud de los jurados de la sustentación.

**Tabla 2: Procedencia del material vegetal empleado en el estudio-Codificación establecida por CIRGEBB.**

<b>REGIÓN</b>	<b>PROVINCIA DE COLECCIÓN</b>	<b>CÓDIGO</b>
<b>CAJAMARCA</b>	CAJAMARCA	CAJ 04
	CELENDÍN	CAJ 05
<b>JUNÍN</b>	TARMA	JUN 01
	JUNÍN	JUN 03

FUENTE: Elaboración propia.

### **3.3. AMBIENTES, MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

Se detallan a continuación los ambientes en los que se llevó a cabo el experimento, así como los materiales, los reactivos y los equipos que fueron necesarios para su desarrollo.

#### **3.3.1. AMBIENTES**

Para llevar a cabo el experimento, en el CIRGEBB se hicieron uso de los ambientes de preparación, transferencia e incubación del área de Cultivo de Tejidos Vegetales. Estos ambientes fueron respectivamente usados para: (1) la preparación de medios de cultivo, (2) propagación y establecimiento del material vegetal en cada uno de los medios de evaluación, y (3) la conservación a temperatura y luminosidad controlada.

#### **3.3.2. MATERIALES-REACTIVOS**

Se listan los materiales y reactivos empleados para la realización del experimento:

- Beakers de 2 L
- Probeta 100 mL
- Probeta de 1000 mL
- Pipeta 2, 5, 10 mL
- Frascos de vidrio de 450 mL.
- Magneto
- Pabilo
- Papel platino
- Papel film
- Vernier

- Placas petri
- Pinzas y bisturíes
- Mecheros
- Algodón, Guantes, Papel toalla
- Constituyentes del medio de Murashige y Skoog (1962)
- Azúcar comercial blanca
- Manitol
- Sorbitol
- Alcohol de 96°

### **3.3.3. EQUIPOS**

Se listan los equipos empleados para la realización del experimento:

- Agitador magnético
- pH-metro
- Autoclave
- Estufa
- Horno microondas
- Cámara de flujo laminar
- Aire acondicionado
- Tubos fluorescentes
- Cámara fotográfica

## **3.4. METODOLOGÍA UTILIZADA**

Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo para iniciar la evaluación de las variables en cada uno de los tratamientos establecidos en el experimento.

### **3.4.1. UNIFORMIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

A fin de contar con material vegetal uniforme para los experimentos, se procedió a propagar los ápices terminales de plántulas desarrolladas *in vitro*, en el medio de cultivo establecido como óptimo por el CIRGEBB. Los explantes tuvieron igual tamaño inicial (0.5 cm) y las plántulas originadas fueron utilizadas para la realización del experimento luego de 30 días de crecimiento *in vitro*.

### 3.4.2. MEDIOS DE CULTIVO QUE CONFORMAN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

Los tratamientos estuvieron conformados por tres medios de conservación a mediano plazo, adicionalmente a un control. Los medios de cultivo fueron:

1. *Control*: Componentes del medio de Murashige y Skoog (1962), suplementados con azúcar comercial al dos por ciento y agar al 0.75 por ciento, pH 5.5.
2. *Tratamiento I*: Componentes del medio de Murashige y Skoog (1962) diluidos a mitad de concentración, suplementados con azúcar comercial al dos por ciento, sorbitol 20 g/L y agar al 0.75 por ciento, pH 5.5.
3. *Tratamiento II*: Componentes del medio de Murashige y Skoog (1962) diluidos a mitad de concentración, suplementados con azúcar comercial al dos por ciento, manitol 20 g/L y agar al 0.75 por ciento, pH 5.5.
4. *Tratamiento III*: Componentes del medio de Murashige y Skoog (1962) diluidos a mitad de concentración, suplementados con azúcar comercial al dos por ciento, sorbitol 20 g/L, manitol 20 g/L y agar al 0.75 por ciento, pH 5.5.

Se reguló el pH y se dispensaron los medios en frascos de vidrio de 450 mL a razón de 50 mL por frasco, y se llevaron a autoclave (esterilización húmeda) a 121°C y 15-20 psi de presión durante 30 minutos.

Los cuatro medios empleados durante el experimento fueron codificados tal como se describe a continuación:

- *Medio Control: MC*
- *Tratamiento I: Sorbitol*
- *Tratamiento II: Manitol*
- *Tratamiento III: MSO*

### **3.4.3. CORTE DE LOS EXPLANTES Y SIEMBRAS DE LOS MISMOS**

Se extrajeron las plántulas que vinieron desarrollándose en el medio de propagación, y bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar fueron seccionadas a razón de un nudo por explante. Se separaron los explantes que contenían yemas terminales de los explantes que sólo tenían yemas axilares, utilizándose sólo estos últimos para la siembra. De forma aleatoria, ocho explantes de 0.5 cm de longitud se sembraron dentro de los tratamientos.

Los frascos preparados se incubaron luego a 23°C bajo un fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) con un flujo de fotones de  $16.22^2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  provista por tubos fluorescentes luz-día de 30 watts.

### **3.5. MEDICIÓN DE LAS VARIABLES Y DISEÑO ESTADÍSTICO APLICADO**

En el presente experimento se consideró como unidad experimental a un frasco conteniendo un medio determinado y ocho explantes sembrados en él. Llegado el día de evaluación, se registraron los datos de las variables en estudio.

Como resultado de la siembra, se habían obtenido 112 unidades experimentales, siete repeticiones por cada tratamiento y ecotipo. En ellas se evaluó las variables “Longitud de plántula”, “Número de nudos por plántula” y “Explantes vivos por frasco”.

Las variables “Longitud de plántula” y “Número de nudos por plántula” se evaluaron promediando los datos colectados de los ocho vástagos desarrollados en cada frasco. Mientras que, para la variable “Explantes vivos por frasco”, se evaluó el número total de explantes capaces de ser aislados por seccionamiento y con el suficiente vigor para ser resembrados en algún medio fresco.

---

<sup>2</sup> Valor obtenido utilizando la equivalencia de:  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones = 74 lux de intensidad de iluminación. El tubo fluorescente de 30 Watts empleado en el experimento presentó una intensidad de iluminación de 1200 lux.

Para el análisis estadístico de los datos registrados de las variables, se empleó un Diseño Completo al Azar en arreglo factorial, considerando los siguientes tres factores y respectivos niveles: Medios de Cultivo (MC, Manitol, Sorbitol y MSO), procedencia del material vegetal (Jun 01, Jun 03, Caj 04, Caj 05) y días de evaluación (Día 50, Día 100 y Día 130).

En primer lugar se verificó que los datos registrados en cada variable cumplieran con los siguientes supuestos para realizar el análisis de varianza (ANOVA):

- *Los errores del modelo planteado deben seguir una distribución normal.* Este supuesto fue verificado a través de la prueba de Normalidad de residuos de Kolmogorov – Smirnov, cuya no significancia indicó el cumplimiento del supuesto.
- *Las varianzas en los diferentes niveles de los factores en estudio deben ser homogéneas.* Este supuesto fue verificado con la prueba de Levine para las varianzas de los datos. Para el cumplimiento del supuesto, la prueba debió resultar no significativa.

Con el fin de satisfacer los supuestos para efectuar el Análisis de varianza (Resultados del Análisis mostrados en el Anexo 2), los datos registrados para las variables “Longitud de plántula” y “Número de nudos por plántula” fueron transformados aplicando la función raíz cuadrada. No fue necesario aplicar ninguna transformación a los datos de la variable “Número de explantes vivos por frasco”.

Finalmente, cuando el análisis de varianza reflejó diferencias significativas entre los promedios correspondientes a algún efecto principal, se realizaron los análisis respectivos ejecutando contrastes de Tukey.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Los promedios obtenidos en cada variable se reportan en el Anexo 1. Los resultados de los ANOVA realizados se muestran en el Anexo 3, y en ellos se nota que todos los efectos principales de los diferentes factores en estudio resultaron significativos.

### **4.1. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PRINCIPALES**

En esta sección se muestra el análisis y discusión de los efectos principales que resultaron significativos, según los ANOVA mostrados en el Anexo 3. Estos análisis estudian el efecto independiente que ejercieron cada uno de los Factores sobre las variables en estudio. Es de resaltar que los promedios mostrados de aquí en adelante incluyen las modificaciones que se realizaron a algunos de los datos para cumplir con los supuestos del ANOVA.

#### **4.1.1. EFECTO PRINCIPAL DEL FACTOR TRATAMIENTO**

La significancia del efecto principal Tratamiento en el ANOVA de las tres variables en estudio, implicó que la longitud, número de nudos y explantes vivos variaron dependiendo del medio de cultivo en el cual fueron evaluados. Las diferencias estadísticas entre los promedios registrados en cada medio pudieron ser establecidas con el análisis Tukey a un nivel de significación del 0.05, y los resultados se muestran en el Tabla 3.

Los resultados fueron finalmente plasmados en los diagramas de barra mostrados en la Figura 2. Como puede notarse, los tratamientos ejercieron diferentes efectos en las variables en estudio, siendo el medio MSO aquél en el que se registraron los mayores promedios de número de nudos y explantes vivos, y el menor de longitud de plántula.



**Tabla 3: Diferencias estadísticas entre los niveles del Factor Tratamiento obtenidas mediante análisis Tukey.**

MEDIO DE CULTIVO	LONGITUD DE PLÁNTULA (cm)		NÚMERO DE NUDOS POR PLÁNTULA		EXPLANTES VIVOS POR FRASCO	
MC	3.38 ± 0.05	A	1.62 ± 0.02	B	9.25 ± 0.35	B
SORBITOL	2.02 ± 0.04	B	1.37 ± 0.03	C	9.01 ± 0.38	B
MANITOL	2.03 ± 0.05	B	1.68 ± 0.03	B	11.58 ± 0.58	A
MSO	1.62 ± 0.03	C	1.77 ± 0.03	A	12.45 ± 0.47	A

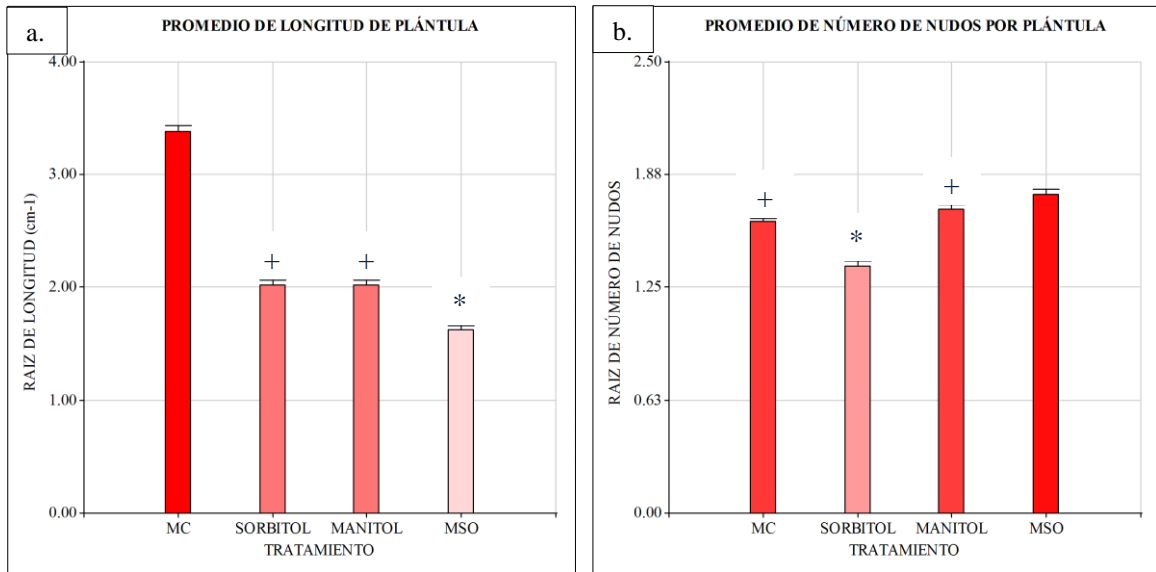
MEDIAS: PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR

FUENTE: Elaboración propia.

Respecto a la variable Longitud de plántula, los resultados observados concuerdan con lo mencionado por Thorpe *et al* (2008), ya citados con anterioridad en la sección de revisión de literatura. En resumen, la inclusión de agentes osmóticos en el medio de cultivo disminuye la cantidad de agua que las plántulas pueden absorber; y como consecuencia de la reducción en la presión de turgencia, las células se expanden más lentamente. Una explicación adicional de los resultados es mencionado por Bonilla *et al.* (2015), quienes afirman que cuando se añaden carbohidratos no metabolizables al medio de cultivo, el explante tiene disminuida la probabilidad de captar las fuentes de carbono asimilables disponibles, con lo cual, la absorción de estos nutrientes se realiza más lentamente y el crecimiento se atenúa.

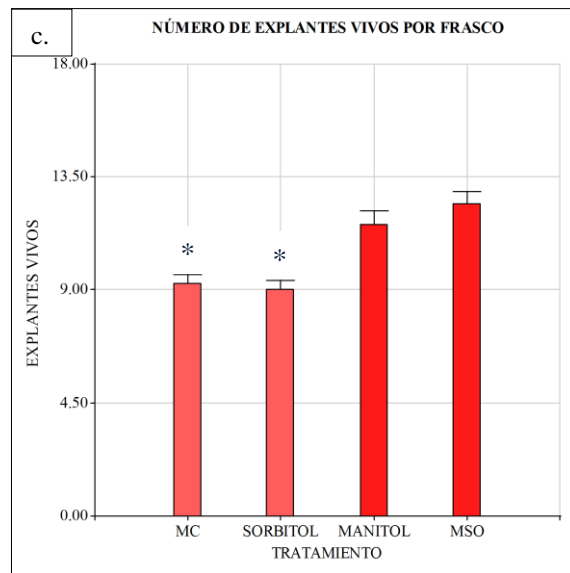
Las similitudes estadísticas encontradas en los medios Manitol y Sorbitol respecto a la altura promedio de las plántulas parecen contradecir los estudios de Cardenas y Villegas (2002), quienes afirman que, a iguales concentraciones de los agentes osmóticos, los medios de cultivo conteniendo manitol presentan menores potenciales osmóticos que los medios de cultivo conteniendo sorbitol. Esto implica que las plántulas de aguaymanto disponen de una cantidad más baja de agua cuando son sembradas en el medio Manitol y tiene por tanto, una menor posibilidad de elongación que aquellas sembradas en el medio Sorbitol.

Una posible justificación a lo observado se fundamenta en considerar al estrés hídrico como un agente que favorece la elongación celular bajo circunstancias de control estricto.



\* Diferencias significativas respecto a MC, Sorbitol y Manitol.  
 + Diferencias significativas respecto a MC y MSO.

\* Diferencias significativas respecto a MC, Manitol y MSO.  
 + Diferencias significativas respecto a Sorbitol y MSO.



\* Diferencias significativas respecto a MSO y Manitol.

**Figura 2. Diagrama de barras de los promedios obtenidos en las variables a. Longitud de plántula, b. Número de nudos por plántula, y c. Número de explantes vivos por frasco, debidos al efecto del factor Tratamiento. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.**

Como describen Cosgrove (2005) y Hannes y Dirk (2013), la expansión celular también depende de la pérdida y deposición controlada de materiales de pared celular. Ellos plantean la idea de que algunas especies reactivas de oxígeno, como el radical oxidrilo

(·OH), estimulan la elongación celular debido a que pueden romper los polisacáridos de la pared al remover átomos de hidrógeno. Como se sabe, en las células existe una relación directa entre la producción de especies reactivas de oxígeno y el grado de estrés hídrico. De este modo, cabe esperar una mayor flexibilidad de la pared celular en aquellas plántulas sembradas en el medio Manitol, tal que, junto a otros posibles factores, sus crecimientos sean favorecidos hasta lograr equiparar la longitud de las plántulas sembradas en el medio Sorbitol.

Los Tratamientos ejercieron efectos diferentes sobre las plántulas de aguaymanto, tal que el número de nudos que éstas lograron desarrollar dependió del medio de cultivo sobre el cual estuvieron sembradas. Así por un lado, el medio Sorbitol indujo débilmente la formación de estas estructuras, concordando también con lo observado por Flores *et al.* (2013), quienes reportaron una declinación del número de nudos en las plántulas de *Pfaffia tuberosa* (batatilla) cultivadas sobre medio MS + 10 g/L de sorbitol en relación a plántulas sembradas sobre un tratamiento control (Medio MS + 30 g/L de sacarosa). Sin embargo, Carmona *et al.* (2013), estudiando el efecto de combinaciones de osmolitos sobre diferentes especies de *Dioscorea*, encontraron que, de entre todos los tratamientos estudiados, incluyendo el control, el medio conteniendo 1.5 por ciento de sacarosa + dos por ciento de sorbitol incrementó con más eficacia el número de nudos. Esto evidencia que las condiciones generadas en el medio de cultivo por la presencia del sorbitol influyen de modo diferente en el desarrollo de nudos dependiendo de la especie.

Asimismo, los resultados estadísticos del presente trabajo mostraron que el tratamiento Manitol indujo en las plántulas de aguaymanto la formación de tantos nudos como los que también provocó el medio Control. Al respecto, el número de nudos en plantas de olivo también fue positivamente influenciado por el manitol, observándose elevados valores a una concentración de 34 g·L<sup>-1</sup> (Leva *et al.*, 1994). Sin embargo, Rojas (2005), citado por Aguirre *et al.* (2016), observó que el número de nudos de plántulas de aguaymanto, ecotipos Colombiano y Boliviano, disminuyó cuando las concentraciones de Manitol en los medios que evaluaron fueron en aumento (0, 20, 40 y 60 g·L<sup>-1</sup>). De este modo, el manitol también ejercería influencias distintas de acuerdo al genotipo.

Para considerar explicaciones adicionales a los resultados observados respecto al número de nudos que las plántulas desarrollaron, no puede dejar de mencionarse el efecto que las

propias fitohormonas ejercieron sobre el desarrollo de cada una, y más tomando en cuenta las condiciones particulares que cada osmolito provocó en el medio de cultivo.

De las fitohormonas de las plantas, el cambio más significativo durante el estrés hídrico se relaciona con los niveles de ABA (Ghorbani *et al.*, 2011), el cual pueden llegar a alcanzar hasta 50 veces su concentración original durante estas condiciones (Taiz y Zeiger, 2002). Además de regular el grado de transpiración de la planta a través de la oclusión o apertura de los poros estomáticos, algunos efectos del ABA sobre tejidos vegetales cultivados también sugieren que esta hormona puede modificar la síntesis de citoquininas (Gaspar *et al.*, 1996). Bielach *et al.* (2017) afirman que el estrés osmótico incrementa la cantidad de 6-Bencil amino purina, y ésta y otras citoquininas desarrollarían importantes funciones durante el estrés hídrico al retrasar la senescencia de la hoja (McDavid *et al.*, 1972) y promover la acumulación de prolina (Thomas *et al.*, 1992). En otras especies como *Solanum lycopersicum* (tomate), la expresión de determinados genes precursores de citoquininas, como la SIIPT3, conduce a un genotipo adaptado al estrés hídrico, que se caracteriza por un tamaño de roseta más compacto y una ramificación aumentada del brote (Žižková *et al.*, 2015; citados por Bielach *et al.*, 2017). Además, en plantas sobreproductoras de citoquininas, el meristemo apical produce más hojas, nudos y entrenudos muy acortados (Taiz y Zeiger, 2002).

De lo dicho anteriormente, podría plantearse que, bajo condiciones de estrés osmótico, un mayor número de nudos podría ser el resultado de un incremento en la concentración de citoquininas inducido por la previa acumulación de ABA en los tejidos. Esta hipótesis también contribuiría a explicar el hecho de que en el medio MSO se haya registrado el mayor desarrollo de nudos, ya que al haber ejercido éste el mayor estrés hídrico de entre todos los tratamientos, posiblemente también haya inducido una mayor producción de ABA que a su vez incrementó más los niveles de citoquininas.

Los explantes vivos reflejan el mayor éxito obtenido por el medio MSO en el presente estudio para conservar a las plántulas de aguaymanto. En ninguno de los trabajos consultados se ha recomendado como óptima la utilización conjunta de los reguladores osmóticos manitol y sorbitol para la conservación de alguna especie vegetal, e incluso Lata *et al.* (2010), estudiando la conservación de *Podophyllum peltatum*, encontró nociva tal combinación. Sin embargo, las apreciaciones muy polarizadas contrarían los resultados

encontrados en especies como *Lepidium meyenii* (maca) o *Tropaeolum tuberosum* (mashua), por mencionar algunas, en donde el empleo de sorbitol al seis por ciento y manitol al cuatro por ciento, respectivamente (concentraciones osmóticas más altas o similares respecto a la concentración del medio MSO), son utilizados como medios óptimos de conservación que garantizan la ausencia de efectos totalmente dañinos (Rodríguez, 2012; Tapia *et al.*, 2004). Aunque las respuestas *in vitro* sean genotipo-dependientes, y las dosis letales de agentes osmóticos en un medio de cultivo dependa de la especie, variedad o ecotipo, es necesario seguir evaluando la pertinencia, o no, de distintas combinaciones de ambos agentes en aras de conseguir no sólo la extensión del tiempo de conservación, sino también el crecimiento y desarrollo adecuados, manteniendo al mismo tiempo la estabilidad genética de las plántulas de aguaymanto.

#### **6.1.2. EFECTOS PRINCIPALES DE LOS FACTORES PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL Y DÍA DE EVALUACIÓN**

Dada la significancia de los efectos principales de los factores mencionados, existe evidencia estadística para indicar que el promedio de las variables en estudio varió, en primer lugar, respecto al día de evaluación, y en segundo lugar, respecto a la procedencia de las plántulas. Se realizó el análisis Tukey para establecer las diferencias estadísticas de los promedios registrados en cada día de evaluación y en cada tipo de material vegetal. Los resultados se muestran en el Tabla 4.

Los diagramas de barras de la Figura 3 esquematizan los resultados obtenidos, y en ellos puede notarse como a partir del día 100 las variables Longitud de plántula y Número de nudos no variaron significativamente, pero el Número de explantes vivos por frasco disminuyó desde el día 50 hasta el final del experimento. De otro lado, aunque estadísticamente en el ecotipo Junín se presentó en promedio longitudes de plántula inferiores a los reportados en el ecotipo Cajamarca (tres por ciento inferiores), en estos últimos se presentó un mejor desarrollo de nudos y una sobrevivencia superior de explantes por frasco (10 por ciento más del promedio reportado en el ecotipo Junín).

Es difícil comparar las tendencias observadas en el crecimiento y desarrollo *in vitro* del Aguaymanto a los largo de los **días de evaluación**, ya que, hasta donde se pudo conocer en

**Tabla 4: Similitudes estadísticas obtenidas mediante análisis Tukey de los Factores Procedencia del material vegetal y Día de evaluación en cada una de las variables de estudio.**

PROCEDENCIA	LONGITUD DE PLÁNTULA (cm)	NÚMERO DE NUDOS POR PLÁNTULA	EXPLANTES VIVOS POR FRASCO
CAJ 04	2.34 ± 0.07 A	1.71 ± 0.02 A	10.70 ± 0.45 AB
CAJ 05	2.25 ± 0.07 AB	1.66 ± 0.03 A	11.42 ± 0.49 A
JUN 01	2.27 ± 0.10 AB	1.56 ± 0.03 B	10.51 ± 0.47 AB
JUN 03	2.19 ± 0.09 B	1.51 ± 0.03 B	9.67 ± 0.50 B

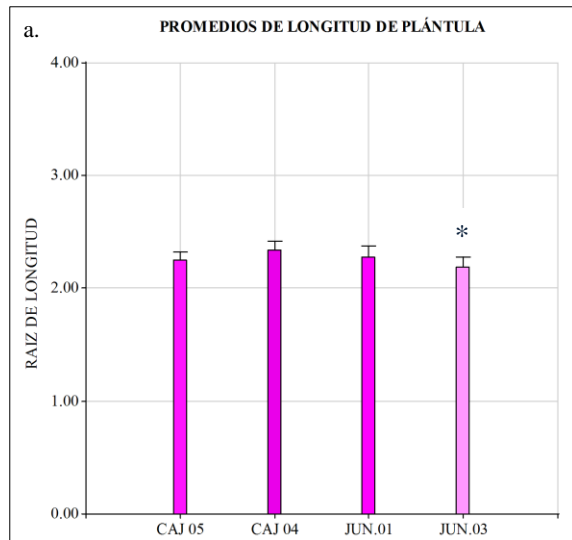
DÍA	LONGITUD DE PLÁNTULA (cm)	NÚMERO DE NUDOS POR PLÁNTULA	EXPLANTES VIVOS POR FRASCO
50	2.04 ± 0.06 B	1.62 ± 0.02 B	12.38 ± 0.37 A
100	2.33 ± 0.08 A	1.68 ± 0.03 B	11.35 ± 0.42 B
130	2.42 ± 0.07 A	1.77 ± 0.03 A	8.00 ± 0.34 C

MEDIAS: PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR

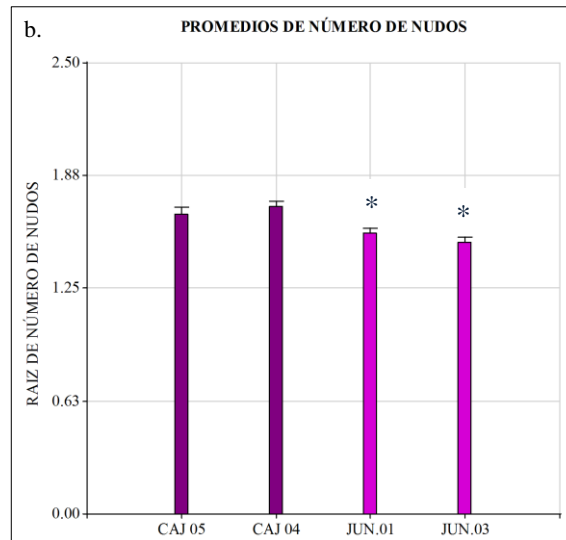
FUENTE: Elaboración propia.

este trabajo, el uso de manitol o sorbitol como agentes osmóticos aplicados al aguaymanto son escasos, esto es, no ha habido referencia de ningún trabajo publicado bien documentado en algún medio abierto a la comunidad. A pesar de ello, se ha intentado comparar el efecto *in vitro* con otros trabajos similares en cuanto al efecto osmótico que causarían otros agentes en el aguaymanto. Por ejemplo, el estrés hídrico al que se encuentra sometido una plántula sembrada en un medio de cultivo *in vitro* conteniendo reguladores osmóticos puede ser comparable al provocado por un medio conteniendo concentraciones moderadas de NaCl. Al respecto, se han reportado algunos trabajos como los de Miranda *et al.* (2010) y Lara *et al.* (2017), que precisamente buscaron evaluar el efecto metabólico y fisiológico del estrés salino en plantas de aguaymanto, pero no sólo bajo condiciones *in vitro*, sino también, bajo condiciones de invernadero.

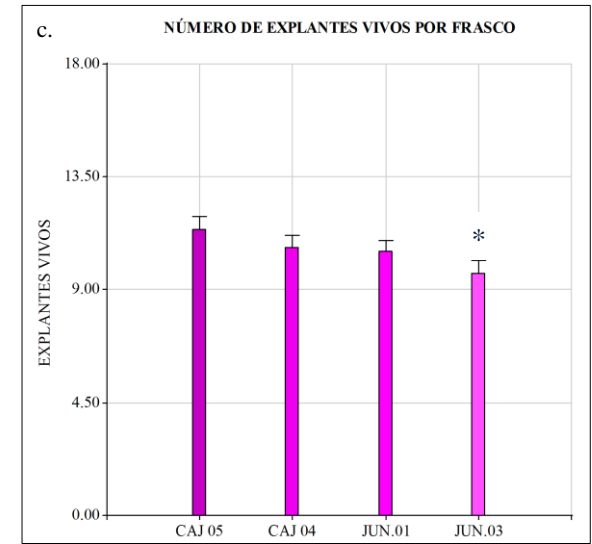
Respecto a las pruebas de invernadero, en ellas se determinó la tasa de crecimiento relativo (TCR) que tuvieron las plantas de aguaymanto sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (30-120 mM). Esta variable fue definida como el incremento en peso seco por unidad de peso ya presente. Los estudios concluyeron que la TCR se mantuvo en todos los individuos hasta el día 55; luego del cuál, disminuyó progresiva mente con la edad de la planta (Miranda *et al.*, 2010). Por otro lado, de acuerdo con los estudios *in vitro*, las plántulas de aguaymanto sometidas a estrés salino (0.5-uno por ciento de NaCl) presentaron



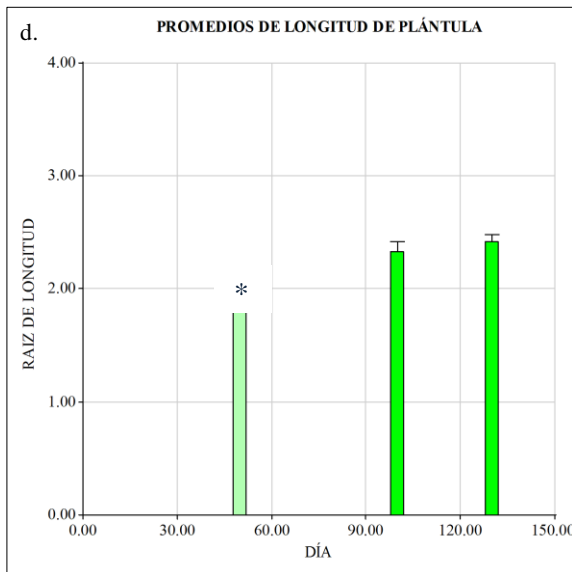
\* Diferencias significativas respecto a Caj 04



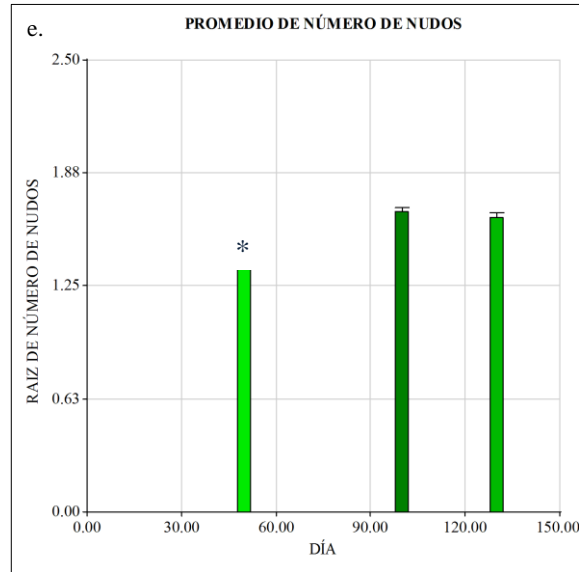
\* Diferencias significativas respecto a Caj 05 y Caj 04.



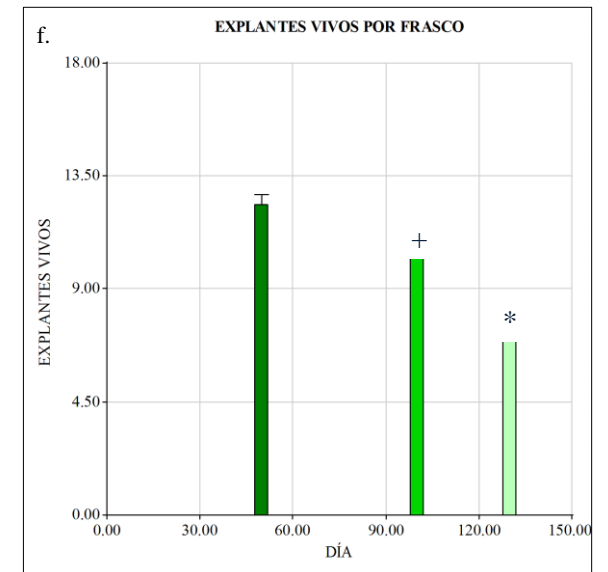
\* Diferencias significativas respecto a Caj 05.



\* Diferencias significativas respecto a los días 100 y 130



\* Diferencias significativas respecto a los días 100 y 130.



\* Diferencias significativas respecto a los días 50 y 100.  
+ Diferencias significativas respecto a los días 50 y 130

**Figura 3. Diagrama de barras de los promedios de cada variable registrados en los ecotipos (a, b, c) y días de evaluación (d, e, f).**

incrementadas las actividades de enzimas antioxidantes (Súper óxido dismutasa, peroxidasa, catalasa), enzimas involucradas en la respiración celular (Malato deshidrogenasa), y niveles elevados tanto de CO<sub>2</sub> liberado al ambiente como de prolina intracelular (Lara *et al.*, 2017).

Al igual que en las pruebas de invernadero comentadas; en el presente trabajo las plántulas de aguaymanto tuvieron, en promedio, una tasa de crecimiento superior hasta el día 50, a partir del cual comenzaron a ralentizarla, alcanzando semejanza estadística las alturas y nudos desarrollados en los días 100 y 130. La viabilidad del crecimiento y desarrollo de las plántulas bajo las condiciones *in vitro* planteadas en el experimento, pudieron deberse a los mecanismos mencionados para disminuir la presión osmótica intracelular (elevados niveles de prolina), contrarrestar los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno (elevación de la actividad de enzimas antioxidantes), y mantener un adecuado suministro de energía para llevar a cabo estas actividades (aumento de la actividad de enzimas en la respiración celular). Sin embargo, posiblemente estos mecanismos no pudieron ser activados en muchas plántulas, y por ello se observó una constante disminución de los explantes vivos por frasco a partir del día 50.

Aunque cortas pero existentes, justificar las diferencias encontradas en el material vegetal **procedente** de las regiones Cajamarca y Junín en términos de la longitud o número de nudos alcanzados por sus plántulas, se torna impreciso sin haber echado mano de herramientas moleculares o bioquímicas. Sin embargo, un rasgo saltante que diferencia a los ecotipos en estudio es la altitud de la provincia de procedencia, tan variada incluso dentro de una misma región. Estas son mostradas en el Tabla 5, tomando como referencia los datos de acceso libre que el Instituto Nacional de Estadística e Informática puso a disposición (INEI, 2013).

Como puede apreciarse, las altitudes promedio de las provincias de procedencia del ecotipo Cajamarca no llegan a superar los 2700 m.s.n.m., mientras que las altitudes de las provincias de procedencias del ecotipo Junín superan los 3000 m.s.n.m., e incluso la de Jun 03 borde los 4000 m.s.n.m.



En muchas especies los aumentos de altitud se asocian con disminuciones en la altura de la planta, y el aguaymanto, precisamente, no sería la excepción de acuerdo a lo mencionado en los trabajos de Flórez *et al.*, (2000) y Fischer y Ludders (2002). Las razones aún no han sido completamente establecidas, pero en los siguientes párrafos se hace un ejercicio para tratar de explicar este fenómeno.

**Tabla 5: Altitudes promedio de las provincias de procedencia del material vegetal**

REGIÓN	PROVINCIA	CÓDIGO ASIGNADO	ALTITUD PROMEDIO (msnm)
CAJAMARCA	Cajamarca	Caj 04	2531
	Celendín	Caj 05	2565
JUNÍN	Tarma	Jun 01	3255
	Junín	Jun 03	3991

FUENTE: Elaboración propia.

En algunas variedades de las especies *Triticum aestivum* (trigo), *Pisum sativum* (guisante) y *Hordeum vulgare* (cebada), que se distribuyen en un amplio abanico de altitudes (1300 – 4200 msnm), se han propuesto mecanismos adaptativos contra las perturbaciones metabólicas originadas por las modificaciones ambientales a las que se encuentran sometidas naturalmente. En aquellas que se desarrollaron a elevadas altitudes se apreció, entre otras observaciones, una mayor actividad de la vía de transporte de electrones insensible a cianuro que utiliza una oxidasa alternativa “AOX” para catalizar la reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, en desmedro de la vía de electrones que emplea a la citocromo oxidasa (Kumar *et al.*, 2007).

Cuando los electrones llegan al oxígeno por la oxidasa de la cadena alternativa, pasan a lo sumo por un solo sitio de fosforilación, mientras que cuando lo hacen por la citocromo oxidasa, pasan hasta por tres, según sea el sustrato, de manera que la respiración por la oxidasa alternativa consume mucho más sustrato para producir una misma cantidad de ATP que la respiración por la citocromo oxidasa, tornándola en una vía celular muy poco eficiente en cuanto a producción energética (Sánchez, 1980) y por

tanto también deficiente en términos anabólicos por la poca energía que hace disponible para la síntesis de nuevas estructuras.

De este modo, cabe la posibilidad que la longitud menor de las plántulas del ecotipo Junín pueda deberse, entre otros múltiples factores, a que éstas exhibirían, como posiblemente también lo harían a condiciones *in vivo*, una mayor actividad de la vía alternativa de transporte de electrones que reduce el rendimiento de biomasa, no siendo así en el ecotipo Cajamarca, que más bien se encontraría utilizando en mayor proporción la vía tradicional de citocromos para el transporte de electrones. Estas hipótesis podrían ser corroboradas o reemplazadas en estudios posteriores para la caracterización específica de ecotipos de aguaymanto, que incluyan mayor número de ecotipos procedentes de provincias con diferente altitud, exámenes bioquímicos, genómicos, etc.

Además de lo mencionado, existiría una posible relación entre el número de nudos desarrollados y la altura alcanzada por las plántulas. Como señalan Gutiérrez-Diez *et al.* (2013), el alargamiento del vástago se traduce en una mayor altura y esto a su vez, en una mayor producción de nudos en el tallo. Cómo se vio anteriormente, el ecotipo Cajamarca superó al ecotipo Junín en longitud, por ello los resultados observados para número de nudos se correlacionarían adecuadamente.

Adicionalmente, la menor cantidad de nudos formados en el ecotipo Junín y el menor número de explantes vivos potenciales para resiembra, sería un indicativo de una mayor sensibilidad al estrés hídrico, en relación al ecotipo Cajamarca. Aunque, tal como lo menciona Fahn (1964), citado por Ahmad (2016), la reducción en el número de nudos representa una de las alteraciones adaptativas en la morfología de la planta para lidiar con el estrés hídrico, menores cambios en la arquitectura representarían un mejor control y uso de mecanismos destinados a preservar la homeostasis.

## V. CONCLUSIONES

1. Es posible mantener plántulas de *Physalis peruviana* en medios de cultivo *in vitro* conteniendo agentes osmóticos por un periodo de ciento treinta días.
2. El medio de cultivo conteniendo los reguladores osmóticos Manitol y Sorbitol al mismo tiempo consiguió disminuir con mayor eficiencia la longitud de las plántulas, siendo mayor el efecto en el ecotipo Junín.
3. El número de nudos de las plántulas consiguió ser mejor conservado en el medio MSO y en el ecotipo Cajamarca.
4. El número de explantes vivos al término de los experimentos fue significativamente mayor en las plántulas conservadas en el medio MSO, y en aquellas provenientes de la región Cajamarca.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Continuar optimizando las combinaciones de Manitol y Sorbitol de modo que pueda extenderse el periodo de subcultivo a más de ciento treinta días, garantizando al mismo tiempo la estabilidad genética de las plántulas originadas.
2. Extender los estudios para la inclusión de ecotipos distintos a los de Junín y Cajamarca.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRONET. 2016. Exportaciones del sector agropecuario por cadena productiva (en línea). Bogotá, CO. Consultado 03 mayo 2016. Disponible en [http://207.239.251.112/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte79\\_2011.aspx?cod=79](http://207.239.251.112/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte79_2011.aspx?cod=79).
2. Aguirre, G. Pierre, J. Leigue, L. 2016. Aplicación de cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Cochabamba, BO, Universidad Mayor de San Simón. 240 p.
3. Ahmad, P. 2016. Water Stress and Crop Plants. Vol 2. Chichester, UK. John Wiley and Sons. 756 p.
4. Almanza-Merchan, J. Fischer, G. 2012. Fisiología del cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) (en línea). Lages, BR. Consultado 07 abr. 2016. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/256570745\\_Fisiologia\\_del\\_cultivo\\_de\\_la\\_uchuva\\_Physalis\\_peruviana\\_L\\_Brasil](https://www.researchgate.net/publication/256570745_Fisiologia_del_cultivo_de_la_uchuva_Physalis_peruviana_L_Brasil).
5. Armijos, R. 2016. Conservación de plantas regeneradas *in vitro* y análisis de la variación somaclonal de *Chinchona officinalis*, Linneo. Tesis Doctoral. Madrid, ES. Universidad Politécnica de Madrid. 138 p.
6. Asociación Regional de Exportadores de Lambayeque. 2014. Perfil comercial: Aguaymanto deshidratado. Lambayeque, PE. 36 p.
7. Azcón-Bieto, J. Talón, M. 2013. Fundamentos de fisiología vegetal. 2 ed. Madrid, ES. McGraw-Hill. 651 p.

8. Bean, A. 2006. *Physalis* (Solanaceae) in Australia - nomenclature and identification. Systemic Botany Society. 127: 6-9.
9. Bielach, A. Hrtyan, M. Tognetti, V. 2017. Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin. International Journal of Molecular Science. 18: 1-29.
10. Bonilla, M. Mancipe, C. Aguirre, A. 2015. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de recursos fitogenéticos. Revista de Investigación Agraria Ambiental. 6(1): 67-82.
11. Brito, D. 2002. Producción de uvilla para exportación. Agroexportación de productos no tradicionales. Quito, EC: Fundación Aliñambi. pp 10.
12. Camarena, F. Chura, J. Blas, RH. 2012. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. Lima, PE. Agrobanco, PE. 278 p.
13. Cárdenas, MA. Villegas, A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Rev. Fitotec. Mex. 25(2): 213-217.
14. Carmona, O., Díaz, L., Beltrán, J. 2013. Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. Rev. Asoc. Col. Cienc. 25: 41-51.
15. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, WM. Mroginski, LA. (eds). Cali, CO. 970 p.
16. CONAFRUT (Comisión Nacional de Fruticultura, PE). 2000. El cultivo del capulí. Lima, PE. 16 p.
17. Corredoira, E. Martínez, T. Cernadas, J. San José, C. 2017. Application of biotechnology in the conservation of the genus *Castanea*. Forests. 8: 394-408.

18. Cosgrove, D. 2005. Growth of the plant cell wall. *Molecular Cell Biology*. 6: 850-861.
19. Costa, A. Wulff, M. Cristiano, A. 2005. Establecimiento e multiplicação in Vitro de *Physalis peruviana* L. *Ciênc. agrotec.* 29(6): 1281-1287.
20. Cruz-Cruz, CA. Gonzáles-Arno, MT. Engelmann, F. 2013. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*. 2: 73-95.
21. Divakaran, M. Babu, K. Peter, K. 2006. Conservation of *Vanilla* species *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 110:175-180.
22. Dostert, N. Roque, J. Cano, A. La Torre, ML. Weigend, M. 2011. Hoja botánica: Aguaymanto. Trad. F Luebert. Lima. Giacomotti Comunicación Gráfica, PE, Imprenta Nacional. 15 p.
23. Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of horticultural species. *Acta Horticulturae*. 298: 327-334.
24. Engelmann, F. Engels, J. 2002. Technologies and strategies for ex situ conservation. In *Managing Plant Genetic Diversity*. Eds. JMM Engels; VR Rao; AHD Brown; MT Jackson. Wallingford, UK. CABI. pp. 89-104.
25. Espinoza, GA. 2015. Aguaymanto para la exportación de la región Cajamarca (Perú). El caso de la Asociación Provincial de Productores Ecológicos de Cajamarca-APPEC. Tesis de especialización. Buenos Aires, AR. Universidad de Buenos Aires. 39 p.
26. Fawzy, M. 2011. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Research International*. 44(7): 1830-1836.

27. FIBL (Research Institute of Organic Agriculture, CH); IFOAM-Organics International (International Federation of Organic Agriculture Movements, DE). 2016. The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends. Eds. H Willer; J Lernoud. 17 ed. s.l. 333 p.
28. Fischer, G. Almanza-Merchán, P. Miranda, D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Rev. Bras. Frutic. 36(1): 1-15.
29. Fischer, G. Ludders, P. 2002. Efecto de la altitud sobre el crecimiento y desarrollo vegetativo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Comalfi. 29(1): 1-10.
30. Flores, R. Uliana, S. Pimentel, N. Bisognin, TM. 2013. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (*Amaranthaceae*). Journal of Biotechnology and Biodiversity.
31. Flórez, V. Fischer, G. Sora, A. 2000. Producción, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Santa Fé de Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 171 p.
32. García-Águila, L. Feria, M. Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal. 7(2): 67-79.
33. Gaspar, T. Kevers, C. Penel, C. Greppin, H. Reid, D. Thorpe, T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. 32: 272-289.
34. Ghorbani, M. Sorooshzadeh, A. Moradi, F. Modarres, M. Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. Australian Journal of Crop Science. 5(6): 726-734.



35. Gutiérrez-Díez, A. Salinas-García, GE. Iracheta-Donjuan, L. Torres-Castillo, JA. Mayek-Pérez, N. 2013. Loci de caracteres cuantitativos asociados con tolerancia a déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 82: 203-208.
36. Hannes, C. Inzé, D. 2013. The agony of choice: How plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology*. 162: 1768-1779.
37. Hao, Y. Deng, X. 2003. Genetically stable regeneration of apple plants from slow growth. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 72: 253-260.
38. Herrera, v., Tpaia, C. y Monteros, A. 2004. Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. *International Potato Center*. 45p.
39. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática). 2013. Lista de Ubicación Geográfica (en línea). Lima, PE. Consultado 29 dic. 2017. Disponible en: <http://webinei.inei.gob.pe:8080/sisconcode/ubigeo/listaBusquedaUbigeoPorDescripcion.htm?versionCategoriaPK=5-1&nivel=1&descripcion=&strVersion=2016>.
40. Isla, M. 2016. Control biológico del *Meloidogyne incognita* en aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) por bacteria promotoras de crecimiento y hongos endomicorrízicos. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, PE. 128 p.
41. Keller, ER. Senula, A. Leunufna, S. Grube, M. 2005. Slow growth storage and cryopreservation—tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*. 29: 411-417.
42. Klinac, DJ. 1986. Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) production systems. *Journal of Experimental Agriculture*. 14(4): 425-430.

43. Kumar, N. Vyas, D. Kumar, S. 2007. Plants at high altitude exhibit higher component of alternative respiration. *Journal of Plant Physiology*. 164: 31-38.
44. Lara, R. 2015. Estresse salino *in vitro* e silício nas características fisiológicas de *Physalis*. Tesis para obtener el título de Doctor en Producción Vegetal. Universidade Federal de Lavras. Lavras, BR. 144 p.
45. Lara, RA. Rodrigues, JD. Oliveira, H. Pasqual, M. Braga, RA. Oliveira, R. Almendagna, F. Darlan, J. 2017. Effects of silicon on antioxidant enzymes, CO<sub>2</sub>, proline and biological activity of *in vitro*-growth cape gooseberry under salinity stress. *Australian Journal of Crop Science*. 11(4): 438-446.
46. Larkin, P. J. Scowcroft, W. R. 1988. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197–214.
47. Lata, H. Moraes, R. Bertoni, B. 2010. *In vitro* germplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 46: 22-27.
48. Legge, A. 1974. Notes on the history, cultivation and uses of *Physalis peruviana* L. *Journal of the Royal Horticultural Society*. 99(7): 310-314.
49. León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. rev. aum. San José, CR. IICA. 525 p.
50. Leva, AR. Petruccelli, R. Bartolini, G. 1994. Mannitol *in vitro* cultura of *Olea europea* L. (Cv. Maurino). *Acta Horticulturae*. 356: 43-46.
51. Linnaeus, C. 1763. *Species Plantarum, Editio Secunda*. 2 ed. Estocolmo, SE. Impensis Direct. Laurentii Salvii. pp. 1670.

52. López-Pue, G. 2013. An effective *in vitro* slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* Schltr. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16: 61-68.
53. Málaga, R. Guevara, A. Araujo, M. 2013. Efecto del procesamiento de puré de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.), sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 79(2): 162-174.
54. Marín, Z. Cortés, M. Montoya, O. 2010. Uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia, mínimamente procesada inoculada con la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 mediante la técnica de impregnación a vacío. *Rev. chil. nutr.* 37(4): 461-472.
55. Márquez, M. 2013. Conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y estabilidad genética del crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.). Tesis Maestría. Chapingo, MX. Universidad Autónoma de Chapingo. 46 p.
56. Martínez-Montiel, O. Palestín-Solano, M. Ventura-Zapata, E. Castañeda-Castro, O. González, M. Guevara, M. Luna, A. Díaz, C. 2011. Alargamiento y enraizamiento de vitroplantas de cereza del Perú (*Physalis peruviana*). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13: 537 – 542.
57. McDavid, CR. Sagar, GR. Marshall, C. 1972. The effect of root pruning and 6-Benzyl-Aminopurine on the chlorophyll content, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> fixation and the Shoot/Root ratio in seedlings of *Pisum Sativum* L. *New Phytol.* 72: 465–470.
58. Mesa, A. R. Lajonchere, G. Toral, O. 1995. El cultivo *in vitro* en el mejoramiento de pastos y forrajes. II. Micropropagación y conservación de germoplasma. *Pastos y Forrajes.* 18(1): 1-10.
59. Miranda, D. Fischer, G. Mewis, I. Rohn, S. Ulrichs, C. 2014. Salinity effects on proline accumulation and total antioxidant activity in leaves of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 87: 67-73.

60. Morton, FJ. 1987. Cape Gooseberry. Eds. F Morton. En: Fruits of warm climates. Miami, USA. University of Miami. Media Incorporated. pp. 430-434.
61. Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
62. NRC (National Research Council, USA). 1989. .Lost Crop of the Incas. Little-Plants of the Andes with promise for world wide Cultivation. Washington D.C., USA. National Academy Press. 250p.
63. Ozudogru, EA. Previati, A. Lambardi, M. 2010. In vitro conservation and cryopreservation OF Ornamental Plants. In *Protocols for in vitro propagation of Ornamental Plants*. Eds. SM Jain; SJ Ochatt. New York, US. Human Press. 400 p.
64. Paksi, AM. Kassai, T. Lugasi, A. Ombódi, A. Dimény, J. 2007. *Physalis peruviana* L. an alternative crop for small scale farms. *Cereal Research Communications*. 35(2):877-880.
65. Palacios, J. 1993. *Plantas Medicinales Nativas del Perú*. Lima, PE. Concytec. 121 p.
66. Park, YC. Joong, E. Jo, JH. Jin, YS. Seo, JH. 2016. Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Food Biotechnology*. 37:105-113.
67. Priyanka, S. Singh, S. P. Shalitra, R. Singh, S. Kumar, P. 2016. In vitro clonal propagation of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *E. M. International*. 22(2): 859-863.
68. Puente, L. Pinto-Muñoz, C. Castro, E. Cortés, M. 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*. 44: 1733-1740.

69. Quispe-Mauricio, A. Callacondo, D. Rojas, J. Zavala, D. Posso, M. Vaisberg, A. 2009. Actividad citotóxica de *Physalis peruviana* (aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica. *Rev. Gastroenterol.* 29(3): 239-246.
70. Rabe, B. 1990. Stress physiology: the functional significance of the accumulation of nitrogen containing compounds.-*J. hort. Sci.* **65**: 231-243.
71. Rache, L. Pacheco, J. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en Desarrollo.* 4(1): 71-86.
72. Rains, DW. 1989. Plant tissue and protoplast culture: application to stress physiology and biochemistry. In *Plants under stress*. Eds. HG Jones; TJ Flowers; MB Jones. London, UK. Cambridge University. pp 181-196.
73. Ramos, E. 2017. Aguaymanto, el berry originario del Perú que Colombia explota mucho mejor a nivel mundial (en línea). Agencia Agraria de Noticias. Lima, PE. Consultado el 02 mayo del 2018. Disponible en: <http://agraria.pe/noticias/aguaymanto-el-berry-originario-del-peru-que-colombia-15414>.
74. Rao, N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology.* 3:136-145.
75. Rao, N. Hanson, J. Dulloo, M. Ghosh, K. Nowel, D. Larinde, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Roma, IT. Biodiversity International. 166 p.
76. Roca, J. 2013. Experiencias en el cultivo de Aguaymanto ecotipo Colombiano, en condiciones de costa central. Distrito Vegueta. Huaral Lima. Trabajo Monografico para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. 122 p.

77. Roca, WM. Arias, DI. Chávez, R. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Eds. WM Roca, M Roginski. Cali, CO. CIAT. 857 p.
78. Roca, WM. Escobar, R. Mafla, G. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*: Principios y técnicas. Cali, CO. CIAT. 720 p.
79. Rodrigues, F. Penoni, E. Soares, J. Pascual, M. 2013. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. Biosci. J. 29(1): 77-82.
80. Rodríguez, CS. 2012. Conservación *in vitro* del germoplasma de ecotipos de *Lepidium meyenii* “maca”. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 72 p.
81. Rodríguez, N. Buenos, M. 2006. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). Acta biol. Colomb. 11(2): 75-85. <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319028579006.pdf>
82. Ruzic, D. Lazic, T. Cerovic, R. 2008. Micropropagation of some prunus genotypes *in vitro* is affected by different carbon sources. Acta Hort 795:413-418.
83. Sánchez, RA. 1980. La respiración insensible al cianuro y su relación con la productividad de las plantas. Rev. Fac. Agronom. 1(1): 109-116.
84. Sánchez-Chiang, N. Jiménez, V. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía mesoamericana. 21(1):193-205
85. Santana, G. Angarita, A. 1997. Regeneración adventicia de somaclones de uchuva (*Physalis peruviana*). Agronomía Colombiana. 14(1): 59-65.

86. Sarkar, D. Kaushik, SK. Naik, PS. 1999. Minimal growth conservation of potato microplants: silver thiosulfate reduce ethylene-induced growth abnormalities during prolonged storage *in vitro*. Plant Cell Reports. 18: 897-903.
87. Sarkar, D. Naik, P. 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. Euphytica. 102: 275-280.
88. Schreiber, F. 2012. Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en condiciones de valles andinos. Lima, PE. Sierra Exportadora. 66 p.
89. Scocchi, A. Rey, H. 2010. Conservación de germoplasma *in vitro*. En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Eds. G Levitus. V Echenique. C Rubinstein. E Hopp. L Mroginski. Buenos Aires, AR. INTA. 652 p.
90. Sierra Exportadora, PE. 2015. Aguaymanto: Ficha técnica (en línea). Cajamarca, PE. Consultado 02 mayo 2016. Disponible en <http://www.sierraexportadora.gob.pe/programas/berries/galeria/Ficha%20tecnica-Berries-2015.pdf>.
91. Sierra y Selva Exportadora. 2016. Exportaciones de Aguaymanto (en línea). Cajamarca. PE. Consultado 05 marzo 2017. Disponible en <http://www.sierraexportadora.gob.pe/2016/11/09/hasta-septiembre-exportacion-de-aguaymanto-crece-815/>
92. Steinitz, B. 1999. Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. J. Plant Physiol. 155, 1-8.
93. Stoop, J. Williamson, J. Pharr, D. 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. Trends y Plant Science. 1(5): 136-141.
94. Taiz, L. Zeiger, E. 2002. Plant physiology. 3 ed. Sunderland, US. Sinauer Associate. 623 p.

95. Takshay, K. Williamson, J. 2016. Mannitol in plants, fungi, and Plant-Fungal interactions. *Trends in Plant Science*. 20: 1-12.
96. Tanaka, Y. Nose, T. Jikumaru, Y. Kamiya, Y. 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J*. 74: 448-457.
97. Tapia, C. Estrella, J. Monteros, A. Valverde, F. Nieto, M. Córdova, J. 2004. Manejo y conservación de RTAs *in situ* en fincas de agricultores y *ex situ* en el banco de germoplasma de INIAP. In Barrera, V. Tapia, C. Monteros, A. eds. Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Editorial del Centro Internacional de la papa. Lima, PE. pp. 45.
98. Tardieu, F. Parent, B. Simonneau T. 2010. Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or not hydraulic processes? *Plant Cell Environ*. 33: 636-647.
99. Taylor, P. Dukin, S. 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum ssp.* hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 217-222.
100. Thomas, JC. McElwain, EF. Bohnert, HJ. 1992. Convergent induction of osmotic stress-responses 1. *Plant Physiol*. 100: 416-423.
101. Thorpe, T. Stasolla, C. Yeung, EC. De Klerck, G. Roberts, A. George, EF. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. Eds. EF George; MA Hall; De Klerk GJ. 3 ed. Dordrecht, NL. 501 p.
102. Toledo, J. Golmirzaie, A. 1998. Conservación *in vitro* de *Solanum spp.* Bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Junio: 1-5.
103. Vallejo, F. Estrada, E. 2002. *Mejoramiento genético de plantas*. Cali, CO. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. 402 p.



104. Wang, YL; Fan, MJ; Liaw, SL. 2005. Cryopreservation of in vitro–grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 46:29-34.
105. Watt, MP. Banasiak, M. Reddy, D. Albertse, Snyman, SJ. 2009. *In vitro* minimal growth storage of *Saccharum* spp. Hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 96: 263-271.
106. Wilkinson, S. Davies, WJ. 2010. Drought, ozone, ABA, and ethylene: new insights from cell to plant community. *Plant Cell Environ.* 33:510-525.
107. Yücesan, B. Mohammed, A. Arslan, M. Gürel, E. 2015. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 39: 1-10.
108. Zavala, D. Mauricio, Q. Pelayo, A. Posso, M. Rojas, J. Wolach, V. 2006. Citotoxic effect of *Physalis peruviana* (capuli) in colon cancer and chronic myeloid leukemia. *Anales de la Facultad de Medicina,* 67(4), 283–289.
109. Zhang, Y. Deng, G. Xu, X. Wu, S. Li, S. Li, H. 2013. Chemical Components and Bioactivities of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana*). *International Journal of Food Nutrition and Safety.* 3(1): 15-24.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: COMPONENTES DEL MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)

Los componentes del medio de Murashige y Skoog (1962) fueron adicionados a los diferentes medios de cultivo del presente estudio a partir de soluciones stock de Macronutrientes, Micronutrientes, Fe-EDTA y Componentes orgánicos. En las soluciones finales, los diferentes compuestos tuvieron la concentración que se detalla a continuación.

CLASIFICACIÓN	COMPONENTES	CONCENTRACIÓN (mg/L)
MACRONUTRIENTES	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
	$\text{KNO}_3$	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
MICRONUTRIENTES	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6
	KI	0.83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
COMPONENTES ORGÁNICOS	GLICINA	2
	ÁCIDO NICOTÍNICO	0.5
	PIRIDOXINA-HCl	0.5
	TIAMINA-HCl	0.1
	<i>myo</i> -INOSITOL	100

Tomado de Murashige y Skoog (1962). *A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.*

## ANEXO 2: VALORES PROMEDIO DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO

Los siguientes cuadros reportan los valores promedio de las tres variables en estudio, registradas durante los 130 días que duró el experimento.

### Longitud de Plántula en valores promedio

	MC			SORBITOL			MANITOL			MSO		
	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130
<b>Caj 04</b>	9.73	11.42	9.00	3.03	3.06	6.97	3.80	4.12	5.02	2.19	2.89	3.80
<b>Caj 05</b>	8.76	13.47	11.16	3.13	4.80	5.62	3.20	4.97	6.10	2.53	3.17	4.00
<b>Jun 01</b>	10.37	16.24	12.04	4.04	4.08	4.97	2.96	3.69	6.00	1.54	2.22	2.22
<b>Jun 03</b>	10.24	14.14	11.97	2.66	3.61	4.00	3.53	3.13	3.46	1.88	2.96	2.86

### Número de nudos por plántula en valores promedio

	MC			SORBITOL			MANITOL			MSO		
	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130
<b>Caj 04</b>	2.56	2.69	2.86	1.85	2.86	2.28	3.28	2.99	4.54	3.28	3.10	3.13
<b>Caj 05</b>	2.28	2.86	3.10	1.25	1.80	1.93	2.82	3.10	3.84	3.57	4.00	3.57
<b>Jun 01</b>	2.40	2.28	2.99	1.39	2.13	2.28	2.40	2.96	2.40	2.56	4.12	1.69
<b>Jun 03</b>	2.28	2.56	2.69	1.12	1.99	1.96	2.13	1.96	1.99	3.69	3.28	2.13

**Número de explantes vivos por frasco en valores promedio**

	MC			SORBITOL			MANITOL			MSO		
	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130	Día 50	Día 100	Día 130
<b>Caj 04</b>	11.86	7.29	9.57	9.71	9.71	7.57	11.71	16.00	6.14	15.57	13.57	9.71
<b>Caj 05</b>	9.00	8.57	10.71	11.29	8.71	9.14	17.71	8.29	9.57	15.57	15.29	13.14
<b>Jun 01</b>	12.00	8.43	9.43	11.14	12.86	5.71	14.14	14.29	6.00	14.14	9.86	8.14
<b>Jun 03</b>	9.29	9.71	5.14	7.71	9.29	5.29	13.57	16.00	5.57	13.57	13.71	7.14

## ANEXO 2: CUMPLIMIENTO DE LOS SUPUESTOS DEL ANOVA

Antes de efectuar el análisis de varianza de la totalidad de los datos registrados, se verificó que estos cumplieran con los supuestos de *distribución normal de los errores* y *homogeneidad de varianzas*. Los resultados se muestran a continuación.

### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
Residuos <b>Raíz</b> de Longitud de plántula	,037	336	<b>,200*</b>
Residuos <b>Raíz</b> de Número de nudos	,041	336	<b>,200*</b>
Residuos <b>Número</b> de explantes vivos	,041	336	<b>,200*</b>

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Cuadro de Análisis. Prueba de Levine

VARIABLE	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Raíz Longitud	DÍA*PROCED*TRATAMIENTO	0.39	18	0.02	0.81	<b>0.6846</b>
Raíz Número de nudos	DÍA*PROCED*TRATAMIENTO	0.23	18	0.01	1.62	<b>0.0537</b>
Explantes vivos	DÍA*PROCED*TRATAMIENTO	79.90	18	4.44	1.46	<b>0.1026</b>

Como puede notarse, para el cumplimiento de los supuestos ( $p\text{-valor} \geq 0.05$ ) fue necesario transformar los datos de las variables longitud de plántula y número de nudos por plántula a través de la función raíz cuadrada, no siendo así para la variable número de explantes vivos por frasco, a cuyos datos no fue necesario cambiar para cumplir los supuestos.

**ANEXO 3: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS TRES  
VARIABLES EN ESTUDIO.**

El ANOVA efectuado mostró la significancia de las diferencias entre promedios tanto de los efectos principales (sombreados) como de las interacciones entre los factores en estudio.

FUENTE DE VARIACIÓN	LONGITUD DE PLÁNTULA				NÚMERO DE NUDOS POR PLÁNTULA				NÚMERO DE EXPLANTES VIVOS POR FRASCO			
	SC	F	p-valor	Sig.	SC	F	p-valor	Sig.	SC	F	p-valor	Sig.
<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	149.58	579.28	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	7.48	94.65	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	734.18	23.76	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>
<b>PROCEDENCIA</b>	1.07	4.16	<b>0.0067</b>	<b>*</b>	0.93	17.64	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	1172.47	56.92	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>
<b>DÍA</b>	8.64	50.18	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	2.18	27.52	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	130.51	4.22	<b>0.0061</b>	<b>*</b>
<b>PROCED*MEDIOS DE CULTIVO</b>	4.77	6.16	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	2.57	16.26	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	431.96	6.99	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>
<b>DÍA*MEDIOS DE CULTIVO</b>	4.74	9.18	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	2.23	9.41	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	188.50	2.03	<b>0.0358</b>	<b>*</b>
<b>DÍA*PROCEDENCIA</b>	1.22	2.37	<b>0.0300</b>	<b>*</b>	0.70	4.43	<b>0.0003</b>	<b>*</b>	361.20	5.84	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>
<b>DÍA*PROCED*MEDIOS DE CULTIVO</b>	3.20	2.07	<b>0.0072</b>	<b>*</b>	1.89	3.99	<b>&lt;0.0001</b>	<b>**</b>	481.33	2.60	<b>0.0005</b>	<b>*</b>
<b>Error</b>	24.27				7.43				2904.63			
<b>Total</b>	198.14				25.56				6524.14			

Sig.= Significancia. \* Diferencias significativas. \*\* Diferencias altamente significativas.