



FACULTAD DE INGENERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL CULTIVO IN VITRO DE NICOTIANA TABACUM CON MIRAS AL DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.

AUTOR

Karen Jeanely Grijalva Sinmaleza

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL CULTIVO *IN VITRO* DE *NICOTIANA TABACUM* CON MIRAS AL DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Karen Jeanelly Grijalva Sinmaleza

Año

2018

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Determinación de condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal, a través de reuniones periódicas con el estudiante Karen Jeanely Grijalva Sinmaleza, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Fernando Xavier Rivas Romero
Máster en Biología Molecular y Celular de Plantas
CC: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Determinación de condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal, de Karen Jeanely Grijalva Sinmaleza, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fabio Marcelo Idrovo Espín
Doctor en Ciencias (Ciencias Biológicas: Biotecnología)
CC: 170595225-5

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Karen Jeanely Grijalva Sinmaleza

CC: 172341293-6

AGRADECIMIENTOS

Al M.Sc. Fernando Rivas por su asesoramiento, y tiempo.

A la Universidad de las Américas por permitirme utilizar el laboratorio (LQ34).

Al Ing. Edgar Velastegui y a la Ing. Estefania Almeida por sus consejos a través de mi trabajo.

DEDICATORIA

A Melany, Javier y en especial a Geoconda que ha sido mi ejemplo a seguir.

A Juan y Luz por ayudarme cuando más lo necesite.

A Alejandro por confiar en mí y motivarme siempre.

A todos los quiero mucho.

RESUMEN

El Tabaco (*Nicotiana tabacum*) es uno de los cultivos no alimenticios con mayor superficie cultivada en el mundo, después del algodón, en Ecuador pocas empresas lo desarrollan o fomentan en zonas muy especiales. Atendiendo a los nuevos retos para el cultivo de plantas con medio de cultivo líquido, se han diseñado equipos y sistemas de cultivo que posibilitan su utilización en la propagación masiva. El objetivo de esta investigación fue la determinación de variables significativas para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal con arquitectura tipo reloj de arena. Se desarrollaron tres etapas, que son: El establecimiento de un protocolo de desinfección para semillas de *Nicotiana tabacum*, mediante un DCA se evaluaron 4 tratamientos con distintos tiempos de inmersión en las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) 20% y Etanol 70%, se determinó que el tratamiento de desinfección más viable es el tratamiento 1 con un 83.3% de viabilidad. En la segunda fase *tabacum* mediante un diseño experimental de Plackett-Burman se evaluó el efecto de siete variables independientes (6-BAP, Sacarosa, pH, Temperatura, Concentración de sales MS, Tiempo de subcultivo, y ANA) en el establecimiento de *Nicotiana* se determinó que las variables más significativas son la sacarosa y el 6-bencilaminopurina (6-BAP), además se determinó a partir de la velocidad de crecimiento que el mejor tratamiento fue el 3 con 0,37 cm.día⁻¹ con una concentración de 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP, y 30 g.L⁻¹ de Sacarosa. Finalmente, mediante un diseño experimental de Plackett-Burman se evaluó el efecto de siete variables independientes (6-BAP, Sacarosa, pH, Temperatura, Concentración de sales MS, Tiempo de subcultivo, AIA) en la multiplicación de *Nicotiana tabacum* se determinó que las variables más significativas son el 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el Ácido Indol-acético(AIA), además se determinó a partir de la cantidad de brotes (N° de brotes.día¹) que el mejor tratamiento fue el 5 con 0.5 mg.L⁻¹ 6-BAP, y 1.5 mg.L⁻¹ AIA .

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum*) is one of the crops without food with the largest cultivated area in the world, after cotton, in Ecuador. Attending to the new challenges for the cultivation of plants with liquid culture medium, equipment and systems of culture have been designed that make possible their use in the massive propagation. The objective of this investigation was the determination of significant variables for the establishment and multiplication in vitro of *Nicotiana tabacum*, with a view to the development of a prototype of a temporary immersion system with an hourglass architecture. It was developed in three stages, which was: The establishment of a disinfection protocol for seeds of *Nicotiana tabacum*, through a DCA was evaluated 4 treatments with immersion times in the solutions of sodium hypochlorite (NaClO) 20% and 70% Ethanol, it was determined that the most viable disinfection treatment is treatment 1 with 83.3% viability. In the second phase tabacum by means of an experimental design of Plackett-Burman, the effect of seven independent variables (6-BAP, Sucrose, pH, Temperature, MS Sales Concentration, Subculture Time, and NAA) in the establishment of *Nicotiana* was evaluated. It was determined that the most significant variables are sucrose and 6-benzylaminopurine (6-BAP), in addition it was determined from the growth rate that the best treatment was 3 with $0.37 \text{ cm}\cdot\text{day}^{-1}$ with a concentration of $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 6-BAP, and $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of Sucrose. Finally, by means of an experimental design of Plackett-Burman, the effect of seven independent variables (6-BAP, Sucrose, pH, Temperature, MS sales concentration, Subculture time, and IAA) in the multiplication of *Nicotiana tabacum* was evaluated, it was determined that the most significant variables are 6-benzylaminopurine (6-BAP) and Indolacetic acid (IAA), in addition it was determined from the number of outbreaks (No. of outbreaks $\cdot\text{day}^{-1}$) that the best treatment was 5 with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BAP, and $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Problemática.....	4
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo general:.....	7
1.4.2. Objetivos específicos:	7
2. Capítulo II. Marco teórico	7
2.1. Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	7
2.1.1. Descripción taxonómica.....	8
2.2. Descripción botánica del Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	9
2.2.1. Raíz	9
2.2.2. Tallo.....	10
2.2.3. Hojas.....	10
2.2.4. Flores.....	11
2.2.5. Fruto.....	12
2.3. Condiciones de cultivo del Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	13
2.3.1. Temperatura	13
2.3.2. Fotoperiodo.....	13
2.3.3. Humedad	13
2.3.4. Medio de cultivo del tabaco.....	13
2.3.5. pH	14
2.4. Importancia del cultivo de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).....	14
2.5. Formas de propagación y cultivo convencional.....	15
2.6. Cultivo in vitro	15
2.7. Factores que influyen en un cultivo in vitro	16
2.7.1. Temperatura	16
2.7.2. Fotoperiodo.....	17
2.7.3. Fuente de carbono	17
2.8. Sistemas de inmersión temporal.....	18
2.9. Algunos diseños de sistemas de inmersión temporal.....	18

2.9.1. RITA® (Récipient à Immersion Temporaire Automatique).....	19
2.9.2. Sistema Twin-Flask®	19
2.9.3. Sistema Ebb-Flow®	20
2.9.4. Sistema Thermo-Photo-Bioreactor®	21
2.9.5. Sistema Rocker®	22
2.9.6. Biorreactor de inmersión por burbujas	23
2.9.7. Sistema tambor giratorio	24
2.10. Factores que influyen en el cultivo de un sistema de inmersión temporal.....	25
2.10.1. Frecuencia y Tiempo de inmersión.....	25
2.10.2. Volumen de medio de cultivo.....	26
2.11. Diseño experimental.....	27
3. Capítulo III. Diseño del plan experimental.....	28
3.1. Hipótesis.....	29
3.2. Fase I: Establecimiento de material vegetal estéril	29
3.3. Fase II: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para el establecimiento de Nicotiana tabacum.....	29
3.4. Fase III: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para la multiplicación de Nicotiana tabacum.	31
3.5. Diagrama de Flujo	33
4. Capítulo IV. Procedimientos	34
4.1. Población y muestra	34
4.2. Obtención de los explantes.....	34
4.2.1. Desinfección	34
4.2.2. Siembra de semillas y obtención de explantes	35
4.3. Etapa de Identificación de variables significativas.....	37
4.3.1. Establecimiento cultivo in vitro en medio sólido	37
4.3.2. Multiplicación de cultivo in vitro en medio sólido.....	38
4.4. Evaluación estadística de los resultados	39
5. Capítulo V. Resultados y discusión	39
5.1. Fase I: Establecimiento de material vegetal estéril	39
5.1.1. Porcentaje de contaminación.....	39
5.1.2. Porcentaje de viabilidad.....	44
5.1.3. Nivel de Necrosamiento.....	47
5.2. Fase II: Identificación de variables significativas con un	

diseño Plackett-Burman para el establecimiento de <i>Nicotiana tabacum</i>	49
5.2.1. Velocidad de crecimiento	49
5.2.2. Identificación de variables significativas para el establecimiento in vitro de <i>Nicotiana tabacum</i>	54
5.3. Fase III: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para la multiplicación de <i>Nicotiana tabacum</i>	56
5.3.1. Tasa promedio del número de brotes por tratamiento	56
5.3.2. Identificación de variables significativas para la multiplicación in vitro de <i>Nicotiana tabacum</i>	61
6. Conclusiones y recomendaciones	64
6.1. Conclusiones.....	64
6.2. Recomendaciones.....	65
Referencias	66
Anexos	81

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La micropropagación es una técnica de cultivo *in vitro*, mediante la cual, un explante es seleccionado y desinfectado para propagarse en un medio de cultivo previamente esterilizado, aprovechando la premisa de la totipotencia de las células vegetales. Además, es la técnica más utilizada actualmente de reproducción asexual. No obstante, a través del tiempo esta técnica ha presentado ciertos inconvenientes en relación al alto uso de mano de obra calificada y una escasa posibilidad de automatización. (Etienne et al., 2012)

Los Sistemas de inmersión temporal (SIT) constituyen una alternativa para el cultivo *in vitro*. El mismo combina las ventajas de los medios de cultivo de tipo semi-sólido y líquido. Hasta el día de hoy existen varios modelos de SIT reportados, algunos de forma empírica, otros de forma comercial. (Georgiev et al., 2012)

Teisson y colaboradores en 1999, diseñaron un sistema empírico con medio líquido que alterna períodos de inmersión, con los de aireación uno más corto que el otro. A partir del uso de este principio se han reportado resultados satisfactorios para la propagación de varias especies vegetales.

El RITA[®] (*Récepteur à Immersion Temporaire Automatique, CIRAD, 1993*) es el primer sistema diseñado, se ha utilizado principalmente para el cultivo de embriones somáticos. El sistema funciona con un compresor de aire filtrado este impulsa el medio líquido, de un recipiente que se encuentra en la parte inferior a uno en la parte superior, en el cual se cultivan los explantes (Steingroewer, et.al., 2013). A pesar de los altos costos que conlleva la importación de este sistema de inmersión al Ecuador y del mantenimiento del mismo, sigue siendo diseño es uno de los más utilizados en la actualidad.

El uso de sistemas de inmersión temporal en Francia, incentivo a Cuba a crear el sistema de frascos gemelos en el centro de Bioplantitas, en reemplazo al sistema automatizado (RITA[®]) creado en el CIRAD. En este sistema se han propagado varias especies vegetales como la piña, sin embargo, se han estudiado principalmente líneas de banano como la FHIA-18 (AAAB (Basail et al. 2011)),

El Centro Nacional para los Recursos Genéticos y Biotecnología (NACGRAB) junto al Ministerio Federal de Ciencia y Tecnología, en Nigeria en el año 2012, proporcionaron patrocinio para la construcción de varios sistemas de inmersión temporal de frascos gemelos similares a los desarrollados en Cuba, en los que estudiaron varias especies agrícolas. (Balogun, Maroya, Asiedu y Taiwo, 2014). Esto desencadenó estudios y modificaciones de dicho sistema innovándolo mediante el uso de tanques rectangulares superpuestos de la marca SETIS de la empresa BIOCHEMIE B.V.

El sistema “*Ebb-Flow*[®]” es una modificación del sistema de frascos gemelos o “*Twin-Flask*[®]”, consta de dos recipientes: uno de ellos posee una abertura ancha que facilita su función de cámara de cultivo y uno de abertura más pequeño que funciona como un contenedor de almacenamiento para el medio de cultivo. (Cabrera et al., 2008)

El sistema “*Thermo-Photo-Bioreactor*[®]”, desarrollado para el cultivo del pasto antártico (*Deschampsia antarctica*) en un estudio de actividad antibacteriana o antibiótica, además de estudios en especies productoras de metabolitos secundarios. Este sistema de inmersión posee aspectos muy importantes para el cultivo de plantas extremófilas como el control preciso de la temperatura y la radiación UV. (Sequeira, et.al.; 2012).

El BIB[®] “*Biorreator de Imersão por Bolhas*” utiliza una estrategia de propagación mediante la inmersión temporal de explantes en espuma, en lugar de medio líquido. El sistema consta de un recipiente de vidrio, el cual se divide

mediante una membrana microporosa. Este sistema de inmersión proporciona mayor número y un mejor crecimiento de brotes por explante, en comparación a un RITA. (Scheidt, et.al.; 2011)

El sistema “*Rocker*®” utiliza una plataforma mecánica que como técnica de propagación permite una inclinación de los recipientes, esta inclinación provoca que el medio se distribuya de un extremo a otro y viceversa. A pesar de que a este sistema no se puede conectar una estructura adicional, es posible la apilación de varios recipientes de cultivo uno encima de otro dentro de la misma plataforma. (Uchendu, et.al.; 2011)

El sistema de tambor giratorio es un sistema de inmersión de fácil construcción, consiste en un recipiente que puede ser una botella de plástico o vidrio autoclavable, colocado encima de un rodillo, dentro del recipiente se coloca una red de acero inoxidable para soportar los explantes al momento del cultivo. (Araújo dos Santos, et.al.; 2014)

El empleo de biorreactores para el cultivo en medios líquidos se ha convertido en una herramienta eficaz para la micropropagación, debido mejoramiento en la calidad del material regenerado *in vitro* y al incremento del coeficiente de multiplicación. (Mehrotra, Goel, Kukreja y Mishra, 2007).

En un proceso de micropropagación para cualquier tipo de especie vegetal, las etapas de establecimiento y multiplicación, junto a la mano de obra especializada constituyen puntos clave en el cultivo *in vitro*, debido al alto costo que involucra por el uso de agentes gelificantes (Adelberg, Chen, Cousins, y Rieck, 2007). Una de las medidas que se puede adoptar ante este problema es el uso de medios de cultivo líquidos, para así reducir los costos y posibilitar la automatización del cultivo *in vitro* (Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

En el Ecuador, después del algodón el tabaco es uno de los cultivos que, a pesar de no ser alimenticio, cuenta con una de las superficies cultivadas más

grandes. Actualmente pocas empresas lo desarrollan, y esto sucede en zonas muy especiales, aun así, alcanza las 4.179 Has. de producción lo cual representa el 0.42% de los cultivos transitorios, y el 0.16% de los cultivos totales. (FAO, 2011).

1.2. Problemática

Las células vegetales son las principales herramientas para la micropropagación de cultivos que son importantes a nivel comercial, como la fitorremediación de aguas residuales o la producción de metabolitos secundarios. Para una correcta propagación a gran escala es necesario que se realice de manera *in vitro*, optimizando de tiempo y recursos, sin importar si es a partir de explantes diferenciados es decir a partir de embriones, brotes, plántulas, raíces transformadas o adventicias, o explantes desdiferenciados como las células suspendidas. (Georgiev, Schumann, Pávlov y Bley, 2014).

La propagación masiva de plantas como el tabaco, requieren el desarrollo de nuevas técnicas que sean eficientes, para la obtención de plantas libres de patógenos en el menor tiempo posible, aumentando el rendimiento de producción. Esto es necesario ya que al automatizar dicho proceso ciertos parámetros como frecuencia y tiempo de inmersión, entre otros se optimizan. Las técnicas de cultivo *in vitro* son de gran importancia, uno de ellos es la producción de metabolitos secundarios de interés, como en el caso del tabaco que sirve para la obtención de glicósidos. (Mehrotra et al., 2007).

La necesidad de obra calificada para realizar cultivo *in vitro* y el alto costo que esto implica, en países subdesarrollados se han perfeccionado técnicas de inmersión temporal en medio líquido para la producción de dichas plantas de interés. (Gupta y Ibaraki, 2008). A pesar de que estos biorreactores facilitan la automatización y escalado de la producción, muchos diseños siguen presentando dificultades en cuanto a la producción comercial, esto se debe a la mala estandarización de los protocolos, al mantenimiento que el equipo

requiere lo que resulta en un alto costo de inversión, y las dificultades de la aclimatización de las plantas al ambiente *ex vitro*. (Basail, 2011)

Sin la necesidad de realizar grandes inversiones en equipos sofisticados alrededor del mundo se han desarrollado una gran variedad de sistemas, con la finalidad de continuar con la investigación disminuyendo los costos de producción y de mantenimiento. Actualmente y a diferencia de otros países, el Ecuador a pesar de que cuenta con un alto nivel de investigación en cuanto al cultivo *in vitro*, no ha desarrollado prototipos o patentes de diseños de inmersión temporal que sean fáciles de ensamblar y que usen la menor cantidad de recursos posibles.

1.3. Justificación

El diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal propio implica que, en comparación a los prototipos comerciales ya existentes, se encuentre la manera de realizar una menor inversión obteniendo los mismos resultados sin afectar la velocidad de crecimiento que se alcanza con los SIT ya existentes, esta necesidad radica en que actualmente algunos de los diseños son desechables y aun así implican altos costos. Por lo tanto, se obtendrá la misma cantidad de explantes de igual tamaño con las mismas condiciones, pero en menor tiempo y con menor cantidad de recursos (Acuña, 2009)

En relación a las técnicas convencionales que se usan en el país, la automatización reducirá la mano de obra empleada en el proceso de cultivo *in vitro*, lo cual repercute en costos de operación, además que es mucho más fácil el control de los parámetros de operación, resultando en una micropropagación más eficiente (Gueguim, Oloke, Lateef, Azanfack y Adeyemi, 2010).

Francia en Europa y Cuba en Latinoamérica son referentes en el desarrollo y aplicación de metodologías, que permiten mejorar la eficiencia de los métodos convencionales de propagación. Se han realizado investigaciones para producir plantas de varias especies como caña de azúcar (Lorenzo et al., 1998), piña y banano (Escalona et al., 1999), banano y microtubérculos de papa (Jiménez et

al., 1999), entre otros. Por otro lado, países como Estados Unidos, Holanda e Israel, ya han optado por estas técnicas, desarrollando y usando comercialmente sistemas para producción de plantas *in vitro*. (Alvarenga et al., 2015).

El empleo de todos estos sistemas incide en la reducción de los costos de producción en el cultivo a gran escala, o en el tiempo de los mismos. Esto se ha documentado en un gran número de especies de valor comercial (Watt, 2012). Por otra parte, se controlan los tiempos de inmersión y se reducen los problemas de hiperhidricidad, frecuentes en sistemas de cultivo en medios líquidos (Alvarenga, et.al., 2015).

Siempre es necesario mejorar la producción del cultivo tanto en cantidad como en calidad, optando por el desarrollo de nuevas alternativas en la agrotecnología del cultivo, en este caso del tabaco, lo que requiere de paquetes técnicos que favorezcan el logro de cosechas con alto rendimiento. Para esto se plantea el diseño de un sistema de inmersión, el cual preservará y mantendrá la estructura del explante, sin que esta sufra un posible estrés en cuanto a movimientos bruscos por parte del sistema de inmersión.

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Ibañez, Roselló y Del Amo, 2013).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención, debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Mroginski y Roca, 1991).

Además, el diseñar un sistema de inmersión propio ayuda a reducir el costo de la inversión y el tiempo que normalmente toma la adquisición de sistemas

externos. En este caso el sistema planteado cuenta con la estructura adecuada para aprovechar nutrientes, incrementando el crecimiento de brotes, con la menor cantidad de dinero, ya que la estructura planteada es fácil de ensamblar.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general:

Determinar las condiciones de cultivo para la micropropagación de *Nicotiana tabacum*, con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal.

1.4.2. Objetivos específicos:

- Determinar las mejores condiciones de desinfección para el cultivo in vitro a partir de hojas de *Nicotiana tabacum*.
- Determinar las mejores condiciones para el establecimiento y multiplicación para el cultivo in vitro a partir de hojas de *Nicotiana tabacum*.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1. Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El tabaco (Figura 1), es una planta solanácea, perteneciente al género *Nicotiana*, abarca más de 60 especies las cuales se encuentran clasificadas en tres subgrupos; *Nicotiana tabacum* con 4 especies, *Nicotiana rustica* con 9 especies, y *Nicotiana petunoides* con 45 especies. El nombre de *Nicotiana tabacum* fue dado en 1565 por Jean Nicot, fue descrita por el naturalista Carlos Linneo cuando publicó el tratado "*Species Plantarum*", y en ella denominó al tabaco "*Nicotiana tabacum*". (Troncoso et al, 1997)



Figura 1. Planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado de (Sharma, Bala, Srivastava, y Nagar, 2016)

Entre los tres subgrupos descritos, *Nicotiana Tabacum* alrededor del mundo proporciona el 90% de todos los tabacos, *Nicotiana Petunoides* es una especie que no representa ningún tipo de interés a nivel comercial, finalmente *Nicotiana Rústica* es conocida por la producción de tabacos fuertes. (Sharma, et al., 2016)

2.1.1. Descripción taxonómica

La clasificación taxonómica del tabaco (*Nicotiana tabacum*) se divide de la siguiente manera:

Tabla 1.

Clasificación taxonómica del tabaco.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Magnoliopsida
Clase	Dicotiledónea
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae

Género	Nicotiana L., 1753
Especie	<i>tabacum</i> L., 1753

Tomado de (CONABIO, 2011)

2.2. Descripción botánica del Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El Tabaco es una planta de cosecha anual, tiene una altura entre 1.4 a 2.7 m., cuenta con una raíz fibrosa, un tallo redondo, erecto, semileñoso y pubescente, presenta una coloración verde o blanquecina dependiendo del tipo o de la variedad de tabaco. Sus hojas son abundantes, sésiles, largas, lanceoladas, y punteadas. Su inflorescencia es terminal. Además, su fruto posee un cáliz persistente, con una cápsula de tipo bilobulada. Finalmente, las semillas poseen una estructura externa rugosa, son reciformes, e higroscópica si se almacenan en condiciones óptimas, presentarán alta viabilidad. (González y Guardián, 1997)

2.2.1. Raíz

Aunque la mayoría de las raíces finas se encuentran en la zona más fértil, el tabaco tiene un sistema tipo radicular abundante y penetrante (Figura 2) (Gostinchar, J, 1954). En cuanto a la profundidad llega en promedio a medir 30 cm. (Sánchez, et.al., 2004)



Figura 2. Raíz del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado de Tomado de (Sharma, Bala, Srivastava, y Nagar, 2016)

2.2.2. Tallo

La planta de tabaco posee un con médula blanca en su interior, además se encuentra recubierto de varios pelos glandulares y tiene una estructura totalmente erguida. (Figura 3). (Gostinchar, J, 1954)



Figura 3. Tallo del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado de (Sharma, Bala, Srivastava, y Nagar, 2016)

2.2.3. Hojas

En general las hojas del tabaco en algunas variedades son grandes aproximadamente 50 cm de longitud, su coloración es verde, posee nervios centrales glutinosos y gruesos, además son de tipo sentadas, los bordes peludos, enteros y lanceolados. (Figura 4) (Hamorsky, et.al., 2013)



Figura 4. Hojas sentadas del tabaco (*Nicotiana tabacum*).
Tomado de (*Sharma et.al., 2016*)

2.2.4. Flores

La flor de tabaco, posee estructura simétrica. Nacen en la parte más alta de los tallos, reunidas en racimo. Sus 5 pétalos están fusionados formando una trompeta. Dependiendo de la variedad presentan una coloración desde el blanco verdoso al rosa. La polinización la llevan a cabo insectos, abejas y mariposas principalmente. La floración comienza en primavera y puede alargarse durante todo el verano. Además, casi todas las variedades son autógamas es decir las flores se abren después de la fecundación. (Figura 5). (Pujana, I, 2011)



Figura 5. Flor de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado de (Sharma, Bala, Srivastava, y Nagar, 2016)

2.2.5. Fruto

El fruto es una cápsula recubierta por un cáliz persistente, que se abre en su vértice por dos valvas bífidas, dispuesto en cápsula cónica, a modo de cajita oval de dos celdillas que se abren por la parte superior, con muchas semillas diminutas, puede haber más de mil por fruto, y unas 10.000 unidades pesan un gramo. Germinan en 10-20 días. (Figura 6) (Pujana, I, 2011)



Figura 6. Fruto del tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tomado (Sharma, Bala, Srivastava, y Nagar, 2016)

2.3. Condiciones de cultivo del Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El tabaco es una de las especies más susceptibles a la influencia de los diversos factores que integran el medio formulado y las condiciones de cultivo en que se desarrollaran los explantes.

2.3.1. Temperatura

En cuanto a la temperatura óptima para el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum*) según Palacios, S., 2008 debe encontrarse entre 18°C y 28 °C, ya que se observó que a menor o mayor temperatura de este rango los explantes no crecían y morían al poco tiempo de siembra.

2.3.2. Fotoperiodo

En cuanto al fotoperiodo es importante determinar el mismo ya que la luz es un factor determinante para las hojas de esta planta en cuanto a la textura, el grueso y el contenido de las mismas, según Palacios, S., 2008 se recomienda que sea el de 16/8 h, teniendo en cuenta la principal función de esta especie a la formación de nicotina, para la obtención de este alcaloide es necesario que la luz este a favor de la posición del explante.

2.3.3. Humedad

El tabaco es muy sensible a la falta o exceso de humedad. Una humedad elevada no permite el correcto desarrollo del explante y, en general. Conduce hacia la muerte del mismo. (CONABIO, 2011)

2.3.4. Medio de cultivo del tabaco

Es necesario tener en cuenta la formulación del medio en el mismo las concentraciones de las sales son determinantes para el crecimiento de los explantes. Por ejemplo, a bajos niveles de nitrógeno se obtienen hojas

pequeñas, delgadas, por lo tanto, en la aclimatación *ex vitro* las hojas contendrán bajo contenido de nicotina. (Murashige, Skoog, 1962)

El fósforo, acelera el desarrollo del explante, sin embargo, si su disponibilidad es alta, afecta al crecimiento y calidad del explante. (Ganaphati, et.al., 2004)

El potasio para el tabaco es fundamental, ya que si se presenta déficit del mismo en su desarrollo la planta presentarse difícil combustión. (Palacios, 2008)

2.3.5. pH

En general en el cultivo *in vitro* se ocupa un rango de entre 5.6 y 5.8 de pH, el tabaco en este sentido tiene un amplio rango de aceptación entre 5.5 y 6.5, siempre teniendo en cuenta que si el medio de cultivo se encuentra por debajo de 4.5, provocara que el explante no crezca y muera. (CONABIO, 2011)

2.4. Importancia del cultivo de Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

La importancia del tabaco en la actualidad radica en la gran demanda del mismo para consumo, por lo cual alrededor de 90 países contienen cultivos de tabaco. La importancia del desarrollo de plantas en masa es debido a que es una de las únicas cosechas que un total de 60% de su mercado son las hojas, lo que convierte a esta planta no comestible como la más cultivada en el mundo. (Machado y González, 1984).

La mayoría de los descubrimientos en el campo del cultivo de tejidos vegetales y la biología molecular se han originado a partir de la experimentación con las plantas de tabaco, se ha convertido en un sistema modelo la denominan la Cenicienta de la Biotecnología Vegetal. Es una planta que se considera un extremadamente versátil en todos los aspectos. (Palacios, 2008)

En 1962, Murashige y Skoog idearon una amplia gama, de estudios de cultivo de tejido de tabaco, variando factores físicos y químicos, esto les permitió tener más control sobre el crecimiento, diferenciación, inducción de haploides y selección de líneas de etanol mutantes, convirtiéndose así en una planta modelo para el aislamiento y regeneración de otras plantas a partir de protoplastos, la importancia de esta planta radica en estos descubrimientos que se han logrado utilizando al tabaco como planta élite en estudios de cultivo *in vitro* lo cual la convierte en invaluable. (Ganaphati, et.al., 2004)

2.5. Formas de propagación y cultivo convencional

2.6. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* tiene como objetivo el propagar especies vegetales a partir de órganos, tejidos o células vegetales obteniendo como resultado plantas con las mismas características de la que se quiere propagar. Para el estandarizar un proceso de cultivo *in vitro* y obtener las respuestas morfológicas y fisiológicas deseadas, es necesario definir las condiciones de cultivo como la luz, temperatura, pH, o la cantidad de nutrientes que se suplementaran al medio. (Ibáñez, 2013)

En 1993 Seemann, describió que esta técnica de cultivo permite establecer una especie vegetal, obtener plantas libres de patógenos, producir metabolitos secundarios, realizar una mejora genética como la inducción de mutaciones e introducción de nuevas características, o la conservación de germoplasma.

El cultivo *in vitro* consta de 5 fases: la fase 0 es la etapa de preparación, la fase I es la etapa establecimiento, a continuación, la fase II es la etapa Multiplicación, la fase es la etapa elongación, la fase IV es la etapa enraizamiento y finalmente la fase V es la etapa aclimatación (Posada, 2005). Las fases 0, I, II, son las etapas más críticas he importantes de establecer para el cultivo *in vitro*.

Dentro de la fase de preparación es importante que el material vegetal a usarse, es decir los sean descontaminados para así asegurar la obtención de cultivos que estén libres de patógenos, para ello es necesario la estandarización de un protocolo de desinfección que permita obtener un balance entre el porcentaje de necrosamiento, contaminación y viabilidad. (Pablo-Pérez, Lagunes-Espinoza, López-Upton, Aranda-Ibáñez y Ramos-Juárez, 2015)

Una vez determinado el protocolo de desinfección del material vegetal, se procede a la Fase de establecimiento en esta es necesario determinar el medio de cultivo a utilizarse, esto dependerá de la especie vegetal de estudio, generalmente se opta por un medio Murashige-Skoog suplementado con varios reguladores de crecimiento como auxinas o citoquininas. (Rajeevan y Pandey, 1986).

La fase II o etapa de multiplicación se caracteriza por la utilización de los reguladores de crecimiento en cantidades más grandes, según Rahman, et.al, (1993), el regulador más efectivo en concentraciones entre $0.5 - 1 \text{ mg.L}^{-1}$, es el 6-BAP en conjunto con el ácido 1-naftalenacético (ANA) o el Ácido Indol-acético.

2.7. Factores que influyen en un cultivo *in vitro*

2.7.1. Temperatura

La temperatura es un factor interno actúa directamente con el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*, a la estimulación para el crecimiento de plantas en cultivo *in vitro*. La temperatura óptima de la planta depende del estado de desarrollo de la planta, ya que la planta posee características biológicas especiales que le permiten establecer su sensibilidad a la temperatura. (Manrique & Arévalo, 2015)

El tabaco se desarrolla adecuadamente a una temperatura que oscila entre los 25 a 28°C, es importante tener en cuenta cualquier tipo de variación brusca de temperatura ya que según Salisbury y Ross (1992), un aumento de temperatura es proporcional a la cantidad de O₂ cloroplástico disuelto en la planta, de este modo la fijación de oxígeno ocurrirá más rápido. Cuando la planta es sometida a altas temperaturas la fijación de CO₂ se ve afectada esto se debe a que el ATP y el NADPH⁺ no se produce lo suficientemente rápido.

2.7.2. Fotoperiodo

Un fotoperiodo es el intervalo al que se le somete a la planta, está comprendido por intervalos de luz y oscuridad al que estará expuesta la planta durante un día. Los fitocromos que son los foto-receptores de la planta, tienen la capacidad de diferenciar la duración de las fases además de identificar si la planta se encuentra expuesta a luz o a la oscuridad (Krzymuski, M, 2016).

Hay que tener en cuenta que a menos horas de luz más se acelera el crecimiento de la planta, pero se disminuye la cantidad. (Krzymuski, M, 2016). Se ha demostrado en estudios que la sensibilidad a la luz de las plantas también varía durante su desarrollo. Conforme avanzan hacia la madurez, las plantas aumentan o disminuyen su sensibilidad al fotoperiodo. (Tulecke y Thompson, 1963)

2.7.3. Fuente de carbono

En el cultivo *in vitro* es necesario agregar una fuente de carbono debido a que en su mayoría las células de los tejidos vegetales son heterotróficas, dicha fuente actuará en el potencial osmótico del medio de cultivo aumentándolo, además de servir como fuente de energía. El crecimiento, la producción de metabolitos, entre otras son procesos estimulados a partir de los azúcares que se encuentren en el medio para el cultivo *in vitro*. Debido a que la sacarosa es el carbohidrato más fácil de metabolizar por las plantas, es una de las fuentes

de carbono más usadas en concentraciones del 1 al 5% para el cultivo *in vitro*. (Troncoso, Matte, Venegas y Cantos, 1997).

2.8. Sistemas de inmersión temporal

Como alternativa para el cultivo *in vitro*, en 1983, Harris y Mason describieron al sistema de inmersión temporal como una máquina basculante que fue diseñada para lograr una inmersión temporal, utilizando el principio de la aireación en conjunto con la técnica de cultivo *in vitro* en medio líquido. Estos biorreactores difieren con respecto al tamaño del contenedor, el tipo de soporte que se utilice para el cultivo, el tipo de control que tenga el sistema ya sea completamente computarizado o un temporizador simple, si se emplea o no el uso de una bomba peristáltica, si se da o no un reciclaje del medio, y finalmente la disponibilidad de dos contenedores lo que provoca la separación o incorporación del frasco del medio con la cámara de cultivo. (Etienne y Berthouly, 2002)

Por otro lado, entre los sistemas hay características en común como que el frasco más grande cumple el papel de cámara de cultivo a diferencia del reservorio del medio que suele ser más pequeño; los recipientes de cultivo son transparentes y autoclavables para así asegurar las condiciones de cultivo como la esterilidad y fotoperiodo. Los sistemas de cultivo de inmersión temporal proporcionan un contacto programable el cual puede ser parcial o total entre el explante y el medio líquido formulado. Estos sistemas son más fáciles de usar que los biorreactores convencionales, y con la mayoría de ellos los períodos de subcultivo más largos son posibles. (Georgiev et al., 2014)

2.9. Algunos diseños de sistemas de inmersión temporal

Entre diseños empíricos de laboratorio y diseños de tipo comercial, podemos encontrar una amplia variedad, entre los que se destacan: Sistema RITA, Sistema *Twin-Flask*, Sistema *Ebb-flow*, Sistema *Thermo-Photo-Bioreactor*,

Sistema *Rocker*; Biorreactor de inmersión por burbujas, Sistema tambor giratorio, y los Sistemas de bajo costo entre los más importantes.

2.9.1. RITA[®] (*Réceptier à Immersion Temporaire Automatique*)

El sistema RITA[®] (Figura 7), consta de un solo recipiente autoclavable de polipropileno de 500 mL de capacidad, cuenta con dos compartimentos separados por una bandeja instalada con un soporte de malla y un tubo de plástico, montado en su centro. El recipiente está cerrado por una tapa de tipo tornillo equipada con puertos externos centrales y laterales en la parte superior. Ambos puertos poseen filtros de membrana que permite la esterilidad del sistema. (Steingroewer, et.al., 2013).

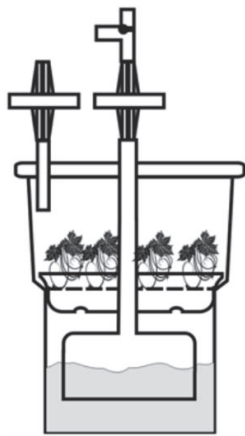


Figura 7. Sistema de inmersión temporal "RITA[®]".

Adaptado de Georgiev et al., 2014.

El sistema RITA[®] se ha utilizado con éxito en casos de estudio como en el de la micropropagación vía yemas axilares de la caña de azúcar y los bananos híbridos (*Musa sp. AAAA cv. FHIA-01* y *AAAB cv. FHIA-18*). (Posada, 2005).

2.9.2. Sistema *Twin-Flask*[®]

El sistema *Twin-Flask*[®] (Figura 8), consta de dos contenedores, los cuales tienen la función de cámara de cultivo, y tanque de almacenamiento respectivamente.

El recipiente de la cámara de cultivo en este sistema puede o no tener material de soporte para los explantes es decir una red de metal o nylon, perlas de vidrio, o espuma de poliuretano en su parte inferior. Cada contenedor tiene una conexión propia de aire a presión, que se puede controlar a partir de dos relojes temporizadores. (Arencibia, Vergara, Quiroz, y Carrasco, 2013).

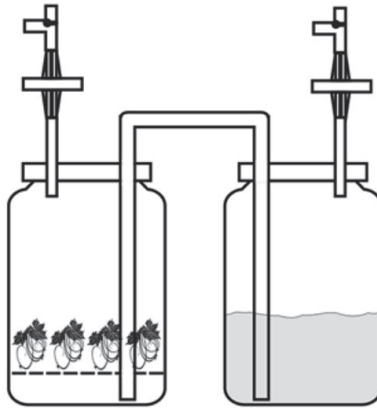


Figura 8. Sistema de inmersión temporal “Twin-Flask[®]”.

Adaptado de Georgiev et al., 2014.

Los sistemas *Twin-Flask[®]* se han aplicado con éxito en la propagación de plantas, plántulas, brotes, agrupamiento de nódulos y cultivos de embriones de cacao (*Theobroma cacao*) (Niemenak, Saare-Surminski, Rohsius, Omokolo y Lieberei, 2008).

2.9.3. Sistema *Ebb-Flow[®]*

El sistema “Ebb-Flow[®]” (Figura 9) consta de dos recipientes que se encuentran interconectados entre sí. El recipiente que cumple la función de cámara de cultivo, cuenta con un soporte de espuma de poliuretano que permite que se mantenga la suficiente humedad entre 85-90% para que los explantes se desarrollen de manera adecuada durante todo el cultivo. Por otro lado, y como es usual en los otros tipos sistemas de inmersión temporal el otro recipiente cumple el papel de reservorio del medio de cultivo la característica principal es que es más pequeño que el de la cámara de cultivo. (George, et.al.; 2008)

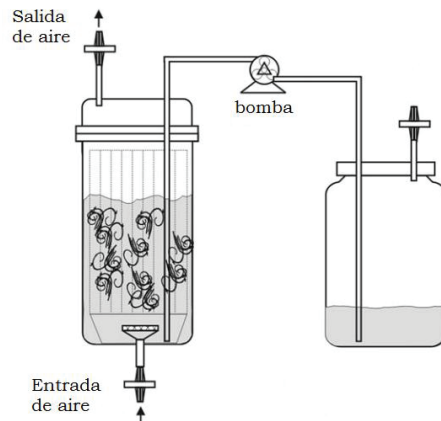


Figura 9. Sistema de inmersión temporal “Ebb-Flow[®]”.

Adaptado de Georgiev et al., 2014.

Recientemente, los sistemas *Ebb-Flow*[®] se han utilizado en trabajos de investigación sobre la acumulación de metabolitos secundarios por cultivos in vitro diferenciados de Happy tree (*Camptotheca acuminata*) (Sankar, et.al., 2011).

2.9.4. Sistema *Thermo-Photo-Bioreactor*[®]

El sistema *Thermo-Photo-Bioreactor*[®] (Figura 10), consta de dos recipientes de vidrio que se encuentran interconectados con tubos de acero inoxidable. El contenedor superior cumple la función de cámara de cultivo. El sistema posee una camisa de agua que permite un control preciso de la temperatura, además está equipado con una fuente integrada de luz UV que se encuentra en la tapa superior. Dentro de la cámara de cultivo se encuentra una malla de acero inoxidable que sirve para dar soporte al material vegetal. (Georgiev et al., 2014).

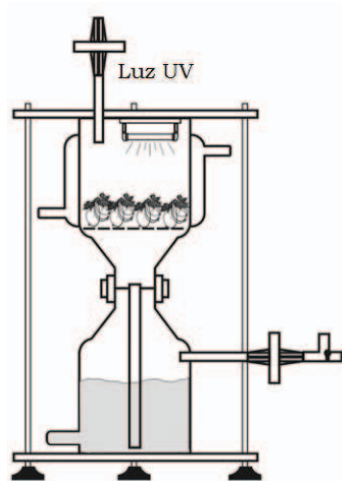


Figura 10. Sistema de inmersión temporal “*Thermo-Photo-Bioreactor*®”. Adaptado de Georgiev et al., 2014.

El sistema *Thermo-Photo-Bioreactor* ha sido ocupado con éxito como método alternativo para el cultivo y la micropropagación masiva de Césped Antártico (*Deschampsia antártica*) *in vitro* (Navarro, et.al., 2011).

2.9.5. Sistema *Rocker*®

El sistema *Rocker*® (Figura 11), consta de dos contenedores en forma rectangular de policarbonato transparente autoclavable en la parte lateral posee una abertura ancha que se cierra con un tapón de rosca que posee en el interior una membrana como filtro. Luego de la siembra, los contenedores se pueden colocar apilados en la plataforma mecánica. El funcionamiento de la estructura se basa en inclinaciones que crean pequeños frentes de onda y así sumerge los explantes. (Uchendu, et.al.; 2011)

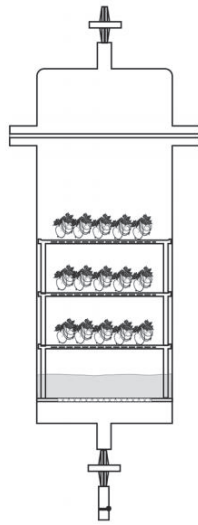


Figura 12. Sistema de inmersión temporal “BIB®”.

Adaptado de Georgiev et al., 2014.

Un estudio reciente demostró que este sistema permite un mejor crecimiento y mayor cantidad de brotes por explante, mediante un estudio comparativo con el RITA en la propagación de *Melaleuca alternifolia* y *Oncidium leucochilum*. (Scheidt, et.al., 2011).

2.9.7. Sistema tambor giratorio

El sistema Tambor giratorio (Figura 13), consiste una botella que puede ser de vidrio o plástico autoclavable, dentro de la misma se encuentra una red de acero inoxidable o espuma de poliuretano que sirve para sostener los explantes y una estructura en forma de rodillo. La estructura gira a una determinada velocidad, y los explantes se sumergen periódicamente. (Reís, et.al.; 2011)

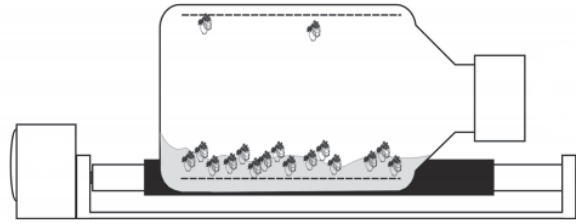


Figura 13. Sistema de inmersión temporal “Tambor giratorio”.

Adaptado de Georgiev et al., 2014.

Como caso exitoso de uso de este sistema se encuentra el establecimiento del cultivo de raíz adventicia de la especie (*Stevia rebaudiana*), en el cual el uso de este sistema permitió que el cultivo de las plantas sea más homogéneo. (Reis, et.al., 2011).

2.10. Factores que influyen en el cultivo de un sistema de inmersión temporal

2.10.1. Frecuencia y Tiempo de inmersión

El tiempo de inmersión es importante, especialmente en la fase de multiplicación, pues es un proceso determinante que los explantes reciban los nutrientes necesarios para crecer de manera adecuada. Asimismo, esta variable no debe ser variada en rangos altos, ya que se puede convertir en un problema para los explantes provocando hiperhidricidad en los mismos lo cual resultaría en la muerte de los mismos. (Ventura et al., 2002)

Los tiempos de inmersión utilizados en los SIT varían considerablemente, debido a la gran variedad de especies. Los tiempos de inmersión largos 1 h cada 6 h fueron eficaces para la tuberización de la papa, mientras que los tiempos de inmersión muy cortos 1 min cada 12 h estimularon la producción de embriones somáticos de *C. arabica*, como se puede observar en la Figura 14 y el crecimiento de los explantes en la Figura 15 (Etienne et al., 1997).

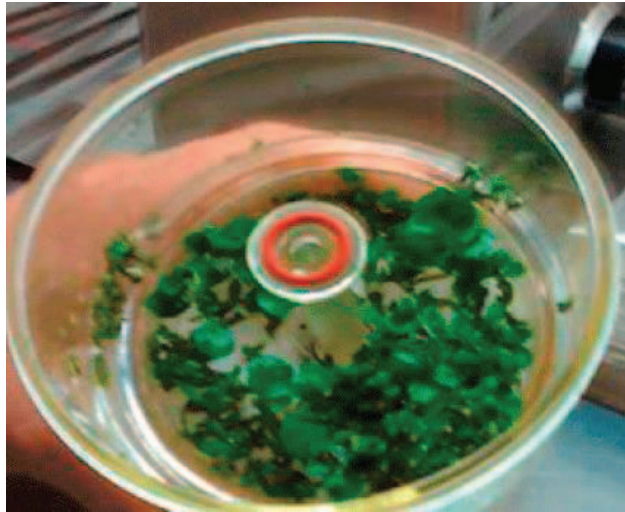


Figura 14. Producción de embriones somáticos de *C. arabica*.
Adaptado de Etienne et al., (1997).



Figura 15. Crecimiento de explantes de *C. arabica*.
Adaptado de Etienne et al., (1997).

2.10.2. Volumen de medio de cultivo

El volumen del medio líquido debe optimizarse dependiendo de los sistemas de inmersión a utilizarse, por ejemplo, en sistemas como el RITA o Twin Flasks, según Lorenzo et al. (1998), el volumen óptimo de medio por explante es de 40 mL para *Saccharum spp*, en el Sistema Twin Flask, pero en el sistema RITA es de 50 mL por explante. El aumento del volumen de medio de cultivo permite

una mejor multiplicación, sin embargo, no afecta en la longitud de los brotes formados.

2.11. Diseño experimental

Descrito en el año 1946 por Plackett y Burman (Figura 16), el diseño factorial Plackett-Burman tuvo como objetivo encontrar diseños experimentales que demuestren a partir de niveles como algunas variables muestran dependencia de otras, con el fin de que la varianza entre las dependencias disminuya, se utiliza una matriz la cual arrojará un número limitado de experimentos. (Plackett y Burman, 1946)

Este diseño es utilizado en las primeras etapas de un experimento ya que permite analizar varias variables al mismo tiempo, además permite determinar si las variables independientes tienen o no efecto sobre la variable respuesta. Al final es necesario realizar un diagrama de Pareto, para así lograr establecer cuáles de las variables dentro del estudio son significativas. (Palacios, 2008)

		Factors						
		f ₁	f ₂	f ₃	f ₄	f ₅	f ₆	f ₇
Test	1	1	1	1	-1	1	-1	-1
	2	-1	1	1	1	-1	1	-1
	3	-1	-1	1	1	1	-1	1
	4	1	-1	-1	1	1	1	-1
	5	-1	1	-1	-1	1	1	1
	6	1	-1	1	-1	-1	1	1
	7	1	1	-1	1	-1	-1	1
	8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Figura 16. Ejemplo de matriz de combinaciones de un diseño factorial Plackett-Burman con 7 variables independientes (Columnas de la A-B) con dos niveles de variación (+, -) y 8 tratamientos (Filas 1-8)

Adaptado de (Mesa, Romero, y Cruz, 2002)

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

Este trabajo consta de 3 fases para la especie de estudio *Nicotiana tabacum*. En primer lugar, la fase de establecimiento de material vegetal estéril mediante un diseño completamente al azar; en segundo lugar, la de identificación de las variables significativas mediante un diseño factorial Plackett-Burman para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, y finalmente la de identificación de las variables significativas mediante un diseño factorial Plackett-Burman para la multiplicación del cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*.

3.1. Hipótesis

H₀: No existe diferencia significativa entre los tratamientos planteados es decir $p > 0.05$.

H₁: Si existe diferencia significativa entre los tratamientos planteados es decir $p > 0.05$.

3.2. Fase I: Establecimiento de material vegetal estéril

En la primera etapa, se implementó un diseño experimental completamente al azar (DCA), para estandarizar el proceso de desinfección de las semillas de *Nicotiana tabacum*. Para esto se varió el tiempo de exposición ante las soluciones de Hipoclorito de sodio y Etanol para cada tratamiento.

Se realizó 4 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, modificando el tiempo de exposición ante las soluciones de hipoclorito de sodio y Etanol entre cada tratamiento. Se evaluó como variables dependientes el porcentaje de contaminación bacteriana y fúngica, el porcentaje de necrosamiento todo a los 7 y 14 días después de la siembra y el porcentaje de viabilidad.

3.3. Fase II: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para el establecimiento de *Nicotiana tabacum*.

Para la identificación de las variables significativas se utilizó un diseño factorial Plackett-Burman, el mismo cuenta con 8 tratamientos cada uno con dos niveles de variación (Plackett y Burman, 1946). (Tabla 2). Las variables independientes son la concentración de citoquininas, temperatura, concentración de sacarosa, concentración de sales, tiempo de subcultivo, concentración de citoquininas y pH en el medio de cultivo. (Tabla 1)

Las condiciones constantes para los tratamientos serán el fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Como variable dependiente se analizarán: velocidad de crecimiento en relación a la longitud de brotes.

Tabla 1.

Variables utilizadas para el diseño de Plackett-Burman.

Factor	Nombre del factor	-	+	Unidades
A	Citoquinina (6-BAP)	1	1.5	mg.L ⁻¹
B	Azúcar	15	30	g.L ⁻¹
C	Temperatura	22	25	°C
D	Concentración de sales	0,5	1	X
E	Ph	5.6	5.8	-
F	Tiempo subcultivo	14	21	Días
G	Auxina (ANA)	0.5	1	mg.L ⁻¹

Nota: Variables independientes (A, B, C, D, E, F y G) para los tratamientos en el SIT con la variedad *Nicotiana tabacum*, para el diseño factorial Plackett-Burman con dos niveles (un valor máximo y uno mínimo de concentración de las diferentes variables). Se realizarán 2 réplicas biológicas con 3 repeticiones por tratamiento con cuatro explantes en cada uno.

Tabla 1.

Matriz codificada del diseño experimental Plackett-Burman.

	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+

8	-	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: Tratamientos codificados del diseño factorial Plackett-Burman en relación a los 7 factores.

3.4. Fase III: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para la multiplicación de *Nicotiana tabacum*.

Para la identificación de las variables significativas se utilizó un diseño factorial Plackett-Burman, el mismo cuenta con 8 tratamientos cada uno con dos niveles de variación (Plackett y Burman, 1946). (Tabla 4). Las variables independientes son la concentración de citoquininas, temperatura, concentración de sacarosa, concentración de sales, tiempo de subcultivo, concentración de citoquininas y pH en el medio de cultivo. (Tabla 3)

Las condiciones constantes para los tratamientos serán el fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Como variable dependiente se analizará: velocidad de multiplicación en relación al número de brotes.

Tabla 3.

Variables utilizadas para el diseño de Plackett-Burman

Factor	Nombre del factor	-	+	Unidades
A	Citoquinina (6-BAP)	0.5	1	mg.L ⁻¹
B	Azúcar	15	30	g.L ⁻¹
C	Temperatura	22	25	°C
D	Concentración de sales	0,5	1	X
E	pH	5.6	5.8	-
F	Tiempo subcultivo	10	15	Días

G	Auxina (AIA)	1	1.5	mg.L ⁻¹
---	--------------	---	-----	--------------------

Nota: Variables independientes (A, B, C, D, E, F y G) para los tratamientos en el SIT con la variedad *Nicotiana tabacum*, para el diseño factorial Plackett-Burman con dos niveles (un valor máximo y uno mínimo de concentración de las diferentes variables). Se realizarán 2 réplicas biológicas con 3 repeticiones por tratamiento con cuatro explantes en cada uno

Tabla 4.

Matriz codificada del diseño experimental Plackett-Burman.

	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Nota: Tratamientos codificados del diseño factorial Plackett-Burman en relación a los 7 factores.

3.5. Diagrama de Flujo

A continuación, la figura 17 muestra un diagrama de flujo sobre el proceso general de cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*, con miras al desarrollo de un diseño de sistema de inmersión temporal tipo reloj de arena.

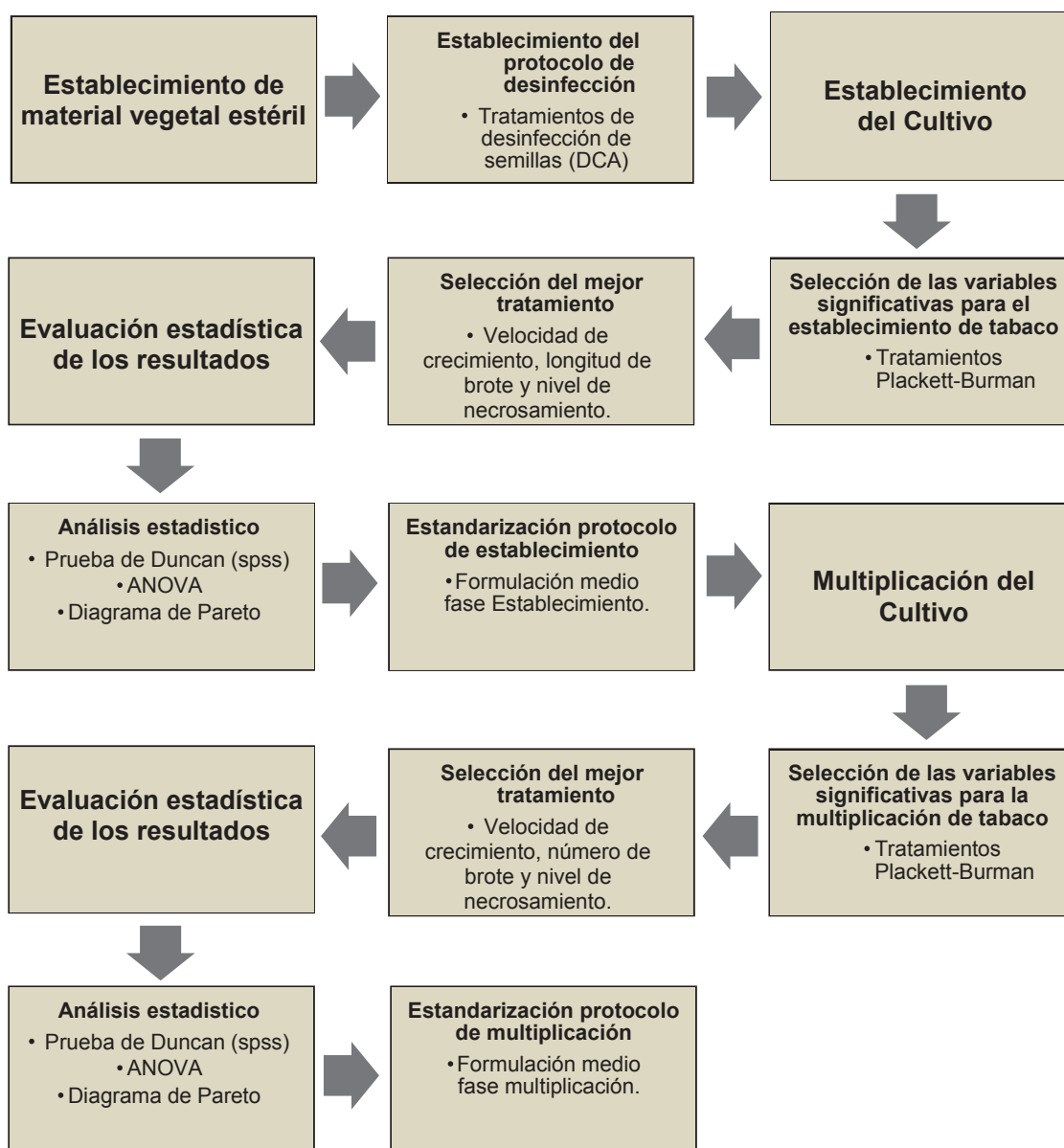


Figura 17. Diagrama de flujo de multiplicación *in vitro* de *Nicotiana tabacum*

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y muestra

Las semillas de tabaco se obtuvieron como donación de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento para el Control del Agro (AGROCALIDAD), situado en la parroquia de Tumbaco, en la ciudad de Quito, provincia de Pichincha. Las mismas se llevaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Américas (LQ34), para que se puedan secar durante 3 días. A continuación, se escogieron las mejores para someterlas al proceso de siembra.

4.2. Obtención de los explantes

Para la obtención de explantes de tabaco, se sembró las semillas en medio MS Basal, luego se estandarizo los protocolos para Establecimiento, y Multiplicación para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum*.

4.2.1. Desinfección

Se prepararon las soluciones de Etanol al 70% y de hipoclorito de sodio comercial al 20%; dentro de la cámara de flujo se sumergieron las semillas dentro de un tubo microtubo de 1.5 mL con 1 mL de solución de hipoclorito de sodio comercial durante 5 minutos o 3 minutos respectivamente dependiendo del tratamiento; se retiró la mayor cantidad de hipoclorito de sodio comercial dejando las semillas en 100 μ L de solución. A continuación, se sumergieron las semillas dentro del microtubo de 1.5 mL con 1 mL de solución de Etanol durante 5 minutos o 3 minutos respectivamente dependiendo del tratamiento. Se retiró la mayor cantidad de Etanol dejando las semillas en 100 μ L de solución. Finalmente, se realizaron tres lavados con 1 mL agua destilada estéril durante 5 minutos, el último paso se repitió 3 veces. Los tratamientos usados se detallan en la tabla 5.

Tabla 5.

Tratamientos para la desinfección de semillas de Nicotiana tabacum

	Tipo	Cantidad
1	Hipoclorito de sodio 20%	5 min
	Etanol 70%	5 min
2	Hipoclorito de sodio 20%	3 min
	Etanol 70%	5 min
3	Hipoclorito de sodio 20%	5 min
	Etanol 70%	3 min
4	Hipoclorito de sodio 20%	3 min
	Etanol 70%	3 min

Nota: Tratamientos para la desinfección de semillas de *Nicotiana tabacum*.

4.2.2. Siembra de semillas y obtención de explantes

En los frascos estériles con medio de cultivo basal formulado según Murashige, T y Skoog (1962) como se observa en la Tabla 6, se colocaron 4 semillas por frasco; y se incubaron a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas oscuridad.

Tabla 6.

Formulación de medios de Siembra para cultivo in vitro de Nicotiana tabacum.

	Fase	Compuesto	Cantidad x L
1	Siembra	Macroelementos 1x	100 mL
		Microelementos 1x	10 mL

		Hierro 1x	10 mL
		Agar	7 g
		Sacarosa	30 g
		Ph	5.8

Nota: Cantidades de reactivos en la formulación de medio para el cultivo de semillas de *Nicotiana tabacum*.

Una vez transcurrido 14 días, se realizó la identificación del grado de necrosamiento de las semillas mediante la tabla 7.

Tabla 7.

Grados de necrosamiento según escala Nozak

	Grado	Descripción
1	0	no hubo oxidación
2	1	Incipiente coloración sin llegar a la necrosis.
3	2	25% de tejido necrótico
4	3	50% de tejido necrótico.
5	4	75% de tejido necrótico.
6	5	100% de tejido necrótico.

Fuente: *Adaptada de Nozak, et.al, 1994*

Nota: Niveles de identificación de necrosamiento para cultivo *in vitro*.

A partir de una tabulación de los datos obtenidos luego del conteo de frascos contaminados se evaluó el porcentaje de contaminación y con el conteo de los frascos viables se evaluó el porcentaje de viabilidad en frascos. día⁻¹, esto a partir de las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de Contaminación (Nº frascos. día}^{-1}\text{)} = \frac{c_f - c_i}{t_f - t_i} * 100$$

Dónde:

Cf: Número de frascos contaminados (14 días)

Ci: Número de frascos totales (1 día)

tf: Tiempo final (14 días)

ti: Tiempo inicial (1 día)

Ecuación 1. Porcentaje de Contaminación

Adaptado de Imani, et.al, 2010

$$\text{Porcentaje de Viabilidad (N}^\circ \text{ frascos. día}^{-1}) = \frac{V_f - V_i}{t_f - t_i} * 100$$

Dónde:

Vf: Número de frascos viables (14 días)

Vi: Número de frascos totales (1 día)

tf: Tiempo final (14 días)

ti: Tiempo inicial (1 día)

Ecuación 2. Porcentaje de Viabilidad

Adaptado de Imani, et.al, 2010

4.3. Etapa de Identificación de variables significativas

4.3.1. Establecimiento cultivo *in vitro* en medio sólido

Para la fase de establecimiento en medio sólido; se realizaron los medios de cultivo que se detallan en la tabla 8 – Capítulo V.

Según el método modificado de Pérez-Rodríguez, et.al., (2016) para el establecimiento de los explantes, se preparó la cantidad necesaria de medio MS basal para una concentración final de trabajo 1X o 0.5X, la cual se suplementó con ANA 0,5mg/mL o 1mg/mL, y 6-BAP 1 mg.L⁻¹ o 1.5 mg.L⁻¹, se colocaron 30 g.L⁻¹ o 15 g.L⁻¹ de Sacarosa; y se ajustó el pH a 5,6 o 5,8; según corresponda cada tratamiento. A todos los tratamientos se colocaron 7 g.L⁻¹ de Agar; en cada frasco se dispensaron 20 mL y se autoclavaron a 15 libras de presión y 121 ° C por 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo de cada tratamiento es decir 14 o 21 días respectivamente; se evaluó mediante la tabulación de la medición manual de la altitud de los explantes y se determinó la velocidad de crecimiento en cm. día⁻¹ mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de crecimiento (cm. día}^{-1}\text{)} = \frac{Wf - Wi}{tf - ti}$$

Dónde:

Wf: Altitud en cm en el tiempo final (7 días) y (14 días)

Wi: Altitud en cm en el tiempo inicial (1 día)

tf: Tiempo final (7 días) y (14 días)

ti: Tiempo inicial (1 día)

Adaptado de Imani, et.al, 2010

4.3.2. Multiplicación de cultivo *in vitro* en medio sólido

Para la fase de multiplicación en medio sólido; se realizaron los medios de cultivo que se detallan en la tabla 10 – Capitulo V.

Según el método modificado de Saucedo, et.al., (2008) para la multiplicación de los explantes, se preparó la cantidad necesaria de medio MS basal para una concentración final de trabajo 1X o 0.5X, la cual se suplementó con 6-BAP 0,5 mg.L⁻¹ o 1 mg.L⁻¹, y AIA 1mg.L⁻¹ o 1.5 mg.L⁻¹, se colocaron 30 g.L⁻¹ o 15 g.L⁻¹ de Sacarosa; y se ajustó el pH a 5,6 o 5,8; según corresponda cada tratamiento. A todos los tratamientos se colocaron 7 g.L⁻¹ de Agar; en cada frasco se dispensaron 20 mL y se autoclavaron a 15 libras de presión y 121 ° C por 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo de cada tratamiento es decir 10 Y 15 días respectivamente; se evaluó mediante la tabulación de la medición manual de la altitud de los explantes para determinar la tasa de crecimiento en N° de brotes. día⁻¹ mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de multiplicación (N° brotes. día}^{-1}\text{)} = \frac{W_f - W_i}{t_f - t_i}$$

Dónde:

Mf: Número de brotes en el tiempo final (10 días) y (15 días)

Mi: Número de brotes en el tiempo inicial (1 día)

tf: Tiempo final (10 días) y (15 días)

ti: Tiempo inicial (1 día)

Modificado de Imani, et.al, 2010

4.4. Evaluación estadística de los resultados

Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos realizados en el establecimiento del cultivo *in vitro* y la multiplicación del cultivo *in vitro*, además de una prueba de contraste de medias de Duncan para establecer cuál es el mejor tratamiento, finalmente se realizó un diagrama de Pareto para establecer que variables del diseño experimental Plackett-Burman, son más influyentes en el cultivo de tabaco.

5. Capítulo V. Resultados y discusión

5.1. Fase I: Establecimiento de material vegetal estéril

5.1.1. Porcentaje de contaminación

En la fase de desinfección se realizaron cuatro tratamientos en los cuales se varió el tiempo de inmersión en las soluciones de etanol 70% y de Hipoclorito de sodio 20% de cloro. Las barras en la figura 18 representan los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica de yemas axilares y hojas de *Nicotiana tabacum* a los 14 días de siembra en medio MS basal, con su respectiva

desviación estándar. Los resultados reflejan que, a los 14 días de evaluación, el tratamiento 1 tuvo el menor porcentaje de contaminación, con un 8,3% de contaminación bacteriana y 8,3% de contaminación fúngica.

Por otro lado, el tratamiento 4 presentó el mayor porcentaje de contaminación bacteriana (Figura 18B) con un 41,7% y 20,8% de contaminación fúngica. Los tratamientos 2 y 3 presentaron un porcentaje menor de contaminación en relación al tratamiento 4, con un 25% de contaminación bacteriana y 12,5% de contaminación fúngica para el tratamiento 3 y 29,2% de contaminación bacteriana y 16,7% de contaminación fúngica (Figura 18A) para el Tratamiento 2.

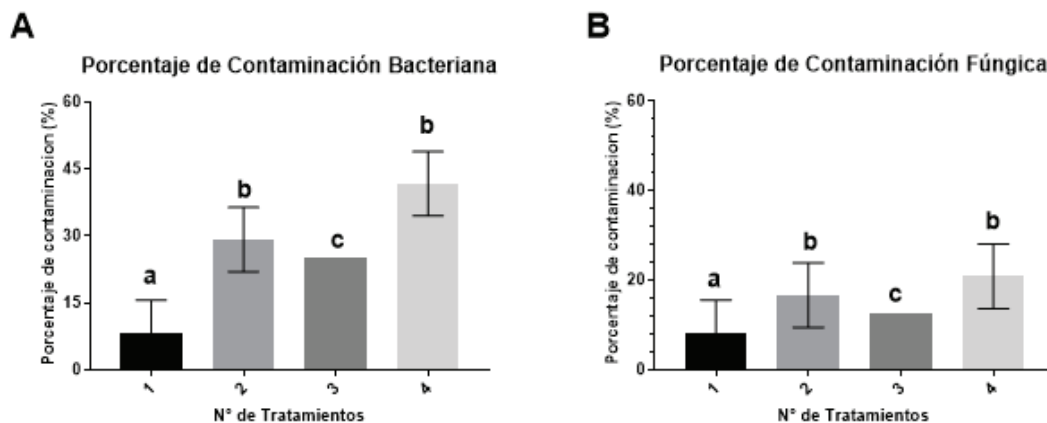


Figura 18. Porcentaje de Contaminación bacteriana y fúngica en *Nicotiana tabacum* a los 14 días de siembra.

Nota: (A) Contaminación bacteriana, (B) Contaminación fúngica.

Tratamiento 1: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 2: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 3: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 4: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%.

Los resultados en la Figura 19 indican una diferencia significativa en cuanto a la contaminación total entre los cuatro tratamientos en *Nicotiana tabacum*. El tratamiento con una mayor diferencia significativa fue el número 4, el cual presentó el valor más alto de contaminación (62,5%) en comparación con los otros tratamientos. El tratamiento 2 también presentó un nivel alto de

contaminación (41.7%) y los tratamientos con un porcentaje bajo de contaminación total fueron el 1 y 3 con 16,7% y 37,5% respectivamente.

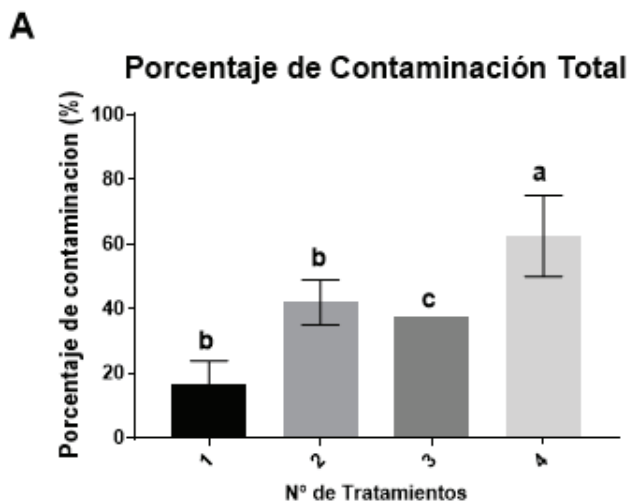


Figura 19. Porcentaje de Contaminación total en *Nicotiana tabacum* a los 14 días de siembra.

Nota: Tratamiento 1: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 2: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 3: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 4: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%.

Los resultados del análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan indican que existe una diferencia significativa entre los tratamientos con el hipoclorito de sodio y el etanol a diferentes tiempos de inmersión sobre los porcentajes de contaminación de *Nicotiana tabacum*.

En la fase de desinfección de semillas se obtuvieron los menores porcentajes de contaminación mientras mayor es el tiempo de inmersión de los dos compuestos. Se determinó que el tratamiento 1 presentó el menor porcentaje de contaminación total, con 16.9%. Esto debido a que el hipoclorito de sodio actúa como un agente desinfectante superficial, el cual es letal para la mayoría de microorganismos ya sean virus, hongos y bacterias vegetativas. (Ibañez, Roselló y Del Amo, 2013).

La contaminación fúngica en esta etapa fue principalmente contaminación introducida, es decir, contaminación resultante de una mala desinfección del área de trabajo y los materiales como pinzas y bisturí (Ponmurugan y Kumar, 2012), o por contaminantes internos del explante los cuales sobreviven a la desinfección inicial del material apareciendo así en etapas posteriores del cultivo (Stewart y Kane, 2006) como se observa en la Figura 20A.

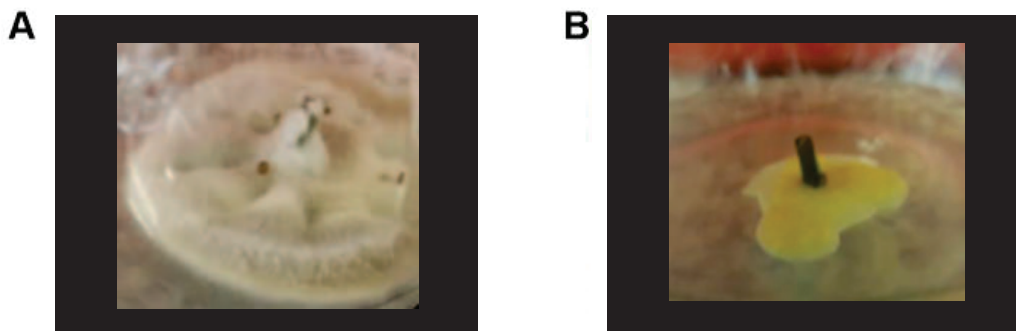


Figura 20. Contaminación bacteriana y fúngica en *Nicotiana tabacum* a los 14 días de siembra.

Nota: (A) Contaminación bacteriana (Tratamiento 4: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%).

(B) Contaminación fúngica (Tratamiento 2: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%)

La elección de un buen método de esterilización para el material vegetal es fundamental y para eso es necesario seguir ciertos principios entre ellos la elección del agente esterilizante y la duración del mismo deben ser siempre en relación a la planta de estudio, también hay que tener en cuenta que la superficie a esterilizarse debe estar mojada por completo y que al final del proceso siempre el desinfectante debe eliminarse de la superficie del material lavándolo con agua destilada estéril. (Tuleke & Thompson, 1963) En este caso se utilizó hipoclorito de sodio el cual, según García y colaboradores, 2009; es el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores que obtuvo buenos resultados en cuanto a la desinfección para el cultivo in vitro variando el tiempo y las concentraciones.

En este caso la variación de tiempo de inmersión en el desinfectante provocó tratamientos prácticamente libres, de contaminación con un porcentaje relativamente alto de germinación. Sin embargo, para obtener cultivos sin contaminación en su totalidad se podría usar soluciones más fuertes, teniendo en cuenta que altas concentraciones podrían desencadenar niveles altos de necrosamiento y disminuir el porcentaje de viabilidad del cultivo.

La estandarización del método de desinfección tiene como objetivo la obtención de semillas libre de contaminación y transferibles. Fred, et.al., 2002 hizo énfasis en el proceso de lavado del desinfectante argumentando que se transfiera con la semilla una cantidad suficiente del desinfectante para asegurar la acción antiséptica durante la germinación de la semilla en agar, pero las bacterias pueden desarrollarse más tarde, cuando la semilla se transfiere al cultivo final, lo cual en este caso podría relacionarse con el tratamiento 2 que se observa en la figura 20B, la cual luego de 14 días de cultivo presentó contaminación bacteriana.

El tratamiento 4 presentó la mayor cantidad de contaminación bacteriana y fúngica, esto podría deberse a la estructura de la semilla de tabaco las mismas según Grover, et.al., 2015, son muy pequeñas y rugosas, la superficie es reticulada y la cubierta protectora de la semilla tiene una epidermis prominente; además las finas paredes exteriores se doblan hacia adentro en la madurez lo que provoca una apariencia reticulada de la semilla como se observa en la figura 21, esto podría estar imposibilitando que la desinfección sea la adecuada debido a que el desinfectante usado no pudo penetrar por completo en las hendiduras prominentes de la semilla, a diferencia de otros casos de semillas que se producen en vainas, o frutos sólidos las cuales en la mayoría cuentan con estructuras lisas lo cual los vuelve relativamente simple de obtener libres de contaminación, como por ejemplo semillas de rábano, tomate y varias cucurbitáceas. (Duggar y Davis, 1919)

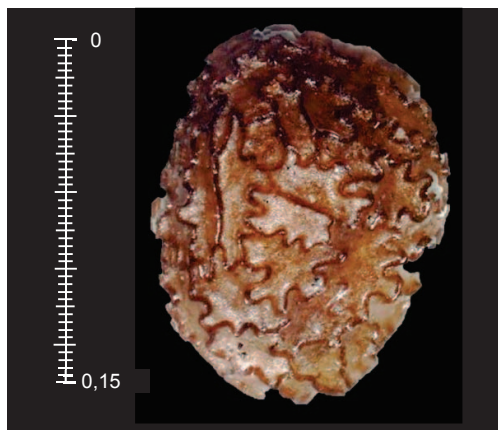


Figura 21. Semilla de *Nicotiana tabacum* vista microscópica. Adaptado de (Mesa, Romero, y Cruz, 2002)

Se puede asumir además que al no adicionar la cantidad necesaria de un detergente pudo ser una de las causas de aparición de contaminación en el 2014 Brandl y Huynh, describió que el detergente es importante para permitir un mejor contacto del desinfectante con la superficie vegetal, este actúa reduciendo la unión bacteriana a la superficie vegetal e inhibir la formación de biofilm, debido a que rompe la tensión superficial, usualmente se adiciona Tween 20 u 80 para realizar esto.

5.1.2. Porcentaje de viabilidad

Para el porcentaje de viabilidad se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan del porcentaje de viabilidad (frascos no necrosados o contaminados) de los cuatro tratamientos de desinfección. Las barras de la figura 22 indican los porcentajes de viabilidad que presentan los cuatro tratamientos cada tratamiento se encuentra graficado con su respectiva desviación estándar. Los resultados determinaron que el tratamiento 1 y 3 presentaron el mayor porcentaje de viabilidad con 83.3% y 62.5% respectivamente, mientras que el tratamiento 2 y 4 tienen el menor porcentaje de viabilidad con 58% y 37.5%

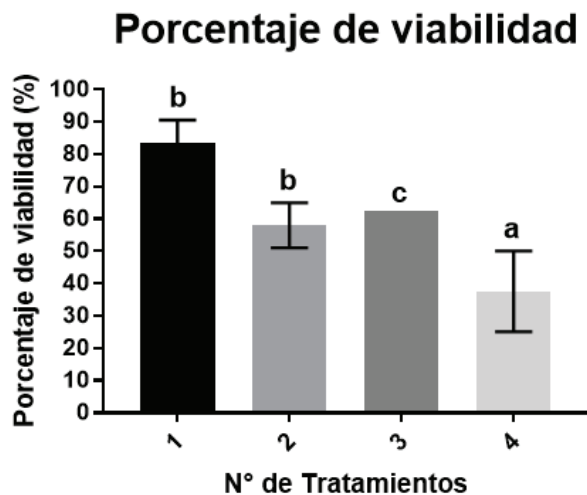


Figura 22. Porcentaje de viabilidad en *Nicotiana tabacum* a los 21 días de siembra.

Nota: Tratamiento 1: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 2: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 3: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 4: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan, determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que se observan en el planteamiento del diseño experimental. Se determinó que el tratamiento 1 es el tratamiento de desinfección más eficiente para las semillas de tabaco, con un 83.3% de frascos cultivados supervivientes (Figura 23). Esto se puede deber a que el efecto del desinfectante fue óptimo frente a la contaminación bacteriana y fúngica al someterse a un tiempo de inmersión de 5 minutos en conjunto del hipoclorito de sodio al 20% con el etanol al 70%.



Figura 23. Planta viable de *Nicotiana tabacum* a los 21 días de siembra (Tratamiento 1: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%)

La fase más importante que afecta a la capacidad de regeneración del explante y a la viabilidad del cultivo es el proceso de desinfección superficial, hay que tener en cuenta que además de la concentración y el período de inmersión, la temperatura a la que se encuentra al momento de estar en contacto el hipoclorito de sodio con el explante es importante, ya que esto también puede afectar a la germinación de semillas in vitro (Yildiz & Er, 2002). Este compuesto a pesar de ser muy factible presenta problemas al momento de estandarizar un protocolo de desinfección ya que puede ser perjudicial para las células vegetales en altas concentraciones, mientras que es ineficaz en bajas concentraciones.

En general, los porcentajes de viabilidad son altos pero según Jorquera, M, (2007), para obtener un mayor porcentaje de plantas viables, se sugiere el uso de soluciones fungicidas o de antibióticos, para así lograr una desinfección óptima.

5.1.3. Nivel de Necrosamiento

El grado de necrosamiento se puede observar en la Figura 24, en este caso se puede asumir que al utilizar una misma concentración del desinfectante el grado de necrosis es similar en la mayoría de los tratamientos con un grado según la escala de Nozak de 1 es decir una incipiente coloración sin llegar a la necrosis. El tratamiento 4 presentó una diferencia significativa en comparación con los otros tratamientos, ya que no presentó necrosis en ninguna de sus repeticiones.

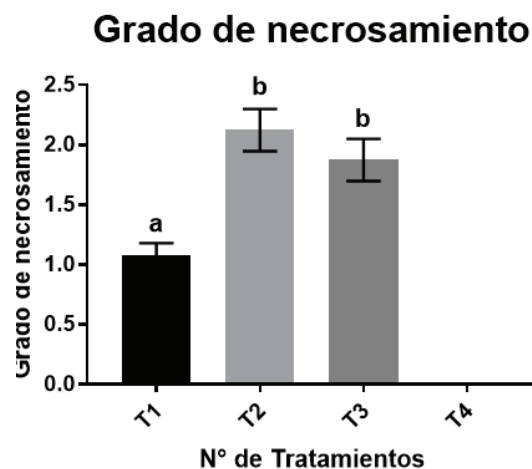


Figura 24. Grado de necrosamiento del cultivo de semillas de *Nicotiana tabacum* a los 14 días de siembra.

Nota: Tratamiento 1: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 2: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 5 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 3: 5 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%

Tratamiento 4: 3 minutos en Hipoclorito de sodio 20% + 3 minutos en EtOH 70%.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan, determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que se observan en el planteamiento del diseño experimental.

Por lo general, el hipoclorito de sodio está disponible en soluciones desde concentraciones del 5.25% siendo efectivo para ciertas especies el tiempo de inmersión varía entre 5 a 30 minutos (Tuleke & Thompson, 1963). En este caso se utilizó una solución de hipoclorito de sodio al 20% lo cual podría provocar la necrosis de los tratamientos 1, 2 y 3. Para evitar esto es necesario realizar de manera adecuada los lavados con agua destilada estéril para eliminar todo el desinfectante sobrante, es recomendable realizar de 3 a 5 lavados con agua destilada estéril.

Gashaw, et.al., 2014 en base al estudio de Duggar y Davis en 1919 realizaron un protocolo de desinfección de semillas de tabaco, en el cual realizaron tratamientos con intervalos de 12 y 13 minutos los cuales resultaron inadecuados, a diferencia de un intervalo de 10 minutos, aunque este tratamiento resultó en una contaminación de menos del 2 por ciento cuando se sembraron 12 placas de aproximadamente 30 semillas cada una, a pesar de un bajo nivel de contaminación se pudo observar un alto porcentaje de necrosis alrededor del 60% por lo cual no es muy factible el uso de estas concentraciones.

Existen otras consecuencias ante el uso de desinfectantes como el hipoclorito de sodio, por ejemplo, a nivel molecular este compuesto es conocido como un agente bactericida que induce al daño de polinucleótidos, ARN, y ADN. (Hawkins y Davies, 2002). Esto se corrobora con el estudio realizado por Phe, Dossot, Guilloteau y Block (2007), en el que se observó una interferencia entre la interacción química de hipoclorito y las células de *Nicotiana tabacum*, que resultó en un deterioro de la de las células expuestas a esta sustancia con una concentración de $3 \mu\text{molL}^{-1}$. (Hussain et.al., 2006)

En relación a los tratamientos realizados se podría determinar que son factibles ya que tienen equilibrio en cuanto al porcentaje de contaminación, y el necrosamiento, obteniendo un algo porcentaje de viabilidad.

5.2. Fase II: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para el establecimiento de *Nicotiana tabacum*.

5.2.1. Velocidad de crecimiento

En la fase de establecimiento de *Nicotiana tabacum* y basándose en el diseño factorial Plackett-Burman que se observa en la tabla 8, se realizaron 8 tratamientos con 7 variables. En la figura 25 se puede observar la altitud de los explantes por tratamiento después del cultivo en los medios evaluados. Las barras indican que el tratamiento T3 presentó una mayor altitud a los 21 días de cultivo con un promedio de (4,75 cm) seguido del tratamiento T5 con un promedio de (4,3 cm) y el tratamiento T6 con un promedio de (3,5 cm). Los tratamientos restantes fueron los menos eficientes, el T7 con un promedio de (2,58 cm), T4 con un promedio de (2,42 cm), T1 con un promedio de (2,3 cm), T8 con un promedio de (2,25 cm) y finalmente el tratamiento T2 que presentó la menor altitud con un promedio de (1,83 cm).

Tabla 8.

Matriz decodificada del diseño experimental Plackett-Burman.

	A	B	C	D	E	F	G
1	1,5 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	22°C	1x	5,6	21d	1 mg.L ⁻¹
2	1,5 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	22°C	0,5x	5,8	14d	1 mg.L ⁻¹
3	1,5 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	25°C	0,5x	5,6	21d	0,5 mg.L ⁻¹
4	1 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	25°C	1x	5,6	14d	1 mg.L ⁻¹
5	1,5 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	25°C	1x	5,8	14d	0,5 mg.L ⁻¹
6	1 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	22°C	1x	5,8	21d	0,5 mg.L ⁻¹
7	1 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	25°C	0,5x	5,8	21d	1 mg.L ⁻¹
8	1 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	22°C	0,5x	5,6	14d	0,5 mg.L ⁻¹

Nota: Tratamientos decodificados del diseño factorial Plackett-Burman en relación a los 7 factores.

Fase de Establecimiento

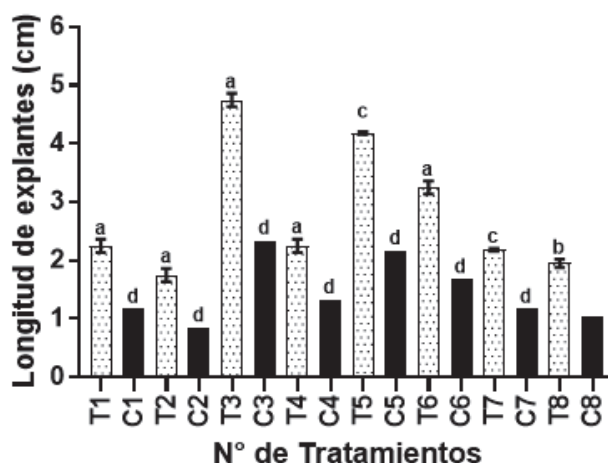


Figura 25. Velocidad de crecimiento (cm) de cada uno de los 8 tratamientos del diseño experimental Plackett-Burman en *Nicotiana tabacum*.

Nota: T1: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo y 1 mg.L⁻¹ de ANA.

C1: 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo

T2: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo y 1 mg.L⁻¹ de ANA.

C2: 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo

T3: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

C3: 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo

T4: 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo y 1 mg.L⁻¹ de ANA.

C4: 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo

T5: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

C5: 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo

T6: 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 21 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

C6: 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 21 días de cultivo

T7: 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,8 + 21 días de cultivo y 1 mg.L⁻¹ de ANA.

C7: 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,8 + 21 días de cultivo

T8: 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

C8: 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan, determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que se observan en el planteamiento del diseño experimental.

Los tratamientos con las mejores velocidades totales de crecimiento fueron el 3 y el 5 con $0,37 \text{ cm.día}^{-1}$, y $0,33 \text{ cm. día}^{-1}$, respectivamente, lo cual se puede comprobar estadísticamente en la Figura 25 y de manera cualitativa en la (Figura 26 A, B) en la que se puede observar la diferencia entre las longitudes de *Nicotiana tabacum*. Además, el tratamiento 2 obtuvo la menor velocidad de crecimiento de $0,14 \text{ cm.día}^{-1}$, de igual manera se puede comprobar estadísticamente en la Figura 30 y de manera cualitativa en la (Figura 26 C).

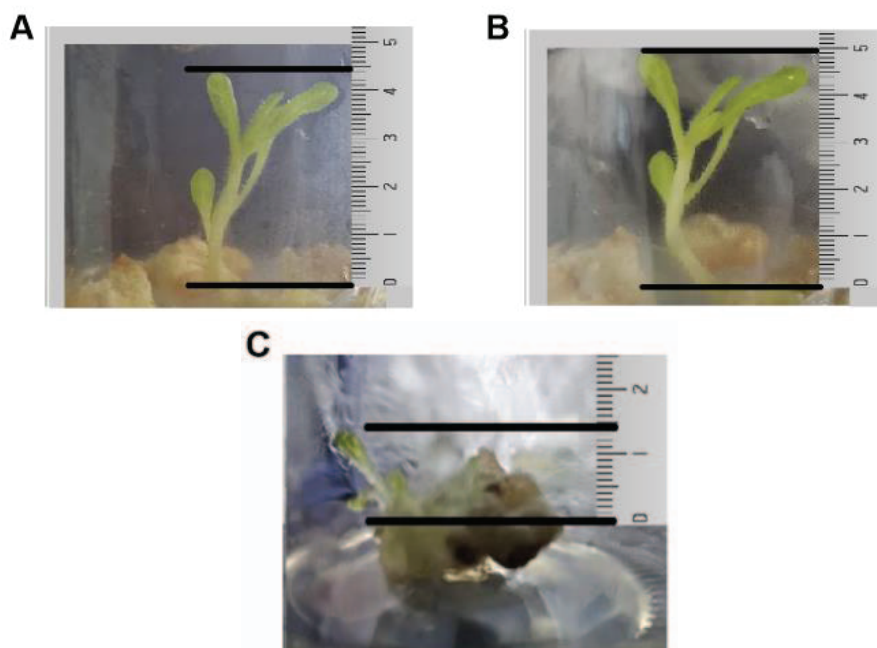


Figura 26. Establecimiento de *Nicotiana tabacum* a los 21 días de siembra.

Nota: (A) T5: $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP + 15 g.L^{-1} Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.

(B) T3: $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP + 30 g.L^{-1} Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.

(C) T8: 1 mg.L^{-1} de 6-BAP + 15 g.L^{-1} Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo y $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.

A pesar de que el tratamiento 5 tuvo una mejor velocidad de crecimiento en relación al tiempo de subcultivo, estadísticamente el tratamiento 3 es el mejor tratamiento con una concentración de 6-BAP ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), esta hormona tiene como función el estimular la división celular del tejido vegetal. Según Shimelis, et.al., (2014), la citoquinina más usada en el cultivo *in vitro*, debido a su efectividad es la 6-BAP, ya que actúa directamente en la mitosis de las células.

Se recomienda que la concentración de citoquininas no sea muy alta ya que la misma podría resultar tóxico para la planta (Villanueva, F et al., 2013).

Según el estudio de Azcon-Bieto y Talon, (1993) realizado en tabaco, se demostró que mientras en los tratamientos exista una concentración alta de auxinas se producía un incremento en la formación de raíces. Por otro lado, una alta concentración de citoquininas producía un incremento en la formación de tallos. En este caso al utilizar los dos compuestos provocó una alta velocidad de crecimiento de *Nicotiana tabacum*.

La citoquinina 6- Bencilaminopurina permite la supresión de la dominancia apical, la formación de nuevos órganos, la inhibición de la senescencia de las hojas, además de la apertura de estomas (Mok y Mok, 2001). En este caso el tratamiento 3 con una concentración de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP, permitió el crecimiento de los brotes de manera más rápida en comparación a los demás tratamientos.

Por otro lado, según el estudio de Mesa et al. (2002), no se observó influencia al someter al cultivo a diferentes concentraciones de 6-BAP en cuanto al porcentaje de brotes totales formados, se concluyó que las mejores concentraciones de 6-BAP son 5 y 7 mg/L para el cultivo de *Leucaena leucocephala*. A diferencia de dicho estudio para el cultivo de *Nicotiana tabacum* se pudo observar que la mejor concentración de 6-BAP fue menor y si fue significativa para el cultivo, para lo cual se puede deducir que al ser

diferente la respuesta de cada genotipo a los requerimientos hormonales, ya que la especie de estudio es diferente, además de que las condiciones de cultivo a las que fueron sometidos los explantes como concentración de sacarosa, temperatura, entre otros, afectaron directamente al cultivo.

El tratamiento 3 tiene una concentración de sacarosa de 30 g.L⁻¹, resultando que a mayor concentración de este compuesto se obtiene mejores resultados en cuanto al establecimiento del cultivo *in vitro*, esto puede deberse a la posible presencia de enzimas que se asocian con la sacarosa,

Según Imani, Qhrmanzadeh, Azimi, y Janpoor (2010), en otras especies vegetales se ha determinado que la sacarosa en cuanto sea más alta su concentración en este caso 60 g.L⁻¹, produce un mayor crecimiento y un mayor peso de microtubérculos en el cultivo de *Solanum tuberosum*. Esto se corrobora con el otro estudio en el que demostraron que la máxima inducción del tubérculo fue a 90 g.L⁻¹ de sacarosa. (Hussain et.al., 2006). Es uno de los estímulos más importantes que influye directamente en el cultivo *in vitro*, además es de los más usados como fuente de carbono, ya que además de ser un agente barato, es seguro, y da buenos resultados en cuanto a la micropropagación (Miherehtu, F., et.al., 2013).

También se estudió el efecto de la concentración de sacarosa, en el cultivo de *Citrus assamensis*, en el cual la formación de brotes era óptima cuando el medio se suplemento con 30 g.L⁻¹ o 40 g.L⁻¹ sacarosa. (Yaacob, J., 2013). Esto demuestra que la concentración del tratamiento 3 puede ser aplicable a otras especies vegetales resultando en un cultivo óptimo.

Sin embargo, existen estudios que demuestran que el uso de altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo también puede provocar una disminución de la capacidad fotosintética de las plantas, lo cual en contraste con otros estudios en los que se realizaron cultivos sin azúcar, se

observaron tasas fotosintéticas mejoradas al compararlo con plantas cultivadas en medios suplementados con sacarosa. (Fuentes et al., 2005).

Según Rejšková et al., 2007, las altas concentraciones de sacarosa también pueden limitar el crecimiento, esto debido al incremento del potencial osmótico que produce la sacarosa en el medio. Dichos estudios a pesar de ser comprobados no pueden influir en cuanto a la respuesta obtenida en este trabajo debido a que dichos estudios fueron realizados en otras especies vegetales, y cada especie debe ser sometida a diferentes condiciones para así lograr su crecimiento y desarrollo óptimo. En este caso la adición de sacarosa dio como resultado la aceleración de la división celular aumentando el volumen del explante.

5.2.2. Identificación de variables significativas para el establecimiento *in vitro* de *Nicotiana tabacum*.

Para la identificación de las variables significativas en el establecimiento de *Nicotiana tabacum* se realizó un diagrama de Pareto el cual muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados o estadísticos t que prueban que la hipótesis nula tiene un efecto de 0. De acuerdo a las variables establecidas en la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman (tablas 2 y 3 - capítulo III.), se realizó el análisis estadístico con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). Dando como resultado que las variables más influyentes estadísticamente en el nivel de 0.05 con los términos del modelo actual, son el 6-bencilaminopurina (6-BAP) y la Sacarosa ya que cruzan la línea de referencia. Estos datos fueron obtenidos mediante el programa estadístico Minitab 18.

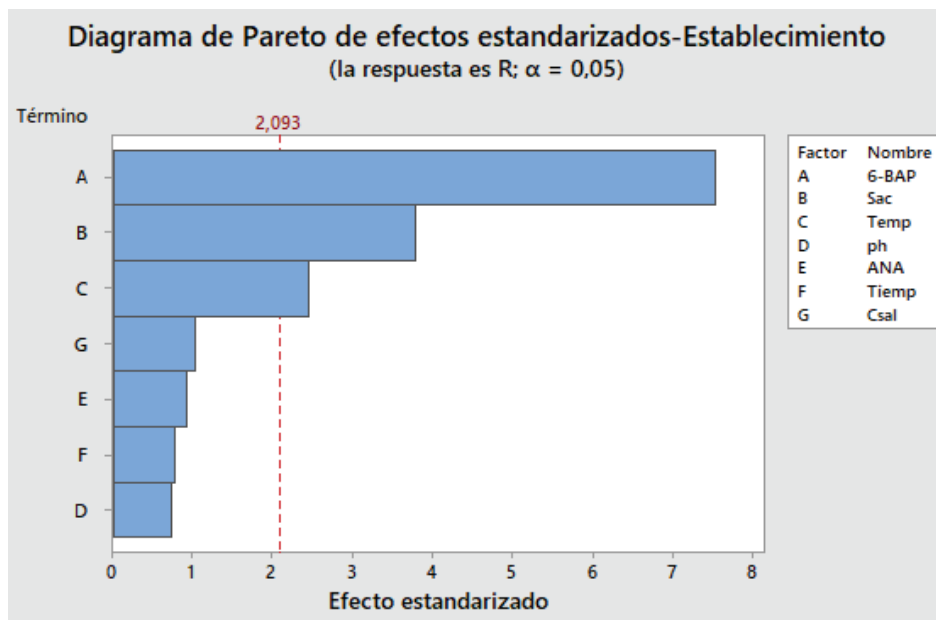


Figura 27. Diagrama de Pareto de efectos significativos para el establecimiento de “*Nicotiana tabacum*” con cada una de las variables planteadas en el diseño factorial de Plackett-Burman.

Nota: (A): 6-bencilaminopurina (6-BAP) – 1,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹. (B): Sacarosa – 30 g.L⁻¹ y 15 g.L⁻¹. (C): Temperatura – 25 y 22 ° C. (D): pH – 5.8 y 5.6. (E): Ácido 1-naftalenacético (ANA) – 1 mg.L⁻¹ y 0,5 mg.L⁻¹. (F): Tiempo de cultivo – 14 y 21 días. (G): Sales MS – 1 y 0,5 X

En el cultivo *in vitro* los reguladores del crecimiento vegetal son los componentes más importantes, que afectan a la capacidad de multiplicación de los brotes (Ozcan, Yildiz, Sancak y Ozgen, 1996). En estudios anteriores ya se han evaluado el efecto de distintas concentraciones de sacarosa debido a que esta fuente de carbono es de las más utilizadas para el cultivo *in vitro*. (Borges, Malaurie, Portales, y Calzadillas, 2008).

En este estudio y en relación a la figura 27 en la que se observa que la sacarosa es una de las variables más significativas, se puede relacionar con el estudio realizado por Yaacob, J., et.al., (2013), que menciona que el tamaño del brote se reduce a medida que la concentración de sacarosa aumenta, esta ausencia de crecimiento podría deberse a un efecto del nivel super-óptimo de sacarosa que resulta en una condición osmótica desfavorable para la planta en

cuanto a la captación de agua, por lo cual hay que tener mucho cuidado en cuanto a la concentración de sacarosa que se usa en el medio de cultivo

Relacionando las figuras 25 y 26 con la velocidad de crecimiento y teniendo en cuenta el diagrama de Pareto de la figura 27 se puede determinar que el mejor medio para el establecimiento es el que se observa en la (Tabla 9), para esto se tomaron los valores del mejor tratamiento que resulto del diseño experimental Plackett-Burman, teniendo en cuenta que las cantidades de 6-BAP y sacarosa son las más importantes para el cultivo de *Nicotiana tabacum*.

Tabla 9.

Formulación de medio de Establecimiento para cultivo in vitro de Nicotiana tabacum.

	Fase	Compuesto	Cantidad x L
1	Establecimiento	Macroelementos 1x	100 mL
		Microelementos 1x	10 mL
		Hierro 1x	10 mL
		6-BAP (1,5 mg.L ⁻¹)	1 mL
		ANA (1 mg.L ⁻¹)	0.25 mL
		Agar	7 g
		Sacarosa	30 g
		pH	5.8

Nota: Cantidades de reactivos en la formulación de medio para el establecimiento *in vitro* de *Nicotiana tabacum*

5.3. Fase III: Identificación de variables significativas con un diseño Plackett-Burman para la multiplicación de *Nicotiana tabacum*.

5.3.1. Tasa promedio del número de brotes por tratamiento

En la fase de multiplicación de *Nicotiana tabacum* y basándose en el diseño factorial Plackett-Burman que se observa en las tabla 10, se realizaron 8

tratamientos con 7 variables, en la figura 28 se puede observar el número de brotes por tratamiento después del cultivo en los medios evaluados. Las barras indican que el tratamiento T4 presentó mayor número de brotes a los 10 días de cultivo con un promedio de (11,5 brotes) seguido del tratamiento T1 con un promedio de (7,75 brotes) y el tratamiento T6 con un promedio de (4,33 brotes). Los tratamientos restantes fueron los menos eficientes, el T2 con un promedio de (2,67 brotes), T3 con un promedio de (2,5 brotes), T5 con un promedio de (2,31 brotes), T7 con un promedio de (2,25 brotes) y finalmente el tratamiento T8 que presentó la menor altitud con un promedio de (1,75 brotes).

Tabla 10.

Matriz decodificada del diseño experimental Plackett-Burman.

Columna1	A	B	C	D	E	F	G
1	1 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	22°C	1x	5,6	15d	1,5 mg.L ⁻¹
2	1 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	22°C	0,5x	5,8	10d	1,5 mg.L ⁻¹
3	1 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	25°C	0,5x	5,6	15d	1 mg.L ⁻¹
4	0,5 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	25°C	1x	5,6	10d	1,5 mg.L ⁻¹
5	1 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	25°C	1x	5,8	10d	1 mg.L ⁻¹
6	0,5 mg.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	22°C	1x	5,8	15d	1 mg.L ⁻¹
7	0,5 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	25°C	0,5x	5,8	15d	1,5 mg.L ⁻¹
8	0,5 mg.L ⁻¹	15 g.L ⁻¹	22°C	0,5x	5,6	10d	1 mg.L ⁻¹

Nota: Tratamientos decodificados del diseño factorial Plackett-Burman en relación a los 7 factores.

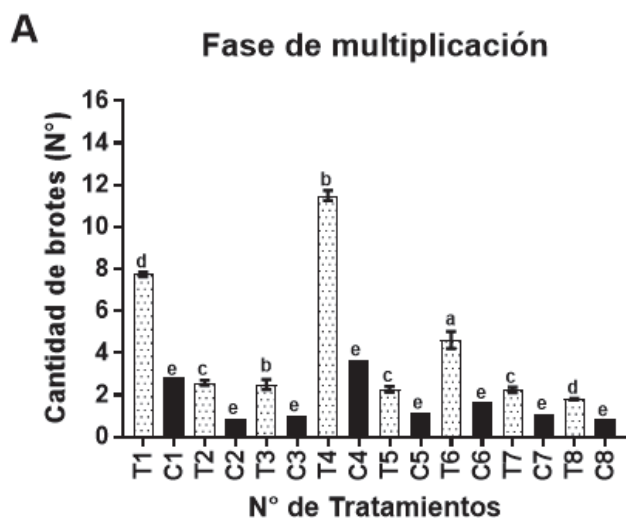


Figura 28. Cantidad de brotes (N° de brotes) de cada uno de los 8 tratamientos del diseño experimental Plackett-Burman en “*Nicotiana tabacum*”.

Nota: T1:1 mg.L⁻¹ 6-BAP+15 g.L⁻¹ Sacarosa+22°C+1X sales+pH: 5,6 +15 d. cultivo+1,5 mg.L⁻¹ AIA.

C1:15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 15 d. cultivo

T2:1 mg.L⁻¹ 6-BAP+30 g.L⁻¹ Sacarosa+22°C+0,5X sales+pH: 5,8+10 d. cultivo+1,5 mg.L⁻¹ AIA.

C2:30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,8 + 10 días de cultivo

T3:1 mg.L⁻¹ 6-BAP+30 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+0,5X sales+pH: 5,6 +15 d. cultivo+1 mg.L⁻¹ AIA.

C3:30 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+0,5X sales MS+pH: 5,6 + 15 d. cultivo

T4:0,5 mg.L⁻¹ 6-BAP+30 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+1X sales+pH: 5,6+ 10 d. cultivo+1,5 mg.L⁻¹ AIA.

C4:30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 10 d. cultivo

T5:1 mg.L⁻¹ 6-BAP+15 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+1X sales+pH: 5,8+10 d. cultivo+1 mg.L⁻¹ AIA.

C5:15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 10 d. cultivo

T6:0,5 mg.L⁻¹ 6-BAP+30 g.L⁻¹ Sacarosa+22°C+1X sales+pH: 5,8+15 d. cultivo+1 mg.L⁻¹ AIA.

C6:30 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 15 d. cultivo

T7:0,5 mg.L⁻¹ 6-BAP+15 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+0,5X sales+pH: 5,8+15 d. cultivo+1,5 mg.L⁻¹ AIA.

C7:15 g.L⁻¹ Sacarosa+25°C+0,5X sales+pH: 5,8+15 d. cultivo

T8:0,5 mg.L⁻¹ 6-BAP+15 g.L⁻¹ Sacarosa+22°C+0,5X sales+pH: 5,6+10 d. cultivo+1 mg.L⁻¹ AIA.

C8:15 g.L⁻¹ Sacarosa+22°C+0,5X sales+pH: 5,6+10 d. cultivo.

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de Duncan, determinó que si existe diferencia significativa entre los tratamientos con lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que se observan en el planteamiento del diseño experimental.

Los resultados de las figuras 29A, 29B y 29C se puede observar la diferencia entre los números de brotes de *Nicotiana tabacum* en los diferentes tratamientos, para el tratamiento T4 se observó una tasa de multiplicación de 0,88 N° brotes.día⁻¹, seguido del tratamiento T1 el cual obtuvo una tasa de multiplicación de 0.6 N° brotes.día⁻¹, y finalmente el tratamiento T8 el cual obtuvo la menor tasa de multiplicación de 0.13 N° brotes.día⁻¹. Por lo tanto, el mejor tratamiento en comparación con los otros tratamientos es el T4 con 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 10 días de cultivo y 1,5 mg.L⁻¹ de AIA.

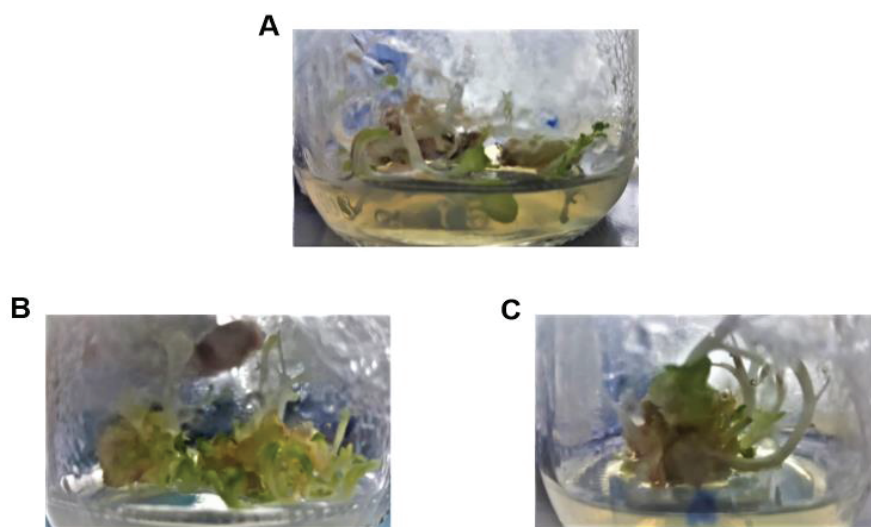


Figura 29. Multiplicación de “*Nicotiana tabacum*” a los 14 o 21 días de siembra.

Nota: (A) T5: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,8 + 14 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA., (B) T3: 1,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 30 g.L⁻¹ Sacarosa + 25°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 21 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA., y (C) T8: 1 mg.L⁻¹ de 6-BAP + 15 g.L⁻¹ Sacarosa + 22°C + 0,5X sales MS + pH: 5,6 + 14 días de cultivo y 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

En 1975 Saunders y Bingham, las concentraciones altas de citoquininas en combinación con concentraciones bajas de auxina inducen a la elongación de las células, lo que promueve al desarrollo de brotes. Esto podría explicar lo que sucedió en el tratamiento 4, el cual contiene $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP + 30 g.L^{-1} Sacarosa + 25°C + 1X sales MS + pH: 5,6 + 10 días de cultivo y $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA. Hay que tener cuidado en cuanto la formulación de medios ya que si se coloca concentraciones de hormonas que no lleguen al equilibrio se puede interrumpir la síntesis proteica para la división celular, inhibiendo así la multiplicación de brotes.

Según el estudio de Basail, et.al., (2006), la combinación de AIA y 6-BAP entre los tratamientos a varias concentraciones, se observó un mejor resultado con la combinación de 2.0 mg. L^{-1} y 0.65 mg. L^{-1} respectivamente, ya que se produjo una disminución del grado de oxidación, y un incremento en la altura de los brotes de *Nicotiana tabacum*. Este estudio tiene una relación directa en cuanto al uso de una concentración alta de auxina y una concentración baja de citoquina como es el caso de tratamiento 4.

La combinación de 6-BAP y AIA tiene influencia significativa en la multiplicación de brotes frente a otros tratamientos y al control al que no se le aplicó ninguna hormona de crecimiento. (Canchignia, F., et.al., 2007). La tasa de multiplicación según Bidwell (1993), se relaciona con las hormonas directamente ya que estas en conjunto provocan la estimulación acelerada de brotes.

A pesar de que el estudio de Attia et al., 2012, en el que las citoquininas en combinación con concentraciones bajas de auxina promovieron al desarrollo de múltiples brotes, mediante la elongación de las células. González et al., 1999, demostró que ante altas concentraciones de auxina en el medio de cultivo se produce una interferencia para la multiplicación de brotes, esto se debe a que las auxinas mantienen la dominancia apical de las células, alejándose hacia la base de la planta, resultando en la inhibición de brotes axilares.

A diferencia del presente estudio en el que se pudo observar que la combinación de las hormonas promovió a la multiplicación de brotes de *Nicotiana tabacum*, concluyendo que no se produjo ninguna interferencia sobre la dominancia apical de la planta. La concentración óptima por otro lado fue similar a la propuesta en 1991 por Krikorian de 0.5 a 1 mg.L⁻¹, quien además recomienda usarla siempre en presencia de ácido indolacético a niveles entre 0.1 y 1 mg.L⁻¹, para así potenciar su eficacia.

5.3.2. Identificación de variables significativas para la multiplicación *in vitro* de *Nicotiana tabacum*

Para la identificación de las variables significativas en la multiplicación de *Nicotiana tabacum* se realizó un diagrama de Pareto el cual muestra los valores absolutos de los efectos estandarizados o estadísticos t que prueban que la hipótesis nula tiene un efecto de 0. De acuerdo a las variables establecidas en la matriz del diseño experimental de Plackett-Burman (tablas 5 y 6 - capítulo III.), se realizó el análisis estadístico con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 5\%$). Dando como resultado que las variables más influyentes estadísticamente en el nivel de 0.05 con los términos del modelo actual, son el 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el Ácido Indolacético (AIA) ya que cruzan la línea de referencia. Estos datos fueron obtenidos mediante el programa estadístico Minitab 18.

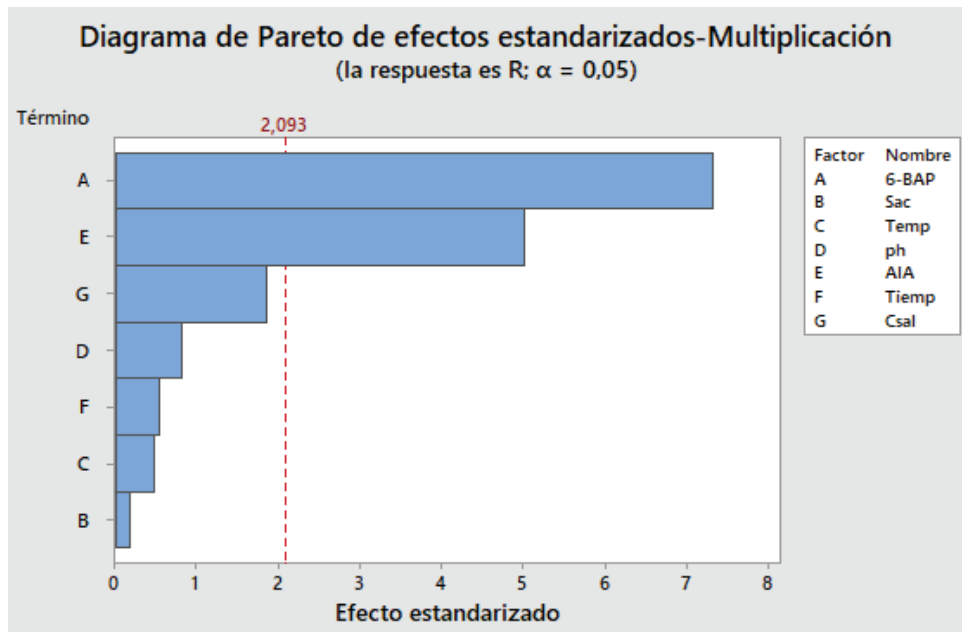


Figura 30. Diagrama de Pareto de efectos significativos para la multiplicación de “*Nicotiana tabacum*” con cada una de las variables planteadas en el diseño factorial de Plackett-Burman.

Nota: (A): 6-bencilaminopurina (6-BAP) – 1 mg.L⁻¹ y 0,5 mg.L⁻¹. (B): Sacarosa – 30 g.L⁻¹ y 15 g.L⁻¹. (C): Temperatura – 25 y 22 ° C. (D): pH – 5.8 y 5.6. (E): Ácido Indolacético (AIA) – 1,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹. (F): Tiempo de cultivo – 10 y 15 días. (G): Sales MS – 1 y 0,5 X

Independientemente de las concentraciones y combinaciones de las variables, según Sudha y Seení (1993), cuando se usa citoquininas en altas concentraciones es posible la aparición de oscurecimiento seguido de necrosis de los cultivos, esta respuesta letal se puede erradicar con el uso de una auxina puede ser (ANA o AIA), teniendo siempre en cuenta el equilibrio entre las concentraciones de dichas hormonas.

Según Cano, C., et.al., (2004), las citoquininas y auxinas juegan un papel importante en las fases de multiplicación y enraizamiento, dentro del cultivo in vitro, en este caso es lo que se observa en la figura 30.

Relacionando las figuras 28 y 29 con la tasa de multiplicación y teniendo en cuenta el diagrama de Pareto de la figura 30 se puede determinar que el mejor

medio para la multiplicación de *Nicotiana tabacum* es el que se observa en la (Tabla 11), para esto se tomaron los valores del mejor tratamiento que resulto del diseño experimental Plackett-Burman, teniendo en cuenta que las cantidades de 6-BAP y AIA son las más importantes para el cultivo de *Nicotiana tabacum*.

Tabla 11.

Formulación de medio de Multiplicación para cultivo in vitro de Nicotiana tabacum.

	Fase	Compuesto	Cantidad x L
1	Multiplicación	Macroelementos 1x	100 mL
		Microelementos 1x	10 mL
		Hierro 1x	10 mL
		6-BAP (0,5 mg.L ⁻¹)	0.35 mL
		AIA (1,5 mg.L ⁻¹)	1 mL
		Agar	7 g
		Sacarosa	30 g
		pH	5.8

Nota: Cantidades de reactivos en la formulación de medio para la multiplicación in vitro de *Nicotiana tabacum*.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Se estableció un protocolo de desinfección de semillas para *Nicotiana tabacum*, mediante el cual se obtuvo un 83.3% de explantes viables. El mejor tratamiento de desinfección fue el tratamiento 1, compuesto por una concentración de hipoclorito de sodio al 20% v/v con un tiempo de inmersión de 5 minutos + Etanol al 70%.

Se identificaron las variables significativas para el establecimiento *in vitro* de *Nicotiana tabacum*. Estas variables son: la sacarosa, debido a que ayuda a la planta con el incremento de su capacidad fotosintética y la citoquinina 6-bencilaminopurina (6-BAP) la cual a partir de la síntesis de proteínas promueve a la división celular. La concentración óptima de sacarosa fue de 30 g.L⁻¹ y la de 6-BAP fue de 1 mg.L⁻¹

La combinación entre las concentraciones de reguladores de crecimiento, concentraciones de sales inorgánicas, pH, temperatura y concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo del tratamiento T3, tuvieron una acción directa en la velocidad de crecimiento de los brotes con un desarrollo de 0,38 cm. día⁻¹.

Se identificaron las variables significativas para la multiplicación *in vitro* de *Nicotiana tabacum*. Estas variables son: la citoquinina 6-bencilaminopurina (6-BAP) la cual a partir de la síntesis de proteínas promueve a la división celular y la auxina sintética Ácido Indol-acético (AIA) la cual es la más relevante en relación al resto de auxinas en cuanto a cantidad y actividad, influyendo en el crecimiento ya que estimula a la elongación de células. La concentración óptima de 6-BAP fue de 0,5 mg.L⁻¹, y de AIA de 1,5 mg.L⁻¹.

La combinación entre las concentraciones de reguladores de crecimiento, concentraciones de sales inorgánicas, pH, temperatura y concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo del tratamiento T4, tuvieron una acción directa en la tasa de multiplicación de brotes con un de 0,88 N° de brotes. día⁻¹.

Se determinaron las condiciones de cultivo para la micropropagación de *Nicotiana tabacum*, la combinación de las variables de estudio del diseño para el establecimiento y multiplicación permitieron identificar los medios de cultivo adecuados para el cultivo de tabaco.

6.2. Recomendaciones

Para el proceso de desinfección se recomienda el uso de una solución de antibióticos para así reducir la contaminación bacteriana por completo.

Para el establecimiento y la multiplicación de *Nicotiana tabacum* se recomienda probar con más combinaciones de concentraciones y tipos de auxinas y citoquininas para incrementar el crecimiento.

Se recomienda establecer un diseño experimental similar al del utilizado en el presente trabajo dentro de un prototipo de sistema de inmersión.

REFERENCIAS

- Acuña, R. (2009). Cómo fabricar un biorreactor artesanal para la macropropagación de brotes organogénicos de tejidos vegetales con componentes de catálogo. R ecuperado el 3 de diciembre del 2017 de http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1437
- Adelberg, J., Chen, F., Cousins, M., Rieck, J. (2007). *Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric *Curcuma longa* L. grown in vitro*. *Industrial Crops & Products*. 25(2), 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.08.004>
- Adelberg, J, Toler, J. (2004). *Comparison of Agar and an Agitated, Thin-film, Liquid System for Micropropagation of Ornamental Elephant Ears*. R ecuperado el 3 de diciembre del 2017 de <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/5/1088.abstract>
- Alvarenga, I., Pacheco, F., Torres, S., Bertolucci, S., Brasil, José. (2015). *In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 6(1), 2-8. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>
- Araújo dos Santos, D., Dadalto, F., Scatena, R., Duarte, C., Barrozo, M. (2014). *A hydrodynamic analysis of a rotating drum operating in the rolling regime*. *Chemical Engineering Research and Design*. 6(1), 2-8 <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.07.028>
- Arencibia, A., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B. (2013). *Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs)*. *Faculty of Agricultural and Forestry Sciences, Universidad Católica de Maule Chile*. 160(1), 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.010>

- Azcon-Bieto, J., Talon, M. (1993), *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Madrid: McGraw Hill. 84- 486 Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de https://books.google.com/books?id=_zC3SseYwolC&pg=PA155&lpg=PA155&dq=Fisiolog%C3%ADa+y+Bioqu%C3%ADmica+Vegetal,+Madrid:+McGraw+Hill&source=bl&ots=HoZA0iZUlx&sig=knhHk0F5A0u0srtFeUlvclSQDE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjPpqiK8NrZAhVPwFkKHenVD2YQ6AEIUjAE#v=onepage&q=Fisiolog%C3%ADa%20%20Bioqu%C3%ADmica%20Vegetal%2C%20Madrid%3A%20McGraw%20Hill&f=false
- Balogun, M., Maroya, N., Asiedu, R., Taiwo, J. (2014). *Novelty, rapidity and quality in seed yam production: the case of Temporary Inmersion Bioreactors. YIFSWA Working Paper Series. International Institute of Tropical Agriculture*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/87916/U14BkBalogunNoveltyNothomNodev.pdf?sequence=1>
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., Santos, A., Cabrera, A., Toledo, M., Páz, E., Beovidez, Y., Ortega, A., Pérez, J. (2011). Multiplicación in vitro de FHIA-25 (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba. 11(1), 27 – 31. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/205/706>
- Bello-Bello, J., Canto-Flick, A., Balam, E., Gómez, E. (2010). *Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (Capsicum chinense Jacq.) by Temporary Immersion*. *HortScience*. México. 45(7), 1093-1098. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <http://hortsci.ashspublications.org/content/45/7/1093.full>

- Beovides, Y., Milián, M., Coto, O., Rayas, A., Basail, M., Santos, A., López, J., Medero, V., Cruz, J., Ruiz, E., Rodríguez, D. (2014). Caracterización morfológica y agronómica de cultivares cubanos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362014000200006
- Bidwell, R.G.S. (1993). Fisiología Vegetal: Acción de las hormonas y Reguladores del crecimiento. Ontario, A.G.T S. A. 1(1), 598 – 619. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.010>
- Brandl, M., Huynh, S. (2014). *Effect of the Surfactant Tween 80 on the Detachment and Dispersal of Salmonella entérica Serovar Thompson Single Cells and Aggregates from Cilantro Leaves as Revealed by Image Analysis. Applied and Environmental Microbiology.* 80(16), 5037-5042. <https://doi.org/10.1128/AEM.00795-14>
- Borges, M., Malaurie, B., Portales, S., Calzadillas, D. (2008). Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación in vitro de coco (cocos nucíferas L.). Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/9196>
- Carrazana, D., Santos, A., Alderete, Y., Gálvez, D., Cupull, R., Navarro, M. et.al., 2011. *Bacteria endófitas latentes no vitropatógenas en el cultivo in vitro de Xanthosoma sagittifolium* (L. Schot). Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?jsessionid=E2BDFD41EF1BB0ECAF397A22E6033D74?request_locale=es&recordID=CU2012100048&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=

- Cabrera, M., Gómez, R., Rodríguez, S. López, J., Rayas, A., Basail, M., Santos, A., Medero, V. (2008). Multiplicación in vitro de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/9182>
- Canchignia, H., Dolores, M., Benavides, G., Saucedo, S., Carranza, M., Cevallos, O. (2007). Propagación Vegetativa de Plátano y Banano con la Aplicación de Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido Indolacético (AIA). Ciencia y Tecnología. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4045179>
- CONABIO. (2011). Tabaco. Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20892_sg7.pdf
- Ducos, J., Terrier, B., Courtois, D., Pétiard, V. (2008). *Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-008-9089-1>
- Duggar, B. M., Davis, A. (1919). *Seed Disinfection for Pure Culture Work: The Use of Hypochlorites*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 6 (2), 159-170. <https://doi.org/10.2307/2989940>
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., Borroto, C. (1999). *Pineapple (Ananas comosus L.) micropropagation in temporary immersion systems*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050653>

- Etienne, H., Bertrand, B., Montagnon, C., Bobadilla, R., Dechamp, E., Jourdan, I., Alpizar, E., Malo, E., Georget, F. (2012) *Un exemple de transfert technologique réussi en micropropagation: la multiplication de Coffea arabica par embryogenèse somatique*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=564554
- Etienne, H., Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Kluwer Academic Publishers*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015668610465>
- Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M., Berthouly, M., Teisson, C. (1997). *Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-997-0001-2>
- FAO. (2011). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Recuperado el 23 de octubre del 2017 de <http://www.fao.com/tabaco>
- Fred, E., Baldwin, I., McCoy, E. (2002) *.Root nodule bacteria and leguminous plants. Supplement to Root Nodule Bacteria and Legomunous Plants*. Recuperado el 23 de octubre del 2017 de <https://uwdc.library.wisc.edu/collections/histscitech/rootnodule/>
- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaria, J. (2005). *High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of in vitro grown coconut plantlets*.

Recuperado el 23 de octubre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10535-005-7015-6>

Gashaw, G., Alemu, T., Tesfaye, K. (2014). *Evaluation of disease incidence and severity and yield loss of finger millet varieties and mycelial growth inhibition of Pyricularia grisea isolates using biological antagonists and fungicides in vitro condition*. Recuperado el 23 de octubre del 2017 de <https://www.ajol.info/index.php/jab/article/view/111640>

Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Ilieva, M., Georgiev, M., Gocheva, T., Pavlov, A. (2012). *Galanthamine production by Leucojum aestivum L. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections*. Eng. Life Sci.12(1), 534–543. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100177>

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. (2014), *Temporary immersion systems in plant biotechnology*. Eng. Life Sci., 14(1), 607–621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>

González, J., Guardián, W. (1998). Cultivo de Tabaco Nicotiana tabacum. Nmh Carolina Fluc-Curcd Tobacco Production Guide. Recuperado el 23 de octubre del 2017 de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2495/1/cultivo%20de%20tabaco.pdf>

Gostinchar, J. (1954). El cultivo del rosal. Madrid, España.: Ministerio de la Agricultura: Publicaciones de capacitacion agricola. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1954_13.pdf

- Grover, C.E., Zhu, X., Grupp, K.K., Jareczek, J., Gallagher, J., Szadkowski, E., Seijo, J., Wendel, J. (2015). *Molecular confirmation of species status for the allopolyploid cotton species, Gossypium ekmanianum*. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10722-014-0138-x>
- Gueguim, E., Oloke, J., Lateef, A., Azanfack, R., Adeyemi, A. (2010). *Implementation details of computerized temporary immersion bioreactor (TIB): A fermentation case of Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnol. & Biotechnol, Nigeria*, 24(4), 2149-2153. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0093-4>
- Gupta, D., Ibaraki, Y. (2008). *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer: Netherlands. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://www.springer.com/us/book/9781402035944>
- Hamorski, K., Grooms-Williams, T., Husk, A., Bennet, L., Palmer, K., Matoba, N. (2013). *Efficient single tobamoviral vector-based bioproduction of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 in Nicotiana benthamiana plants and utility of VRC01 in combination microbicides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57 (1). 2016-2086. <https://doi.org/10.1128/AAC.02588-12>
- Harris, R; Mason, E. 1983. *Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media*. *Can. J. Plant Sci.* 63(1), 311-316. <https://doi.org/10.4141/cjps83-032>
- Hawkins, C., Davies, M. (2002). *Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals*. *Chem. Res. Toxicol.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11800600>

- Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (2005). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Institute for Ornamental Plant Breeding, Ahrensburg, Germany. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://www.springer.com/la/book/9781402031991>
- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Saqlan, S.M., Rashid, H. (2006). *Effect of chlorocholine chloride, sucrose and bap on in vitro tuberization in potato (solanum tuberosum L. Cv. cardinal)*. Pak. J. Bot., Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://www.pakbs.org/pjbot/>
- Ibañez, M., Roselló, J., Del Amo, J. (2013). Propagación in vitro y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Roselló (Ph. D). Universidad de Valencia. Recuperado el 02 de enero del 2018 de <http://roderic.uv.es/handle/10550/26333>.
- Imani, A.A., Qhrmanzadeh, R., Azimi, J., Janpoor, J. (2010). *The effect of various concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) and Sucrose on in vitro potato (SolanumtuberosumL.) micro tuber induction*. American Eurasian J Agric Environ Sci. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de [https://www.idosi.org/aejaes/jaes8\(4\)/14](https://www.idosi.org/aejaes/jaes8(4)/14)
- Jiménez, E., Pérez, N., de Fera, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quiala, E., Pérez, J. (1999). *Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59 (1): 19-23. <https://doi.org/10.1023/A:1006312029055>
- Kämäräinen-Karppinen, T., Virtanen, E., Rokka, V., Pirttilä, A. (2010). *Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 101(2), 245–249. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9679-7>

- Lorenzo, J., Gonzalez, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., Borroto, C. (1998). *Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion temporary immersion system. Plant Cell Tiss Org Cult.* 54(1), 197-200. <https://doi.org/10.1023/A:1006168700556>
- Mederos, S., López, I. (1991) *Control of organogenesis "in vitro" of Pistacia atlantica* Desf. Rootstock. *Acta Hort.* 289(1), 135-136. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://geoscience.net/research/002/059/002059853.php>
- Mehotra, S., Goel, M., Kukreja, A., Mishra, B. (2007). *Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology.* 6(13): 1484-1492. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57591>
- Mesa, D., Romero, A., Cruz, A. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación in vitro de la *Leucaena leucocephala* vc Perú. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/estudio-diferentes-concentraciones-bencilaminopurina-bap-micropropagacion-in-vitro-leucaena-leucocephala/id/54687165.html
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.* *Physiologia Plantarum.* 15(1), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mok, D.W.S. y Mok, M.C. (2001). *Cytokinin Metabolism and Action", en Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/journals/annu-rev-plant-physiol-plant-mol-biol/>

Mroginski, L., Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54686>

Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Omokolo, D., Lieberei, R. (2008). *Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. Plant Cell Report.* 27(1), 667-676. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>.

Ozcan, S., Yildiz, M., Sancak, C., Ozgen, M. (1996). *Adventitious shoot regeneration in sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.)*. Turk. J. Bot. 20: 497501. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>.

Palacios, S., García, M. (2008). Caracterización morfológica de 93 accesiones de Capsicum spp del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira. Acta Agronómica. 27(1), 667-676. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/9261

Pablo-Pérez, M, Lagunes-Espinoza, L., López-Upton, J., Aranda-Ibáñez, E., Ramos-Juárez, J. (2015). Composición química de especies silvestres del género Lupinus del estado de Puebla, México. Revista fitotecnia mexicana. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF0189086738> (1), 49-55.

- Phe, M., Dossot, M., Guilloteau, H., Block, J. (2005). *Nucleic acid fluorochromes and Flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria*. *WaterRes.* 39,3618–3628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.002>
- Ponmurugan, P., Kumar, K. (2012). *Applications of Plant Tissue Culture*. Daryaganj, New Delhi: New Age International Publishers. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-4321-6_23
- Posada, L. (2005). Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología Vegetal.* 5 (2), 67-69. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/447/html>
- Quiala, E., Jiménez-Tello, M., Barbón, R., Chávez, M., Feria, M., La O, M., Pérez, M. (2012). *Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in Tectona grandis L.* *Rev. colomb. biotecnol.* Colombia. 16(1), 129-136. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/44279/46045>
- Plackett, R., Burman, J. (1946). *The design of optimum multifactorial experiments*. Oxford University: *Biometrika.* 33(4), 305-325 <https://doi.org/10.2307/2332195>
- Rajeevan, M. S., Pandey, R. M. (1986). *Lateral bud culture of papaya (Carica papaya L.) for clonal propagation*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture,* 6(1),181-188. <https://doi.org/10.1007/BF00180803>

- Rejšková A, Patková L, Stodůlková E, Lipavská H (2007) *The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (Olea europaea L.) under in vitro conditions. J Plant Physiol.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436306>
- Pérez-Rodríguez, G., Torrecilla, O., Ruiz, R., Rodríguez, G., Lorente, M., Martínez, O., González, O. (2016). Efecto De La Madurez En La Crioconservación De Semillas De Nicotiana Tabacum L. Cultivos Tropicales. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000500013
- Sanchez, L., Courteaux, B., Hubert, J., Kauffmann, S., Renault, J., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S. (2012). *Rhamnolipids elicit defence responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic and necrotrophic pathogens that require different signalling pathways in Arabidopsis thaliana and highlight a central role for salicylic acid.* Plant Physiology Preview. . <https://doi.org/10.1104/pp.112.201913>
- Santos, A, Rayas, A., Beovides, Y., Lopez, J. (2010). Determinacion del tiempo, frecuencia de inmersión y número inicial de brotes, en la micropropagación de la malanga viequera (Xanthosoma sp.) en sistemas de inmersión temporal. Cuba. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2011000096>
- Saunders, J., Bingham, E. (1975). *Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of medicago sativa. American Journal of Botany.* Wisconsi. 62 (8), 850-855. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1975.tb14125.x>

- Scheidt, G., da Silva, A., de Oliveira, Y., da Luz Costa, J., Biasi, L., Soccol, C. (2011). In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. *Pak. J. Bot.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://jglobal.jst.go.jp/en/public/20090422/201302210836880608>
- Seemann, P. (1993). Utilización de técnicas de micro-propagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Universidad Austral de Chile. p. 87-145. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=1674294&pid=S0718-1620201100010001000038&lng=pt
- Sequeida, A., Tapia, E., Ortega, M., Zamora, P., Castro, A., Montes, C., Zúñiga, G., Prieto, H. (2012). Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*. Chile: 15 (4). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue4-fulltext-7>
- Sharma, Y., Bala, K., Srivastava, N., Nagar, A. (2016). *Antioxidant Activity of Polyphenolic Flavonoid of Stem of Nicotiana tabacum*. *American Journal of Drug Discovery and Development*. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://scialert.net/fulltext/?doi=ajdd.2017.25.32>
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., Pavlov, A. (2013). *Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems*. *Engineering in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1975.tb14125.x>

- Sudha, C.G., Seeni, S. (1994). *In vitro multiplication and field establishment of Adhatoda beddomei C. B. Clarke, a rare medicinal plant. Plant Cell Reports*. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00239893>
- Stewart, S., Kane, M. (2006). *Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of Habenaria macroceratitis (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid Plant. Cell. Tiss. Organ Cult.* 86:147 - 158. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100226>
- Troncoso, A., Matte, C., Venegas, M., Cantos, M. (1997). Influencia de la concentración de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "in vitro". Sevilla. 458-463 <https://doi.org/10.2225/vol15-issue4-fulltext-7>
- Tulecke, W., Thompson, B. (1963). *Plant Tissue and Organ Culture, Institute, Yonkers, New York. The American Biology Teacher.* 25(2), 90-91. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://digital.csic.es/handle/10261/66626>
- Uchendu, E., Paliyath, G., Brown, D., Saxena, P. (2011). *In vitro propagation of North American ginseng (Panax quinquefolius L). In Vitro Cell.Dev.Biol.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00239893>
- Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A., Abades, S., Cáceres, J. EFECTO DE AUXINAS Y CITOQUININAS EN EL CULTIVO DE TEJIDO DE AHNFELTIA PLICATA. *Anales Instituto Patagonia. Chile.*41 (1), 2-8 Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2011000096>

- Watt, M. (2012). *The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation*. *African Journal Biotechnology*, Ebène: 11 (76), 14025-14035. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129350/118900>
- Yaacob, J., Mahmad, N., Taha, R., Mohamed, N., Yussof, A., Saleh, A. (2014) *Optimization of Culture Conditions (Sucrose, pH, and Photoperiod for In Vitro Regeneration and Early Detection of Somaclonal Variation in Ginger Lime (Citrus assamensis)*. *The Scientific World Journal*. 1(1), 1-9. <http://doi.org/10.1155/2014/262710>
- Yildiz, M., Ekiz, H. (2014). *The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and regeneration capacity of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) hypocotyl explants* *Can. J. Plant Sci.* Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00239893>

Anexos

SALES MURASHIGE SKOOG

Tabla 12: Cantidad de reactivos (macroelementos) para medio MS.

Macroelementos	Cantidad (mg.L ⁻¹) 1X
CaCl ₂ *2H ₂ O	332
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄ *7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650

Tabla 13: Cantidad de reactivos (microelementos) para medio MS.

Microelementos	Cantidad (mg.L ⁻¹) 1X
CuSO ₄ *6H ₂ O	0.025
KI	0.83
CoCl ₂ *6H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9

