



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Julio 2012

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología

PROYECTO: BIOTECNOLOGÍA - Fortalecimiento

SUBPROYECTO: Implementación de biotecnologías en mejoramiento y producción de cultivos de importancia

ACTIVIDAD: Evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola bajo Sistemas de Inmersión Temporal (SITs)

UBICACIÓN: Provincia : Pichincha
Cantón : Mejía
Parroquia : Cutuglagua

AUTORA: Egda. Maria Augusta Piedra Burbano

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez
Dr. Eduardo Morillo

COLABORADORES: Programa Nacional de Raíces y Tubérculos

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: Julio 2012

FECHA DE TERMINACIÓN: Julio 2013

PRESUPUESTO: 6370.9 USD

FINANCIAMIENTO: INIAP: 39.01%
Tesista: 60.99%

1. ANTECEDENTES

En el Ecuador la superficie de papa cultivada es de 47.494 ha. por lo que se deduce que se usan alrededor de 71.241 t/año de semilla (1.5 t/ha) (INEC, 2003); a pesar de esto no existe una demanda efectiva de este volumen. debido a que los agricultores no acostumbran usar semillas de buena calidad procedentes de fuentes confiables sino que prefieren guardar sus propias semillas, para sembrarlas en el siguiente ciclo sin ser estas muchas veces las más óptimas para garantizar una alta producción.

En la actualidad la producción de semilla de categorías iniciales se la hace a través de plántulas *in vitro*, generando muchas de las veces pérdidas de material vegetal por el difícil manejo de estas en lo relacionado a transporte, manipulación y traslado que puede acarrear desecación y muerte de las mismas, por lo que se buscan nuevas técnicas que permitan solucionar, este inconveniente, una de ellas es la producción de microtubérculos con ventajas en el almacenamiento y transporte de tubérculos libres de patógenos, estas ventajas posibilitan una mayor facilidad para el manejo y la posibilidad de plantarlos sin previa aclimatización, por lo que es posible emplear este método de propagación como una posible técnica para la obtención de semilla de papa de elevada calidad fitosanitaria (Jiménez *et ál*, 2001).

Las técnicas de microtuberización por métodos convencionales presentan varias limitantes relacionadas principalmente con un bajo número de microtubérculos, el pequeño tamaño de los mismos, lo que limita la plantación directa en condiciones de campo (Jiménez *et ál*, 2001), el alto uso de mano de obra calificada y la escasa posibilidad de automatización de los procesos, esto sin duda, incrementa los costos de producción. Las investigaciones realizadas sobre la microtuberización con el uso de sistemas de inmersión temporal demuestran que esta es una técnica óptima para la producción de semilla, dado que, esta posibilita un mayor contacto de la biomasa vegetal con el medio de cultivo, la existencia de un intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio de cultivo y de la atmósfera, reflejándose estas características en un mayor número de microtubérculos, en la calidad, en el aumento del tamaño y peso de los mismos, que a su vez permiten reducir los costos de producción (Ziv, 1995).

La técnica de inmersión temporal asociada a la producción masiva de microtubérculos *in vitro*, es una alternativa a los actuales métodos de propagación masiva de esta especie así como, para la introducción de nuevos genotipos. Esta técnica consiste básicamente en colocar los explantes de papa en uno de los frascos y en el otro se coloca el medio de cultivo líquido, este es transferido en una frecuencia y periodo de tiempo específico hacia el frasco que contiene los explantes, trascurrido un tiempo se cambia el medio de crecimiento por medio de tuberización (Paredes, 2005).

Para lograr una microtuberización eficiente en la actualidad se están usando inductores de tuberización, los cuales, permiten aumentar el número de microtubérculos obtenidos, entre los más usados se encuentra el ácido jasmónico, la sucrosa y el cloruro de clorocolina. El ácido jasmónico, provoca una importante expansión de las células del corpus situadas inmediatamente por debajo de la túnica, así como de aquellas correspondientes al meristema fundamental, precisamente donde se origina el tercer primordio foliar (Abdala, 1999). El cloruro de clorocolina posee efectos sobre el crecimiento vegetal y se usa para favorecer la microtuberización inhibiendo el desarrollo vegetativo (Primo, 2000). La concentración de sucrosa, es muy importante ya que esta actúa como inductora de varios genes que controlan la síntesis de tubérculos (Xu, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN

Los Sistemas de Inmersión Temporal son una técnica de gran potencial para la producción de microtubérculos de papa, ya que esta tecnología permite una rápida y mayor producción en periodos cortos de tiempo. Con la aplicación de esta tecnología se generan nuevas oportunidades para la producción de semilla de papa sana libre de enfermedades, debido a que estos microtubérculos poseen la capacidad de producir plantas más vigorosas, con tallos más gruesos y con menos enfermedades; además estos pueden producirse en cantidad adecuada sin importar la estación o la demanda ya que se los puede almacenar fácilmente sin la necesidad de una gran cantidad de espacio y pueden ser plantados directamente en campo sin una fase de aclimatización. La validación de esta tecnología en dos cultivares de papa de gran demanda, permitirá innovar en el corto plazo el sistema de producción de semilla pre-básica a partir de plantas *in vitro* que actualmente desarrolla el INIAP.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta a la microtuberización de los cultivares de papa INIAP- Victoria y Superchola, bajo sistemas de inmersión temporal (SIT)

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar la eficiencia de tres inductores de tuberización a dos dosis, en la microtuberización de dos cultivares de papa.
2. Realizar el análisis económico de la aplicación comercial de los sistemas de inmersión temporal en la microtuberización de dos cultivares de papa.

4. HIPÓTESIS

H₀: Los inductores de tuberización no responden eficientemente a la microtuberización de las variedades de papa Victoria y Superchola, bajo SITs

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Alcohol
- Agitador
- Agua destilada y esterilizada
- Pinzas

5.1.2 Reactivos

- Sacarosa
- Ácido Jasmónico
- Medio M&S
- Cloruro de Cloro Colina (CCC)
- Pantotenato de calcio
- Ácido Giberélico AG3

5.1.3 Equipos de laboratorio

- Biorreactor de inmersión temporal
- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de crecimiento
- Destilador de agua
- pH metro
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Humidificador

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características del sitio experimental

5.2.1.1 Ubicación

La investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

5.2.1.2 Características del lugar

Provincia : Pichincha
Cantón : Mejía
Parroquia : Cutuglagua

5.2.1.3 Condiciones experimentales de laboratorio

Temperatura promedio : $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Fotoperíodo : 16 horas luz
Intensidad de luz : $42 - 48 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Humedad relativa : 60%

5.2.2 Factores en Estudio

a) Cultivares (c)

Se utilizarán dos cultivares:

c_1 = INIAP - Victoria
 c_2 = Superchola

b) Inductores de Tuberización (i)

i_1 = Sacarosa
 i_2 = Ácido Jasmónico
 i_3 = Cloruro de Clorocolina CCC

c) Dosis (d)

d _{alta} = 80000 mg/litro d _{baja} = 40000 mg/litro	Sacarosa
d _{alta} = 0.105 mg/litro d _{baja} = 1.05 mg/litro	Ácido Jasmónico
d _{alta} = 250 mg/litro d _{baja} = 500 mg/litro	CCC

5.2.3 Tratamientos

Cuadro 1. Tratamientos para la evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola con el uso de tres inductores de tuberización a dos dosis bajo sistemas de inmersión temporal. INIAP, Cutuglagua – Pichincha, 2012.

ORDEN	SIMBOLO	CODIGO	TRATAMIENTO
1	T1	c1 i1 da	INIAP-Victoria + sacarosa + 80000 mg/litro
2	T2	c1 i1 db	INIAP-Victoria + sacarosa + 40000 mg/litro
3	T3	c1 i2 da	INIAP-Victoria + ácido jasmónico + 1.050 mg/litro
4	T4	c1 i2 db	INIAP-Victoria + ácido jasmónico + 0.105mg/litro
5	T5	c1 i3 da	INIAP-Victoria + ccc + 500 mg/litro
6	T6	c1 i3 db	INIAP-Victoria + ccc + 250 mg/litro
7	T7	c2 i1 da	Superchola + sacarosa + 80000 mg/litro
8	T8	c2 i1 db	Superchola + sacarosa + 40000 mg/litro
9	T9	c2 i2 da	Superchola + ácido jasmónico + 1.050 mg/litro
10	T10	c2 i2 db	Superchola + ácido jasmónico + 0.105mg/litro
11	T11	c2 i3 da	Superchola + ccc + 500 mg/litro
12	T12	c2 i3 db	Superchola + ccc + 250 mg/litro

5.2.4 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por dos frascos de vidrio de 3 litros de capacidad, interconectados por mangueras de silicona, el uno contendrá 250 ml de medio de cultivo líquido y el otro frasco contendrá diez brotes con seis yemas cada uno, estos funcionarán en el tiempo y frecuencia especificada.

5.2.5 Diseño experimental

Se utilizará un Diseño Completamente al Azar (ECA) dispuesto en arreglo factorial 2 x 3 x 2 (dos cultivares por tres inductores de tuberización y por dos dosis) con tres observaciones por cada tratamiento.

5.2.6 Análisis estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta en el cuadro 2:

Cuadro 2. ADEVA para la evaluación de la microtuberización de los cultivares de papa INIAP- Victoria y Superchola con el uso de tres inductores de tuberización a dos dosis en biorreactores de inmersión temporal. INIAP, Cutuglagua – Pichincha. 2012.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (GL)
Total	35
Tratamientos	11
Cultivares(C)	1
Inductores de tuberización (I)	2
C x I	2
Dosis	1
C x D	1
I x D	2
C x I x D	2
Error Experimental	24
PROMEDIO	
CV (%)	

5.2.7 Análisis funcional

5.2.7.1 Pruebas de significación

Se realizará la prueba de Tukey al 5%, para los inductores de tuberización y las interacciones C x I, C x D, I x D y C x I x D, que presenten diferencias estadísticas significativas y DMS al 5% para cultivares y dosis que presenten diferencias estadísticas significativas.

5.2.8 Variables y métodos de evaluación

- Número de microtubérculos

Se contará el número de microtubérculos por cada tratamiento, concluidas las seis semanas de sometidas las plantas a tuberización.

-Diámetro de los microtubérculos

Con el uso de un vernier se determinará el diámetro de los microtubérculos por cada uno de los tratamientos y se procederá a clasificarlos según su diámetro en:

Grandes: Mayores que 8

Medianos: De 7.9 – 5

Prqueños: De 4.9 – 1

- Peso fresco

Se tomará un treinta porciento de los tubérculos obtenidos por cada tratamiento y se procederá a pesarlos en una balanza electrónica.

- Peso seco

A los tubérculos tomados para el peso en fresco de cada tratamiento se los someterá a desecación en una estufa a 70°C por veinticuatro horas, luego de lo cual se procederá a pesarlos en una balanza electrónica.

5.2.9 Método del Presupuesto Parcial

La medida de evaluación que se aplicará es la razón beneficio - costo para la microtuberización de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola utilizando sistemas de inmersión temporal, usando la información que se obtuvo en la etapa microtuberización de brotes en cada uno de los tratamientos estudiados.

La estimación de los costos de producción se realizará para el número de microtubérculos obtenidos en cada tratamiento durante el tiempo de evaluación, para lo cual se tomarán en cuenta los costos de los insumos directos, materiales de laboratorio, utensilios de laboratorio, equipos del laboratorio, suministros y mano de obra que fueron utilizados.

5.2.10 Manejo específico del experimento

La primera etapa incluye la introducción de explantes de los cultivares de papa INIAP-Victoria y Superchola en medio semi- sólidos, luego se realizará la micropropagación convencional de los brotes, al mismo tiempo se irá eliminando el material contaminado. En la segunda etapa se sembraran los explantes obtenidos de la micropropagación convencional en medio semi-sólido para someterlos al sistema de inmersión temporal, en un medio de cultivo de crecimiento. En la tercera etapa se cambiará el medio de crecimiento por el medio de tuberización que contendrá los distintos inductores según el tratamiento y se tapaná con fundas de color negro a los frascos que contengan a las plántulas.

5.2.10.1 Micropropagación en medio semi - sólido

A los explantes introducidos no contaminados, bajo cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí estériles, se procederá a sembrar en medio de inducción y proliferación de brotes. Posteriormente los tubos sembrados se colocarán en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 22±2°C de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante 21 días (Castro *et al* 2011).

5.2.10.2 Preparación de los biorreactores y medio líquido

El sistema de inmersión temporal empleado será el propuesto por Alvard *et ál.* en 1993, con algunas modificaciones. Como recipientes se utilizarán frascos de tres litros de capacidad, los cuales se interconectarán por parejas mediante mangueras de silicona. En un frasco se colocará el medio de cultivo líquido y en el otro los brotes. Cada frasco se conectará a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionará por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones, la luminosidad y el flujo de gases. El aire entrante o saliente se esterilizará a través de filtros hidrófobos de 0.2 mm, de tal manera que cada recipiente se manipulará independientemente sin riesgos de contaminación. Todo el material será previamente autoclavado a 121 °C.

Los explantes de papa se multiplicarán en medio líquido MS Murashige y Skoog, que se suplementará con 2 ppm de pantotenato de calcio, 0.2 ppm de AG3 y 30 g de sacarosa, el pH se ajustará a 5,56 antes de la esterilización a 121 ° C. Para permitir el crecimiento de los explantes, estos se mantendrán en un cuarto de crecimiento con luz artificial, a una temperatura de 20 ± 2 ° C durante seis semanas.

Posteriormente se remplazará este medio de cultivo líquido por otro el cual contenga según sea el caso sacarosa, ácido jasmónico o cloruro de cloro colina en la dosis que corresponda al tratamiento y se procederá a tapar con fundas de color negro a cada uno de los frascos donde se encuentran las plántulas y se los mantendrá a una temperatura de 20°C durante seis semanas. La frecuencia de inmersión en el SIT será de 3 minutos cada 12 horas. (Paredes 2004).

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Prácticas preliminares y entrenamiento en laboratorio	x	x										
Revisión de literatura		x										
Elaboración y aprobación del proyecto		x										
Micropropagación convencional de brotes de papa		x										
Eliminación de brotes contaminados		x										
Siembra de brotes de papa en medio líquido SITs			x									
Ensayo de tuberización con sistemas SITs 1er cultivar			x	x	x							
Ensayo de tuberización con sistemas SITs 2do cultivar						x	x	x				
Análisis de datos					x			x	x	x		
Redacción de manuscrito										x	x	x

7. PRESUPUESTO

7.1 Equipos

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Valor de Uso (USD)
Biorreactor de inmersión temporal	Biorreactor	50.00	28	350.0
Agitador magnético	Unidad	432.00	1	17.3
Autoclave	Unidad	900.00	1	36.0
Balanza de precisión	Unidad	2500.00	1	100.0
Cámara de flujo laminar	Unidad	12500.00	1	250.0
Dispensador de medio	Unidad	100.00	1	4.0
Estufa	Unidad	1500.00	1	60.0
Microondas	Unidad	170.00	1	6.8
pH-metro	Unidad	760.00	1	23.4
Refrigeradora	Unidad	600.00	1	198.0
SUBTOTAL				1045.5

7.2 Reactivos

Rubro	Unidad	Precio Unitario	Cantidad	Total
Acido Jasmónico	mg	1.660	100.00	166.1
Cloruro de cloro colina	g	15.800	5.00	79.0
Medio M&S	litro	11.000	10.800	118.8
Sacarosa	g	0.1648	1000.00	164.8
Agua destilada	litro	0.300	55.000	16.5
Alcohol	litro	1.000	10.500	10.5
Acido Giberelico (AG3)	g	121.25	1.00	121.3
Pantotenato de Calcio	g	0.007	64.00	0.4
SUBTOTAL				677.3

7.3 Materiales de Laboratorio

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Barras Magnéticas	Unidad	3.00	2	6.0
Espátula mando de madera	Unidad	4.00	2	8.0
Mandil	Unidad	8.00	1	8.0
Mangos de Bisturí	Unidad	5.00	2	10.0
Marcadores	Unidad	2.00	2	4.0
Mecheros de Alcohol	Unidad	4.00	1	4.0
Pinzas	Unidad	20.00	3	60.0
Pipeta 10 ml	Unidad	2.00	1	2.0
Pipeta 1ml	Unidad	1.89	1	1.9
Probeta Graduada 500ml	Unidad	16.40	1	16.4
Probeta Graduada 25ml	Unidad	6.30	1	6.3
Tijeras	Unidad	2.00	1	2.0
Cinta autoclavable	Rollo	10.00	1	10.0
Desinfectante	litro	1.00	4	4.0
Frascos de vidrio 5.6x9.0 cm	Unidad	0.50	100	50.0
Fundas	Unidad	0.01	150	1.5
Guantes	Par	0.65	20	13.0
Hoja Bisturí	Unidad	0.20	100	20.0
Jabón Líquido	litro	2.50	1	2.5
Papel Absorbente	Paquete	1.50	2	3.0
Papel Aluminio	Paquete	4.00	2	8.0
Servilletas	Paquete	1.20	3	3.6
Zapatos	Unidad	30.00	1	30.0
Rollopac	Paquete	3.20	2	6.4
Mascarilla	Unidad	0.20	10	2.0
SUBTOTAL				282.6

7.4 Materiales de Oficina

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Copias	Unidad	0.03	1200	36.0
Empastado del texto	Unidad	15.00	8	120.0
CD	Unidad	5.00	4	20.0
SUBTOTAL				176.0

7.5 Personal

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Tesista	Mensual	323.85	12	3886.20
SUBTOTAL				3886.20

7.6 Costo total

Rubro	Total (USD)
Personal	3886.20
Equipos	1045.48
Reactivos	677.31
Materiales de laboratorio	282.59
Materiales de oficina	176.00
SUBTOTAL	6067.58
Imprevistos 5%	303.38
TOTAL	6370.9

7.8 Fuentes de financiamiento

Institución	Proyecto	USD	Porcentaje (%)
INIAP	BIOTECNOLOGIA-Fortalecimiento	2484.76	39.00
Tesista		3886.20	60.99

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abdala, G. 1999. Endogenous jasmonic acid and radial cell expansion in buds of potato tubers. *Journal of Plant Physiology* 155(6):706-710
2. Alvard, D., Cote, F., Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation effects of temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 32:55-60
3. Calderón, A., Valbuena R., Hidalgo R., Moreno J. 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. Universidad Nacional de Colombia. *Acta agronómica* 57(3)
4. INEC. 2003. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Censo Agropecuario 2002
5. Jiménez, E., Pérez, N., De Fera, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quiala, E., Pérez, J. 2001. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. *Revista de Biotecnología Vegetal* 7(3):149-154
6. Paredes, M., 2005. Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores, Nueva tecnología en micropropagación. Suplemento revista tierra adentro. Mayo - Junio
7. Paredes, M., Becerra V, Castro D, Santos J. 2004. Micropropagación de papa *Solanum tuberosum* mediante la técnica de inmersión temporal en biorreactores. Instituto de Investigaciones agropecuarias INIA. Suplemento revista latinoamericana de la papa. Panel 88.
8. Pelacho, A, Mingo A. 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. Department of plant production, agronomical engineering school, polytechnical. University of Catalonia. *Plant Physiol.* 97: 1253-1255
9. Primo, E. 2000. Química Orgánica Aplicada. Universidad Politécnica de Valencia. Editorial Reverté. Pg 1243
10. Xu, X., Van Lammeren A., Vermeer, E., Vreugdenhil, D. 1998. The Role of Gibberellin, Abscisic Acid, and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation *in Vitro*. *Plant Physiol.* 117: 575-584
11. Ziv, M. 1995. The effect of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured *Gladiolus* plants. *Acta Horticulturae*. 280: 207-214

9. ANEXOS

Anexo 1. Medio sólido de multiplicación para papa

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MS más Vitaminas	4.4 mg/litro
Sucrosa	30 g/litro
Pantotenato de Ca	2 ppm
AG3	0.2 ppm
Agar	8 g

Fuente: Protocolos de laboratorio de biotecnología del INIAP

El medio de cultivo debe ser regulado a un pH de 5.7 antes de la esterilización a 121°C por 20 minutos.

Anexo 2. Medio líquido de crecimiento para papa

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Sales M&S	115 ml/litro
Pantotenato de calcio	2 ppm
AG3	0.2 ppm
Sacarosa	30 g

Fuente: Protocolos de laboratorio de biotecnología del INIAP

Anexo 3. Medio líquido de microtuberización con sacarosa

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
	da	db
M&S	110 ml	110 ml
Sacarosa	80000 mg/litro	40000 mg/litro

Fuente: Protocolos de laboratorio de biotecnología del INIAP

Anexo 4. Medio líquido de microtuberización con ácido jasmónico

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
	da	db
M&S	110 ml	110 ml
Sucrosa	30000 mg/litro	30000 mg/litro
Acido Jasmónico	1.050 mg/litro	0.105 mg/litro

Fuente: Pelacho y Mingo 1991

Anexo 5. Medio líquido de microtuberización con cloruro de cloro colina

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
	da	db
M&S	110 ml	110 ml
Sucrosa	30000 mg/litro	30000 mg/litro
CCC	500 mg/litro	250 mg/litro

Fuente: Calderón et al.2008

Los medios de cultivo deben ser regulados a un pH de 5.56 antes de la esterilización a 121°C por 20 minutos. Las condiciones de cultivo deben ser mantenidas en un cuarto aclimatado a una temperatura de 20°C, y con un fotoperiodo de 8 horas colocando en los frascos fundas de color negro.