

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE
PLÁNTULAS IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) A
PARTIR DE SEMILLAS Y EXPLANTES**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRONOMO

AUTOR: BARRERA NUÑEZ MARCELO VINICIO

TUTOR: Dra. LALALEO CORDOVA LILIANA PAULINA

CEVALLOS – ECUADOR

2021

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, BARRERA NUÑEZ MARCELO VINICIO, portador de cédula de ciudadanía número: 1803825148, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) A PARTIR DE SEMILLAS Y EXPLANTES” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



BARRERA NUÑEZ MARCELO VINICIO

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) A PARTIR DE SEMILLAS Y EXPLANTES” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



BARRERA NUÑEZ MARCELO VINICIO

**OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE
PLÁNTULAS IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) A
PARTIR DE SEMILLAS Y EXPLANTES**

REVISADO POR:

 Firmado electrónicamente por:
LILIANA PAULINA
LALALEO CORDOVA

.....
Dra. LALALEO CORDOVA LILIANA PAULINA

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

 Firmado electrónicamente por:
MANOLO SEBASTIAN
MUNOZ ESPINOZA

FECHA

.....
29/03/2021

Ing. Manolo Muñoz

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

 Firmado electrónicamente por:
MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS

.....
29/03/2021

Ing. Marco Pérez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

 Firmado electrónicamente por:
OLGUER ALFREDO
LEON GORDON

.....
29/03/2021

Ing. Olguer León

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación va dedicado para toda mi familia, especialmente a mi padre que desde el cielo me ha dado fortaleza para culminar mis estudios.

A todas las personas que están en mi entorno, que en ocasiones sus buenos y malos consejos o comentarios sirvieron de motivación para seguir adelante en mi formación profesional.

A la ASOCIACIÓN AGROPECUARIA QUINLATA quien fue el promotor principal para dar inicio a los estudios superiores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, brindarme salud, sabiduría, a mi familia, a mis hermanos/as: Paulina, Nancy, Anita, Juan, Natalia, Daniela, Carito y Valeria Barrera Nuñez; especialmente a mi madre Edelina Nuñez, a mi tía Martha Barrera; quienes han aportado desinteresadamente en el transcurso de mis estudios para formarme académicamente y profesionalmente.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera Ingeniería Agronómica, por permitir ser parte de esta prestigiosa institución como estudiante y profesional.

A mi Tutor de tesis Dra. Liliana Lalaleo por brindarme su amistad, apoyo incondicional, paciencia, consejos, y sobre todo ha compartido sus sabios conocimientos, incluyendo materiales que han sido de mucha ayuda para poder realizar mi proyecto de investigación, por esta razón es grato expresar mis sinceros agradecimientos.

A todos los docentes que compartieron sus conocimientos y han servido de guía para llegar a concluir mi carrera profesional.

A mis amigos/as y compañeros/as de clase los cuales fueron parte de mi vida como estudiante, quedan muchos recuerdos en mi mente que en algún momento se podrá volver a vivir.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA	17
2.1. Equipos, materiales y reactivos	17
2.1.1. Equipos	17
2.1.2. Materiales	17
2.1.3. Reactivos	18
2.2. Factores de estudio	19
2.2.1. Medios de cultivo.....	19
2.2.2. Métodos de desinfección.....	19
2.2.3. Estratificación de las semillas	20
2.2.4. Desinfección de los explantes	20
2.3. Características del Lugar	21
2.3.1. Ubicación del ensayo	21
2.3.2. Recolección y almacenamiento de las semillas	21
2.4. Metodología de la investigación.....	22
2.4.1. Tratamientos.....	22
2.5. Diseño experimental.....	23
2.6. Variables respuesta.....	23
2.6.1. Semillas y explantes.....	23
2.7. Manejo del experimento	24
2.7.1. Siembra de las semillas	24

2.7.2.	Recolección y almacenamiento de los explantes	25
2.7.3.	Siembra de los explantes.....	25
2.7.4.	Medio de cultivo para semillas y explantes.	25
2.8.	Procesamiento de la información	26
2.9.	Hipótesis.....	26
CAPÍTULO III.....		27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		27
3.1	Análisis e interpretación de los resultados en Semillas.....	27
3.1.1.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el porcentaje de germinación en las semillas 1, 2 y 3.....	27
3.1.2.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el porcentaje de contaminación en las semillas 1, 2 y 3.	29
3.1.3.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre la altura (cm.) en las semillas 1, 2 y 3.	31
3.1.4.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de hojas verdades en las semillas 1, 2 y 3.	33
3.1.5.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de brotes en explantes.....	35
3.1.6.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre la altura de explantes.	36
3.1.7.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de hojas verdaderas en explantes.....	37
3.1.8.	Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de raíz en explantes.....	37
3.2	Discusión de los resultados	38
3.3	Verificación de la hipótesis	42
CAPÍTULO IV.....		43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		43

4.1 Conclusiones	43
MATERIALES DE REFERENCIA	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación Taxonómica.....	11
Tabla 2. Variedades de tomate de árbol.	12
Tabla 3. Características nutricionales.	12
Tabla 4. Principales plagas y enfermedades que atacan al cultivar de <i>S. betaceum</i> .	15
Tabla 5. Composición de los medios de cultivo	19
Tabla 6. Método 1 de desinfección de la semilla.	19
Tabla 7. Método 2 de desinfección de la semilla	20
Tabla 8. Método de estratificación de la semilla.....	20
Tabla 9. Método 1 de desinfección de los brotes	20
Tabla 10. Método 2 de desinfección de brotes.....	21
Tabla 11. Tratamientos.....	22

Índice de figuras

Figura 1. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	27
Figura 2. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	28
Figura 3. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	29
Figura 4. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	30
Figura 5. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	30
Figura 6. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	31
Figura 7. Altura (cm.) promedio en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	32
Figura 8. Altura (cm.) promedio en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	32
Figura 9. Altura (cm.) promedio en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	33
Figura 10. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	35
Figura 11. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	34
Figura 12. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	35

Figura 13. Numero de brotes promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	36
Figura 14. Altura (cm.) promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	36
Figura 15. Numero de hojas verdaderas promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	37
Figura 16. Número de raíz promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.	38

RESUMEN

El Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un frutal que posee alta demanda en los mercados estadounidenses por su calidad nutricional, este cultivar se produce en provincias del Carchi, Imbabura, Azuay, Pichincha, Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua. A pesar de ser un frutal que se encuentra en constante desarrollo no ha logrado alcanzar suficientes réplicas de variedades mejoradas por lo que se realizan estudios a partir de semillas para lograr plantas de calidad. El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar las mejores condiciones para la obtención de plántulas *in vitro*, tomando en consideración las siguientes variables experimentales como: medios de cultivo (M1, M2 y M3), métodos de desinfección en semillas (D1 y D2) y explantes (E1) y diferentes procesos de escarificación (S1, S2 y S3). Los resultados muestran que los mejores tratamientos fueron S2D1M2 en cuanto a las semillas y E1D1M2 en explantes. Las variables respuesta fueron evaluadas entre los 4 a 60 días de experimentación, sin embargo, se obtienen los mejores resultados a los 60 días de observación, obteniendo un porcentaje de germinación del 92%, porcentajes de contaminación de 48% para el tratamiento S2D1M2. El desarrollo de la plántula fue evaluado mediante la altura de la plántula, formación de hojas verdaderas, número de brotes y formación de raíces. Los valores de altura oscilaron entre: 3,35 cm. (S2D1M2) y 11 cm. (E1D1M2), así mismo la formación de hojas presentó una media de 11,5 a partir de semilla y 2,0 en explantes, en cuanto al número de brotes 1,5; mientras que en número de raíces se presentó un valor promedio de 3,3; todos estos valores al final de la observación (60 días). Este estudio brinda información relevante para determinar el medio de cultivo y las condiciones más favorables para el desarrollo de plántulas *in vitro*, además evidencia el efecto ponderaste de las fitohormonas en el desarrollo vegetal.

Palabras clave: fitohormonas, brotes, contaminación, germinación, hojas verdaderas, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The tree tomato (*Solanum betaceum*) is a fruit tree that is in high demand in the US markets for its nutritional quality, this cultivar is produced in the provinces of Carchi, Imbabura, Azuay, Pichincha, Chimborazo, Cotopaxi and Tungurahua. Despite being a fruit tree that is in constant development, it has not managed to achieve enough replicas of improved varieties, so studies are carried out from seeds to achieve quality plants. The main objective of this work is to evaluate the best conditions for obtaining seedlings in vitro, taking into consideration the following experimental variables such as: culture media (M1, M2 and M3), seed disinfection methods (D1 and D2) and explants (E1) and different scarification processes (S1, S2 and S3). The results show that the best treatments were S2D1M2 in terms of seeds and E1D1M2 in explants. The response variables were evaluated between 4 to 60 days of experimentation, however, the best results are obtained after 60 days of observation, obtaining a germination percentage of 92%, contamination percentages of 48% for the S2D1M2 treatment. The development of the seedling was evaluated by the height of the seedling, true leaf formation, number of shoots and root formation. The height values ranged from: 3.35 cm. (S2D1M2) and 11 cm. (E1D1M2), likewise the formation of leaves presented an average of 11.5 from seed and 2.0 in explants, in terms of the number of shoots 1.5; while the number of roots presented an average value of 3.3; all these values at the end of the observation (60 days). This study provides relevant information to determine the culture medium and the most favorable conditions for the development of seedlings in vitro, it also shows the weighting effect of phytohormones on plant development.

Key words: phytohormones, shoots, contamination, germination, true leaves, in vitro culture.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La familia Solanaceae es considerada como una de las más importantes por su alto impacto económico a nivel mundial (**Sierra-Muñoz et al. 2015**). Dentro de esta familia existen más de 2 300 especies (**Cuevas-Arias et al. 2008**) siendo de mayor importancia económica y alimentaria la papa, jitomate, ají, tomate de árbol, entre otros (**Nee, 1986**). De estas, el tomate de árbol (**S. betaceum**) también conocido como tomate de cimarrón, tomate de palo, tamarillo y contra-gallinazo por países como Colombia, Perú, Chile, Bolivia y Ecuador (**Bedoya-Reina y Barrero, 2009; Calvo 2009**), se cultiva en alturas entre los 1000 y 3000 msnm, desarrollándose perfectamente en las zonas altas (**León et al., 2004**).

El fruto de este cultivar posee alta demanda de exportación a mercados estadounidenses por la alta calidad nutricional que presenta (vitaminas A y C, fibra, fósforo, hierro, calcio) además de funcionar como antioxidante, fortificando al sistema inmunológico (**Borrero 2007**). Esta exportación depende directamente de la certificación y sello de Agrocalidad (**Ango y Chica 2013; Pazmiño 2013**). La producción de tomate de árbol ha generado un impacto positivo en zonas productoras de Carchi, Imbabura, Azuay, Pichincha, Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua (**León et al. 2004; Sandoval y Calispa 2015**). A pesar del progresivo desarrollo socioeconómico en estas zonas, no se ha logrado alcanzar suficientes réplicas de las variedades mejoradas (**Revelo et al. 2004**). Por otro lado, este cultivar es vulnerable a diversas enfermedades transferidas por las semillas y la propagación de patógenos presentes en las plantas (**Rathore et al. 2015; Rout, Mohapatra y Jain 2006**).

La utilización de semilla de calidad es un elemento de alta significancia que logra conseguir homogeneidad en la germinación y crecimiento inicial de los vegetales

garantizando una mejor producción y productividad agrícola (FAO 2006; Sandoval y Calispa 2015). Así mismo, las técnicas tradicionales utilizadas para la propagación generan un grado elevado de variación genética afectando negativamente la calidad del fruto (Criollo et al. 2016), lo que produce su rechazo en el mercado mundial (Chacón-Cerdas et al. 2014).

Una opción a la propagación tradicional y sus restrictivos es el cultivo *in vitro* (Arahana et al. 2010), esta alternativa biotecnológica recurre al significado de la totipotencia celular, a manera de uno de sus elementos (Buchanan et al. 2015; Murillo-Gómez et al. 2017); esta noción demuestra que toda célula vegetal, comprende un duplicado íntegro del material genético de la planta original (Quiroz-Chávez et al. 2012), además permite reproducir de manera acelerada y rentable en cualquier día del año (Criollo et al. 2016; Delgado y Insuasti 2015). Es decir, que el cultivo *in vitro* ofrece gran ventaja en la propagación de plántulas de calidad a gran escala y libres de patógenos, es por ello, que el presente trabajo de investigación tiene como objeto evaluar diferentes composiciones de medios de cultivo y métodos de desinfección para la obtención de plántulas *in vitro* mediante germinación de semillas y crecimiento de explantes de Tomate de árbol (*S. betaceum*).

1.1 Antecedentes Investigativos

Borrero (2007), reporto un protocolo para la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja en cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol, utilizando una combinación hormonal de la auxina ANA (ácido naftalen acético) la cual es un hormona vegetal que estimula el alargamiento celular e induce la formación de raíz y la citoquinina BAP (benzil- amino purina), hormona responsable de la división celular e induce la formación de retoños. En su estudio utilizaron cinco frutos de cada variedad y se encontró que no se puede relacionar una combinación hormonal específica con una variedad determinada para la formación de callo y la regeneración de retoños. Con ANA (0,07ppm) se evidencio mejor formación del callo y regeneración de retoños a partir de explantes para todas las variedades. Por otro lado, no se pudo determinar una concentración específica de BAP para la formación del callo, ni la regeneración de

retoños. Sin embargo, la utilización de ANA a 0,07 ppm y BAP a 3 o 4 ppm, aseguran la mejor formación de callo y regeneración de retoños para las cinco variedades.

Mientras que, **Waweru et al. (2011)** en sus estudios menciona que los métodos convencionales de propagación de Tamarillo son lentos e ineficientes, es por ello, que en su investigación para *C. betacea*, evaluó el efecto de fitohormonas en la brotación y la proliferación micro-tallo posterior a partir de explantes nodales. Los explantes nodales se cultivaron en medios de Murashige y Skoog suplementado con diferentes concentraciones de benzil amino purina (BAP), adenina 2- isopentenil (2iP) y kinetina, así como 100 mg/l de mio-inositol 3% de sacarosa y gelificado con 0.3% gelrite. En donde logro obtener diferencias significativas entre los diferentes niveles de citoquinina para la elongación micro-tallo. Sin embargo, BAP a 40uM/l fue quien dio mayor eficacia en la inducción de brotación y múltiples brotes, con una tasa promedio de $1,42 \pm 0,34$ brotes por nodo y la más alta longitud de brotes de $39,25 \pm 9.05$ mm después de 35 días en cultivo. Los micro-tallos fueron capaces de erradicar sin la adición de una auxina exógena y las plántulas endurecidas con éxito en el invernadero.

Por otro lado, **Murillo-Gómez et al. (2017)** muestra que la inducción de organogénesis directa en tomate de árbol presenta una gran alternativa para la propagación clonal de plantas libres de enfermedades y útil para transformación genética. En su estudio investigativo evaluó la inducción de organogénesis *in vitro* en tres tejidos diferentes: hojas, pecíolos y semillas sexuales de la variedad Común, estos tejidos se cultivaron en MS suplementado con agar, sacarosa y las fitohormonas TDZ o BAP de 0.5 a 3 mg L⁻¹, combinadas o no con las auxinas AIA (ácido indol acético) y ANA (ácido naftalen acético). Las hojas lograron producir un promedio de 18.4 brotes/explante en un medio que contenía TDZ (Thidiazuron) a 0.5 mg L⁻¹. Los valores promedios más altos fueron de 4,3 y 3,1 brotes/explante de semillas y pecíolos, respectivamente. Sin embargo, La producción de brotes múltiples en pecíolos fue influenciada por bajas concentraciones de auxinas.

Criollo et al. (2016), evaluaron diversas opciones de multiplicación masiva en plántulas de *S. betaceum*, utilizando tres auxinas (AIA, ANA Y 2,4-D) con diferentes niveles de concentración combinadas con BAP (1,0 mg/L y 3,0 mg/L), en medios de cultivo Murashige y Skoog (MS) utilizando hipocótilos como explantes, teniendo

como resultado que AIA 0,5 mg/L+BAP 3,0 mg/L brindo el mayor número de brotes (11,6), por otro lado, el porcentaje de enraizamiento de los explantes fue mayor en los testigos sin fitoreguladores y con inclusión de AIA. Con AIA 0,5 mg/L (36,9%) fue quien permitió obtener mejores variables de comportamiento en cuanto a la formación de plantas completas. Así mismo, el mejor porcentaje (96,23%) de enraizamiento de brotes han sido obtenidos a partir de hipocótilos con AIA 1,0 mg/L+BAP 3,0 mg/L, finalmente las plantas enraizadas fueron exitosamente transferidas a la etapa de endurecimiento con un 96,6% de supervivencia.

Los estudios publicados por **Espinosa et al. (2005)** evaluaron 10 medios de cultivo para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *S. betaceum* partenocárpico, los cuales contenían sales de MS, BAP de 0,17 a 5,82 mg/l, y AIA de 0,19 a 2,31 mg/l y una mezcla de tres sustancias antioxidantes: cisteína, ácido ascórbico y caseína hidrolizada (100 mg/l de cada una). Los explantes utilizados fueron esquejes de nudo de 1,5 a 2,0 cm de longitud provenientes del altiplano Norte y Oriente de Antioquia-Colombia, Los explantes del Norte obtuvieron el punto óptimo de longitud de brotes con reguladores de crecimiento (0,17 mg/l de BAP y 0,19 mg/l de AIA) en comparación con los de Oriente, en donde no se pudo determinar el punto óptimo. Así mismo, se presentaron porcentajes bajos de 0,0 y 20,0% para explantes del Oriente y Norte, respectivamente, con un desarrollo de brotes lento (4 meses) para explantes del Norte. Por otro lado, las sustancias antioxidantes no afectaron la oxidación fenólica con resultados de media a alta.

Finalmente, **Chacón-Cerdas et al. (2014)**, realizaron un protocolo para la micro-propagación *in vitro* del tomate de árbol criollo del fenotipo naranja, proveniente de Costa Rica. En donde evaluaron dos tratamientos de desinfección *in vitro* con variaciones en la concentración del $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 2,5% y 5,0% (i.a 75%), tres tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento y concentración de sales MS (1962), y seis tratamientos para el enraizamiento *in vitro* con diversos reguladores de crecimiento y gelificantes. Los mejores resultados se obtuvieron con la desinfección con 2,5% de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, el M1, compuesto por sales MS(1962) al 100%, sacarosa al 3%, phytigel® 1,8g/L, 0,5mg/L de AG3, 0,25mg/L de BAP y 2,0 mg/L de PaCa fue el mejor medio

de cultivo, el cual presentó el mejor balance entre el número promedio de brotación/explante y el número promedio de entrenudos/explante, sin formación excesiva de callo, por otro lado, los medios de cultivo E5 (sales MS(1962) al 100%, agar 6,0g/L y sacarosa al 3%) y E6 (sales MS(1962) al 100%, agar 8,0g/L y sacarosa al 3%), sin reguladores del crecimiento manifestaron un periodo más corto para la formación de raíces, mayor número promedio de raíces y mayor longitud promedio de raíz y tallo.

De manera general se puede demostrar que varios estudios sustentan la aplicación del cultivo in vitro como una herramienta biotecnología efectiva la propagación masiva de especies de interés confiriéndole ventajas en los procesos de germinación, calidad y disminución de plagas. Además, se evidencia el papel preponderante de las fitohormonas y la concentración de las mismas para el éxito y desarrollo de plántulas en estas condiciones controladas.

1.2 Objetivos

Objetivo General

- Evaluar diferentes composiciones de medios de cultivo y métodos de desinfección para la obtención de plántulas in vitro mediante germinación de semillas y crecimiento de explantes de Tomate de Árbol (*S. betaceum*).

Objetivos Específicos

- Aplicar dos métodos de desinfección en semillas y explantes de Tomate de árbol (*S. betaceum*).
- Determinar el medio de cultivo óptimo para la germinación de semillas y crecimiento de explantes de Tomate de Árbol (*S. betaceum*).
- Identificar cuál de los tratamientos en estudio presenta mejores resultados en la obtención de plántulas in vitro.

1.3 Categorías Fundamentales

1.3.1 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo consta de un conjunto de compuestos inorgánicos y favorables a concentraciones determinadas para el crecimiento y desarrollo para los organismos que se siembran en ellos. **(Chañag-Miramag et al. 2017; Criollo et al. 2016).**

Los medios de cultivo están formados entre 6 y 40 componentes, habitualmente están constituidos por:

- Agar: es usado por su efecto gelificante que da solidez al medio al medio de cultivo.
- Azúcares: usados como una fuente de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa).
- Proteínas: usadas como fuente de nitrógeno (peptonas).
- Soluciones *buffer*: utilizadas como reguladores de pH para mantener el medio cultivo en un rango adecuado para el crecimiento de los explantes y semillas.
- Otros componentes: se utilizan diferentes concentraciones de fitohormonas como citoquinina, auxina y giberelinas, además de sustancias vitamínicas, aminoácidos y agentes antioxidantes, antibióticos y fungicidas **(Borrero 2007; Delgado y Insuasti 2015; Espinosa et al.,2005; Hoyos et al. 2008).**

1.3.2 Cultivo *In vitro*

La palabra *in vitro* proviene del latín que significa dentro de un vidrio, en este caso el cultivo *in vitro* de plantas se refiere a cultivar plantas dentro de un tubo de ensayo, cajas Petri o frascos de vidrio o plásticos transparentes de manera artificial **(Murillo-Gómez et al. 2017)**. Las características que presenta este

método de cultivo son: asepsia y control de componentes que podrían influir en su crecimiento como temperatura, fotoperiodo y humedad (**Arahana et al. 2010; Chacón-Cerdas et al. 2014**). Una forma de propagación *in vitro* es conocida como micro-propagación o propagación clonal, en la cual se utiliza una pequeña parte de la planta (explante de la planta madre), del cual se obtiene una planta con las características idénticas al de la madre, logrando propagar sucesivamente las variedades de plantas elite, sin correr el riesgo de modificar su material genético, es por ellos que son llamadas clones (**Domínguez et al. 2008; Vilchez et al. 2014**); otro método es la utilización de semillas, la cual es una alternativa mucho más aséptica que los explantes (**Borrero 2007; Rout et al. 2006**).

En la micro-propagación *in vitro* se realizan 6 etapas o fases indispensables:

1. Selección y preparación de la planta madre (yemas, explantes o semillas). En esta fase es indispensable conseguir explantes, yemas o semillas con un nivel adecuado de desarrollo y nutrición, si se realiza por medio de explante o yemas, brotes se debe mantener a la planta madre en buen estado y en condiciones adecuadas donde pueda permanecer por varias semanas o meses con el fin de extraer de ella sus brotes o yemas (**Castillo 2017; Vilchez et al. 2014**).
2. Desinfección. Luego de escoger la planta madre se empieza a extraer los fragmentos de la planta llamadas botes, yemas, pedazos de hojas, raíces y hasta semillas, Después se realiza una desinfección dentro de la lámina flujo laminar con hipoclorito de sodio pura o diluida en agua (relación 3:1) durante 5 – 15 minutos enjuagándolos entre 3 y 4 veces con agua destilada o ultra pura, todo esto con el fin de eliminar agentes patógenos del exterior de los explantes, si este proceso no se realiza, se llega a presentar hongos y bacterias de manera natural (**Castillo 2017; Domínguez et al. 2008**).
3. Introducción del material seleccionado en frascos, cajas Petri, tubos de ensayo. Una vez realizada la desinfección externa de los explantes,

estos se colocan dentro del medio de cultivo estéril, el cual pasa un periodo de tiempo (5-15 días), en donde inicia la germinación y/o regeneración de los tejidos vegetales, dando así, inicio al ciclo del cultivo *in vitro* (**Arahana et al. 2010; Castillo 2017**).

4. Multiplicación y propagación de brotes. En esta fase, los explantes que pasaron las dos fases anteriores proceden a generar brotes con varias hojas, en estas hojas se presentan yemas que al estar en contacto con el medio de cultivo logra desarrollarse, estos brotes nuevos pasan a sub-cultivarse en un nuevo medio de cultivo (**Castillo 2017; Domínguez et al. 2008; Waweru et al. 2011**).
5. Enraizamiento. Para lograr el adecuado enraizamiento se utilizan plantines de 2 cm. Los brotes que se llegan a obtener en la fase anterior se pasan a un medio de cultivo nuevo con reguladores de crecimiento, en donde se incentiva el enraizamiento y su multiplicación simultáneamente (**Castillo 2017; Murillo-Gómez et al. 2017; Salazar et al. 2013**).
6. Adaptación al medio (Aclimatación). Los explantes que llegaron a sacar raíces se vuelven sensibles a los cambios climáticos como temperatura, humedad que se presenta en los frascos, tubos de ensayos o cajas Petri. Una vez enraizados los explantes son retirados de los frascos en donde estos se ven obligados por la aclimatación a crecer en invernáculos (los estomas empiezan a funcionar) (**Castillo 2017; Díaz, et al. 2013; Kahia et al. 2015**).

Todas estas operaciones o actividades se realizan dentro de la cámara flujo laminar o en un lugar aislado con asepsia adecuada, con el fin de no afectar la calidad de los explantes dentro de los frascos con medio de cultivo.

1.3.3 Características de las plántulas in vitro

El cultivo *in vitro* presenta varias características como:

- No realizan el proceso fotosintético.
- Se genera el crecimiento en condiciones controladas y asépticas (limpias).
- Se presenta alta humedad relativa.
- Las estomas no realizan sus funciones.
- No se presentan pelos radiculares y cera en la cutícula (**Borrero 2007; Hoyos et al. 2008; Salazar et al. 2013; Vilchez et al. 2014**).

1.3.4 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento también conocidos o llamados hormonas vegetales, son sustancias químicas orgánicas que se generan de manera natural en las plantas, las cuales poseen un bajo peso molecular, siendo activas en porcentajes pequeños. Estas sustancias se encuentran involucradas directamente en la inducción y regulación del crecimiento y desarrollo de plantas. Las hormonas que se más se usan en un cultivo *in vitro* son: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas.

1. Auxinas: Estas hormonas forman parte de los grupos que son derivados indólicos, fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos. Estas hormonas se encuentran en zonas donde se presenta mayor división celular, estimulando de esta manera varias funciones fisiológicas como elongación de tallos, formación de raíces adventicias, inducción florar, diferenciación vascular e inducción a la dominancia apical (**Martin, 2015; Niño y Cotrino, 2015**).

Estas hormonas también se presentan de manera sintética como α -naftalenacético (1-ANA) y el ácido 4-diclorofenoxiacético, (2,4-D), siendo usados en la generación y desarrollo de raíces y frutos. Estas auxinas se sintetizan por medio de L-triptófano en primordio de follaje joven y semillas en desarrollo.

Las semillas tratadas con auxinas ayudan a incrementar el porcentaje de germinación y su aceleración, formación de raíces (aumento del número, calidad y uniformidad) (**Amador-Alfárez et al. 2013**).

2. Citoquininas: Estas hormonas son derivadas de adeninas o purinas, en las que la kinetina Zetina y benzilaminopurina forman parte de este grupo. Por la variación de su estructura las citoquininas se clasifican en isoprenoides y aromáticas. Estas hormonas son sintetizadas en hojas jóvenes, yemas del tallo, semillas en germinación y ápices radiculares, de donde se trasladan hacia las hojas donde son almacenadas. Esta hormona se regula con otras fitohormonas y fuentes de nitrógeno inorgánico (**Rodríguez et al. 2012**). La 6-bencilaminopurina es una citoquinina sintética del tipo Adenina, que permite la división celular, misma que junto con las auxinas ayudan en la propagación in vitro de plantas (**Domínguez et al., 2008**). Además mejora la proliferación de brotes y elongación (**Larson et al. 2017**).
3. Giberelinas: Estas hormonas representan un grupo de diterpenoides ácidos. Estas hormonas son clasificadas o identificadas con un número GA₃, GA₄, GA₅, entre otras. La giberelinas inducen el alargamiento del tallo, incremento en el diámetro radical e inducción floral. Estas hormonas se encuentran típicamente en la glucosa o en otras formas inactivas de las plantas (**Amador-Alfárez et al. 2013; Zurita-Valencia et al., 2014**).

El uso de giberelinas aumenta el tamaño de la zona meristemática subapical (aumento de la proporción de las células, las cuales se encuentran en división celular), en donde esta nueva región aporta a la elongación del tallo, Así mismo, al tener un alto contenido de giberelinas en órganos o tejidos jóvenes se produce se genera mayor biosíntesis de esta fitohormona, dando como resultado una aceleración en el crecimiento y desarrollo de las plantas (**Bari y Jones, 2009; Nemhauser et al. 2006**).

1.4 Especie vegetal (Tomate de árbol)

Generalidades y clasificación Botánica

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un cultivo perteneciente a la familia Solanaceae, género *Solanum* (Tabla 1), este cultivar es también conocido como tomate de palo, tomate cimarrón, sachatomate, tomatillo, contragallinazo o mango nórdico (Lucas et al. 2011); existen alrededor de se cultiva entre los 1000 y 3000 m.s.n.m. (Buono et al. 2018; Calvo 2009).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica

División:	Espermatofita
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum betaceum</i> (Cav.) Sendt.

(Bedoya-Reina y Barrero 2009; Chañag-Miramag et al. 2017; Sandoval y Calispa 2015)

Origen

El cultivar de tomate de árbol (*S. betaceum* (Cav.) Sendt.) es originario de los valles andinos, entre Perú, Chile, Ecuador, Bolivia y Argentina, logrando expandirse por todo el continente americano y europeo, sin embargo, entre Bolivia y norte de Argentina en los bosques de la Reserva Tucumano se ha registrado un amplia variedad genética de este cultivo (Lobo et al. 2007; Villasanti et al. 2013). Este cultivar se introdujo en África, India y Australia en el siglo XIX, sin embargo, en la segunda guerra mundial la escasez de fruta tropical indujo a un incremento productivo del tomate de árbol (Bedoya-Reina y Barrero 2009; Burgos et al. 2006).

Variedades

A pesar de que no existe una clasificación clara de las variedades existentes de tomate de árbol, se puede considerar entre las más importantes las que se nombran en la *Tabla 2*. Cabe recalcar que esta clasificación se realiza en base a la coloración que presenta el fruto (cáscara y pulpa), partiendo de un color amarillo hasta un púrpura oscuro (Ango y Chica 2013; Revelo et al. 2004):

Tabla 2. Variedades de tomate de árbol.

Variedad	Color cáscara	Color pulpa
Amarillo	Amarillo claro	Naranja claro
Negro	púrpura	Naranja-púrpura (morado)
Rojo	Rojo oscuro	Naranja medio
Mora Ecuatoriano	Morado	Naranja-púrpura
Puntón	Naranja oscuro	Naranja claro

(Buono et al. 2018; Lucas et al. 2011; Pilapaña 2013; Revelo et al. 2004)

Característica nutricional

El fruto de tomate de árbol presenta características nutricionales importantes (*Tabla 3*), puesto que ayuda a reducir el colesterol. De 100 g de fruto fresco por medio de un análisis físico-químico, se ha encontrado porcentajes altos de vitaminas (A, B6, E y C) y minerales, como lo es el beta-caroteno considerado como una provitamina A (Calvo 2009; Chacón-Cerdas et al. 2014), Además es una fuente rica en pectina, ayudando a al sistema visual e enológico (Burgos et al. 2006).

Tabla 3. Características nutricionales.

Característica	Cantidad
Calorías	80 Ca
Agua	87,9 g
Proteína	1,7 – 1,9 g
Grasa	0,1 – 0,16 g
Cenizas	0,7 – 0,8 g
Carbohidratos	10,3 – 11,6 mg

Fibra	1,1 g
Calcio	2 – 6 mg
Hierro	0,4 – 2 mg
Fosforo	22 – 36 mg
Vitamina C	20-25 %
Caroteno	150 UI
Riboflavina	0,03 mg
Ácido ascórbico	25 mg
Tiamina	0,05 mg

(Ango y Chica 2013; Buono et al. 2018; Chacón-Cerdas et al. 2014; Chañag-Miramag et al. 2017; Pilapaña 2013)

Descripción botánica

El árbol de *S. betaceum* es considerado una planta arbustiva, posee una raíz pivotante y profunda que llega a tener una profundidad de casi 1 metro, en donde los primeros 50 cm esta presenta una abundante cantidad de pelos absorbentes, cabe recalcar que esta característica solo se ve presente en plantas que se han propagado por medio de semillas, mientras que las que se propagan por estacas solamente poseen raíces superficiales (Calvo 2009; Lucas et al. 2011). Su tallo llega a medir hasta 3 metros de alto con forma cilíndrica, este se considera semileñoso con un color verdoso en su juventud y café en su madurez. Posee hojas enteras acorazonadas con un color verde oscuro y ligeramente pubescente en donde las hojas principales pueden alcanzar los 40 – 50 cm de largo y las secundaras y terciarias solo los 20 cm (Ávila 2015; León et al. 2004; Nee 1986).

Las flores se producen en las axilas sobre o debajo de las hojas, estas se presentan en forma de racimos en donde se producen como máximo 40 flores de colores variados (morado, blanco o púrpura) (Buono et al. 2018). La polinización de estas flores se realiza de manera cruzada. Los frutos miden alrededor de 8 y 5 cm de largo y diámetro, respectivamente, son considerados bayas de forma ovoide con un pedúnculo largo, el color del fruto tanto de la cáscara como de la pulpa varía dependiendo de la variedad o genotipo de tomate, los colores pueden ser amarillos, naranjas, rojos, morados o

púrpuras. Dentro del fruto se alojan alrededor de 200 o 300 semillas, estas llegan a medir entre 2 y 4 mm, poseen una forma plana y lenticular de color blanco, estas se encuentran recubiertas de un mucilago pigmentado (naranja, rojo o morado) (**Calvo 2009; León et al. 2004; Lobo et al. 2007; Lucas et al. 2011; Pazmiño 2013**).

Requerimientos edafoclimáticos del cultivo

Clima y temperatura: El óptimo de temperatura para este cultivar es de templado a templado frío, puesto que a temperaturas bajas se ve un retraso de la primera cosecha (14 meses después de su trasplante). Con respecto a la temperatura óptima, se considera que un promedio anual de 15 a 19°C facilita el desarrollo y cuaje de las flores y frutos, sin embargo, puede soportar temperaturas hasta los 13 y 24°C, si la temperatura esta entre los 12°C o menos se produce el aborto de las flores (**Calvo 2009; Revelo et al. 2004; Sandoval y Calispa 2015**).

Altitud: su rango de adaptabilidad es de 430 a 3000 m.s.n.m., sin embargo, la altitud óptima para este cultivar es entre los 1500 a 2600 m.s.n.m. (**Revelo et al. 2004; Sandoval y Calispa 2015**).

Precipitación y humedad relativa: La planta necesita alrededor de 1200 mm de precipitación anual con el fin de obtener óptimos resultados en su producción, si se tiene precipitaciones inferiores a 100 mm anuales es indispensable adicionar riego, por otro lado, si la precipitación supera los 2500 mm anuales se debe realizar sistemas de drenaje de agua con el fin de no encharcarla, puesto que puede afectar al cultivar por exceso de agua, provocando pudrición de raíces y posteriormente la muerte de la planta. El promedio de humedad relativa anual varía entre los 75 y 85% (**Burgos et al. 2006; Revelo et al. 2004**).

Fotoperiodo (radiación): En la zona Ecuatorial, por su ubicación y su clima templado, se considera que una duración lumínica anual de 12 horas, esta duración puede variar dependiendo de la época del año, sin embargo, no existe gran diferencia de horas luz puesto que lo mínimo es de 6 a 8 horas, mismas que se necesitan para el correcto desarrollo y producción de la planta (**Ávila 2015; Revelo et al. 2004**).

Vientos y granizo: El cultivo se desarrolla con normalidad en zonas libres de viento, puesto que vientos fuertes provocan la caída de flores y frutos. Otro factor a considerar

es implementar el cultivo en zonas donde no exista caída de granizo con el fin de no provocar daños en los órganos de la planta (**Buono et al. 2018; Revelo et al. 2004**).

Suelo: Necesita suelos con alto contenido de materia orgánica, buen drenaje y profundos, es importante no sembrarlos en pendientes mayores a 40%. El suelo debe poseer una textura franca, franca arenosa o franca arcillo arenosa con un pH óptimo de 6,5 a 7 (**Calvo 2009; Revelo et al. 2004; Sandoval y Calisp, 2015**).

Manejo del cultivo

Fertilización: Este cultivar necesita alrededor de 2 a 3 kg/planta de materia orgánica, la cual puede ser guano, compost, entre otros, si no existe la posibilidad de reponer la materia orgánica cada 6 meses es indispensable recompensarla con 90, 30 y 50 kg/ha de N-P-K, respectivamente (**Calvo 2009; Pazmiño 2013**).

Riego: El riego es indispensable en zonas con baja precipitación, para realizar el riego se debe tomar en cuenta la textura y estructura del suelo, edad de la planta y estado fenológico en la que se encuentra, su frecuencia dependerá de las condiciones climáticas presentes, sin embargo, es indispensable mantener un intervalo de 10 y 15 días entre riegos (**Revelo et al. 2004; Sandoval y Calispa 2015**).

Plagas y enfermedades: El tomate de árbol (*S. betaceum*) posee varios enemigos fitosanitarios, sin embargo, en la *Tabla 4* se describen los de mayor importancia:

Tabla 4. Principales plagas y enfermedades que atacan al cultivar de *S. betaceum*

PLAGAS		
Agente causal	Nombre común	Lugar de daño
<i>Leptoglossus zonatus</i>	Chinche foliado o patón	Fruto-Flores
<i>Aphis sp.</i> y <i>Myzus sp.</i>	Pulgones o áfidos	Follaje -fruto
<i>Agrotis sp.</i>	Orugas defoliadoras	Tallo
<i>Phyllophaga sp.</i>	Cutzo	Raíz
<i>Meloidogyne incognita</i>	Nematodo	Raíz
ENFERMEDADES		

Agente causal	Nombre común	Lugar de daño
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Antracnosis	Fruto
<i>Fusarium oxysporum</i>	Muerte descendente	Follaje-tallos-raíz
<i>Phytophthora infestans</i>	Lancha o tizón tardío	Follaje-ramillas
<i>Fusarium solani</i>	Mancha negra del tronco	Tallos- ramas
<i>Oidium sp.</i>	Cenicilla	Follaje
<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre	Flor-fruto

(Buono et al. 2018; Calvo 2009; León et al. 2004; Revelo et al. 2008; Revelo et al. 2004)

Podas: El tomate de árbol necesita podas ligeras al momento que tenga aproximadamente 50 cm de altura, este procedimiento se realiza con pinzamiento, es decir, se eliminan los chupones del tallo y las ramas que se encuentren secas o enfermas. En producción se eliminan las ramas secas y viejas, con el fin de generar ramificaciones bien distribuidas y fuerte, que soporten el peso de los frutos. Existen 4 tipos de podas: de formación, sanitaria y mantenimiento, de renovación y poda de copa (Ávila 2015; Burgos et al. 2006).

Cosecha: Esta labor comienza a partir del octavo y décimo mes después del trasplante, en donde los frutos cosechados son los que ya han llegado a su estado de madurez fisiológica, es decir, tomates que ya han pasado 5 meses desde su cuajado (Ávila 2015; Burgos et al. 2006; Revelo et al. 2004).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Equipos, materiales y reactivos

2.1.1. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Purificador de agua
- Microondas
- Refrigeradora
- pH-metro
- Plato caliente con agitador magnético
- Balanza analítica
- Cronometro
- Micropipetas

2.1.2. Materiales

- Cajas Petri
- Magentas
- Vasos de precipitación 500 y 100ml
- Jarra plástica 1l
- Probeta de 1000ml
- Bandeja de aluminio
- Estantes
- Frascos de vidrio 1000 y 500ml
- Frascos de vidrio con goteros
- Matraz aforado de 100ml
- Mechero de alcohol
- Fósforo

- Pinzas metálicas
- Tubos Falcón
- Papel aluminio
- Plástico de cocina
- Cinta de parafina
- Tijera
- Puntas azules estériles para Micropipetas
- Masking
- Papel servilleta
- Atomizador
- Gradilla
- Semillas de tomate de árbol
- Brotes de tomate de árbol

2.1.3. Reactivos

- Murashige y Skoog
- Fungicida Benomil
- Sacarosa
- Phytigel
- Hipoclorito de sodio (NaClO) 5%
- Hidróxido de sodio (NaOH) 2.5%
- Cloruro de mercurio (HgCl₂) 1%
- Etanol (C₂H₅OH) 70%
- Solución de ácido giberélico (GA3) 500ppm
- Agua esterilizada
- Ácido naftalenacético (ANA) 0.2 mg/l; 5uM/l
- 6-bencilaminopurina (BAP) 0.2 mg/l; 5uM/l
- Ácido giberélico (GA3) 0.2 mg/l; 40uM/l
- Kinetina 40uM/l
- Tween 20

2.2. Factores de estudio

Los factores investigados fueron:

2.2.1. Medios de cultivo

Medio de cultivo para semillas y explantes: La elaboración de los diferentes medios de cultivo se realizaron mediante la composición propuesta por **Murashige y Skoog** en el cual se adicionará fitoreguladores de crecimiento según el planteamiento (*Tabla 5*).

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo

Medio	MS g/l	Phytigel g/l	Sacarosa g/l	Fitohormonas	pH
M1	4.4	2.7	30	Sin Hormona	5.8
M2	4.4	2.7	30	ANA 0.2 mg/l+ BAP 0.2 mg/l+ GA3 0.2 mg/l	5.8
M3	4.4	2.7	30	ANA 5 uM/l+ BAP 40 uM/l+ KIN 0.2 uM/l	5.8

2.2.2. Métodos de desinfección

Desinfección de las semillas: Se utilizaron Falcons de 15 ml de volumen y con la ayuda de una pipeta se colocaron dentro las soluciones desinfectantes; todos los procesos de desinfección se lo realizo dentro de la cámara de flujo laminar. A continuación, se detalla los métodos de desinfección empleados.

Tabla 6. Método 1 de desinfección de la semilla.

Método	D1
Etanol 70%	10 min
Lavado H2O estéril	3 veces
NaOH 2.5%	30 seg
Lavado H2O estéril	3 veces

(NaClO) 5% + 1 gota tween 20	5 min
Lavado H2O estéril	5 veces

Tabla 7. Método 2 de desinfección de la semilla

Método	D2
Etanol 70%	10 min
Lavado H2O estéril	3 veces
HgCl2 1%	5 min
Lavado H2O estéril	3 veces
(NaClO) 5% + 1gota tween 20	5 min
Lavado H2O estéril	5 veces

2.2.3. Estratificación de las semillas

Tabla 8. Método de estratificación de la semilla.

Semilla	Método
S1	Estratificación a 4°C x 48 h
S2	Inmersión en GA3 500ppm x 12h
S3	Control

2.2.4. Desinfección de los explantes

Previo a los métodos de desinfección los brotes se sumergieron en un antifúngico por 10 minutos.

Tabla 9. Método 1 de desinfección de los brotes

Método	D1
Etanol 70%	2 min
Lavado H2O estéril	3 veces
NaOH 2.5%	10 seg

Lavado H2O estéril	3 veces
(NaClO) 5% + 2gota tween 20	2 min
Lavado H2O estéril	5 veces

Tabla 10. Método 2 de desinfección de brotes.

Método	D2
Etanol 70%	2 min
Lavado H2O estéril	3 veces
HgCl2 1%	1 min
Lavado H2O estéril	3 veces
(NaClO) 5% + 2 gota tween 20	2 min
Lavado H2O estéril	5 veces

2.3. Características del Lugar

El ensayo se realizó a nivel de laboratorio, mismo que presento las siguientes características:

2.3.1. Ubicación del ensayo

El trabajo a investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca a una altitud de 2800 msnm con una temperatura interna promedio de 22°C.

2.3.2. Recolección y almacenamiento de las semillas

La recolección se la realizó en un huerto establecido de dos años variedad amarillo Puntón, ubicado en el Cantón Patate, Provincia de Tungurahua. Se seleccionó los mejores frutos maduros de los árboles que presentaron mejor apariencia fenotípica libres de plagas y enfermedades, con una excelente productividad. Posteriormente se dejó en reposo aproximadamente unos 15 días para preceder a extraer la semilla. Una vez extraído se fermentó la semilla

por una semana y se procedió al lavado y secado al ambiente bajo una cubierta plástica por dos días.

2.4. Metodología de la investigación

2.4.1. Tratamientos

Se detalla los tratamientos utilizados (Tabla 8), considerando que estos son el resultado de la combinación de los factores de estudio anteriormente citados.

Tabla 11. Tratamientos

Para semillas				
Tratamiento	Símbolo	Medio	Desinfección	Semilla
1	S1D1M1	M1		S1
2	S1D1M2	M2	D1	
3	S1D1M3	M3		
4	S1D2M1	M1		S1
5	S1D2M2	M2	D2	
6	S1D2M3	M3		
7	S2D1M1	M1		S2
8	S2D1M2	M2	D1	
9	S2D1M3	M3		
10	S2D2M1	M1		S2
11	S2D2M2	M2	D2	
12	S2D2M3	M3		
13	S3D1M1	M1		S3
14	S3D1M2	M2	D1	
15	S3D1M3	M3		
16	S3D2M1	M1		S3
17	S3D2M2	M2	D2	
18	S3D2M3	M3		
Para explantes				
Tratamiento	Símbolo	Medio	Desinfección	Explante

1	E1D1M1	M1		
2	E1D1M2	M2	D1	
3	E1D1M3	M3		
4	E1D2M1	M1		E1
5	E1D2M2	M2	D2	
6	E1D2M3	M3		

2.5. Diseño experimental

Para la semilla se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3x2x3 (semilla x desinfección x medio de cultivo), mientras que para los brotes se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 2x3 (desinfección x medio de cultivo), ambos con 10 repeticiones. Los datos obtenidos pasaron por un análisis de varianza (ADEVA), y aquellos que presentaron significancia fueron comparados mediante la prueba de medias según Tukey (5%).

2.6. Variables respuesta

2.6.1. Semillas y explantes

A partir del cuarto día de crecimiento se tomó muestras en intervalos de 8 días, hasta el día 60, realizando las siguientes evaluaciones:

1. Porcentaje de germinación de semillas: Según **Gracia-López et al. (2016)**, el porcentaje de germinación se realizó contabilizando cada una de las semillas germinadas, el resultado se obtiene dividiendo el número total de semillas germinadas para el número total de semillas sembradas multiplicando por 100.

$$\% E = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} * 100$$

2. Porcentaje de contaminación de semillas y explantes: Según **Gracia-López et al. (2016)**, el porcentaje de contaminación se realiza contabilizando el número de semillas o explantes contaminados las cuales se dividen para el total de semillas o explantes totales y se multiplica por cien.

$$\% C = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas o explantes contaminadas}}{N^{\circ} \text{ de semillas o explantes totales}} * 100$$

3. Altura de las plantas (cm) en semillas y explantes: Según como lo mencionan **Moreno-Bermúdez et al. (2017)**, la altura (cm) de las plantas *in vitro* tanto de semillas como de explantes se realiza utilizando una regla graduada tomando como punto de partida la base de la planta hasta la inserción en el pseudotallo de la última hoja.
4. Número de hojas verdaderas en plantas de semillas y explantes: Según **Zurita-Valencia et al. (2014)**, para conocer el número promedio de hojas verdaderas se realiza en cada observación un conteo por semilla o explante, se divide para el total de semillas o explantes.
5. Número de brotes y raíces en los explantes: Según lo menciona **Zurita-Valencia et al. (2014)**, para conocer el número promedio de brotes y raíces se realiza un conteo total, el valor obtenido se divide para el número total de explantes.

2.7. Manejo del experimento

2.7.1. Siembra de las semillas

Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomaron 5 semillas por caja Petri, con la ayuda de una pinza quirúrgica esterilizada por calor con un mechero, una vez colocado las semillas sobre la superficie del agar se selló con cinta para film y se llevó al área de

germinación y crecimiento, manteniendo en condiciones de 16h luz y 8 h de oscuridad, con una temperatura de 18 a 22 °C y una humedad relativa (HR) de 47 a 56%.

2.7.2. Recolección y almacenamiento de los explantes

De la misma forma se recolectó los brotes apicales de las mejores plantas y se mantuvo en un recipiente con tapa para impedir la deshidratación de los mismos hasta su utilización en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, siendo su tiempo de almacenamiento no mayor a las 48H.

2.7.3. Siembra de los explantes

Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomaron 5 explantes por magenta, con la ayuda de una pinza quirúrgica estéril, una vez colocado la tapa sellamos con cinta para film y se lleva al área de germinación y crecimiento, manteniendo en condiciones de 16h luz y 8 h de oscuridad, con una temperatura de 18 a 22 °C y una humedad relativa (HR) de 47 a 56%.

2.7.4. Medio de cultivo para semillas y explantes.

Para elaboración de los diferentes medios de cultivo se utilizó agua destilada basado en la composición propuesta por Murashige y Skoog (MS) y se adicionó los fitoreguladores de crecimiento según los tratamientos propuestos. El pH fue llevado a 5,8 y posteriormente se adiciono el phytigel según el planteamiento (*Tabla 5*). Luego se autoclavó los medios de cultivo a 121 °C por 30 minutos y se dispense en las cajas Petri (25ml) y magentas (90ml) dentro de la cámara de flujo laminar para conservar la esterilidad.

2.8. Procesamiento de la información

Se realizó un análisis de varianza (ADEVA) con la prueba de significación de Tukey (5%) para lograr interpretar los resultados alcanzados utilizando el programa Infostat versión 2018.

2.9. Hipótesis

La diferente composición del medio de cultivo tiene influencia directa sobre el desarrollo de la plántula de Tomate de árbol (*S. betaceum*) *in vitro*.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis e interpretación de los resultados en Semillas

3.1.1. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el porcentaje de germinación en las semillas S1, S2 y S3

Para el tratamiento S1 tal como se observa en la **Figura 1** junto con la variable experimental M1 (testigo), a partir del día 12 tanto con el método de desinfección D1 y D2 los porcentajes son del 2 y 4% respectivamente, en comparación con el M2 y M3 en los que se obtuvo porcentajes de germinación únicamente con el tratamiento de desinfección D1 de 4% para M2 y 2% para M3.

En el tratamiento M2 se eviencia un efecto similar con el método de desinfección D1 y D2 obteniendo un máximo porcentaje del 85%, es decir que el tratamiento presenta un incremento del 20% en comparación con el M1, mientras que el M3 presenta la misma tendencia con el tratamiento D1 y D2 llegando a valores del 86%, presentando diferencia numérica mas no estadística en comparación con el M2.

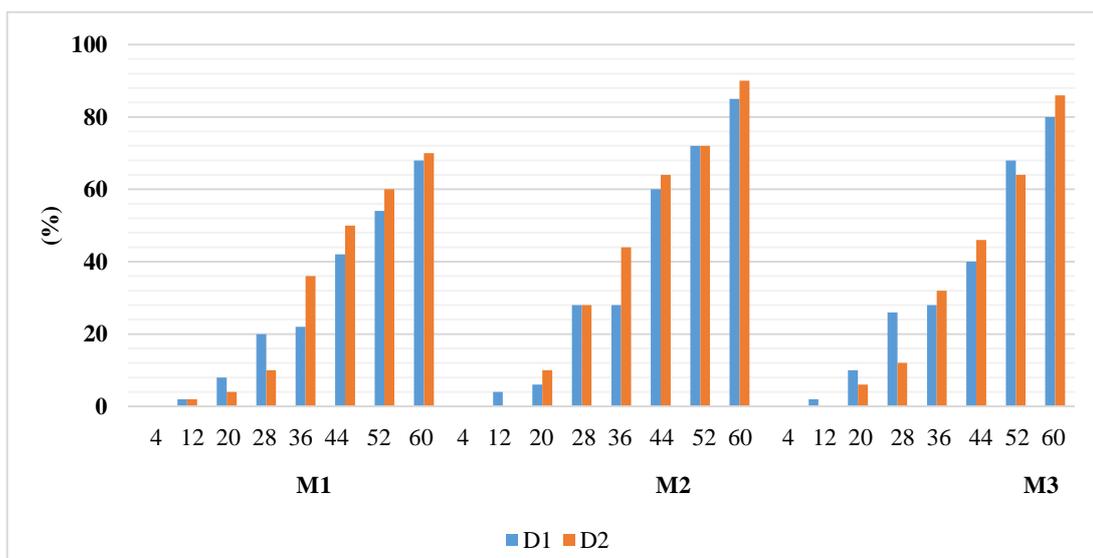


Figura 1. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En el S2 (**Figura 2**) a los 12 días presenta porcentajes entre 4 y 6% en los medios de cultivo M2 y M3, en el M1 se puede observar que el proceso de germinación empieza a partir del día 28 con 18% como porcentaje máximo. De manera general, la compasión del M2 presenta el valor máximo de germinación a los 60 días del 90% siendo superior a comparación de los otros medios de cultivo, mientras que el M1 tan solo presentó un 64% siendo el más bajo de entre todos los tratamientos en estudio. En cuanto a la variable desinfección no existe una marcada diferencia significativa entre el D1 y D2, sin embargo, en la mayoría de tratamientos es ligeramente superior el D2.

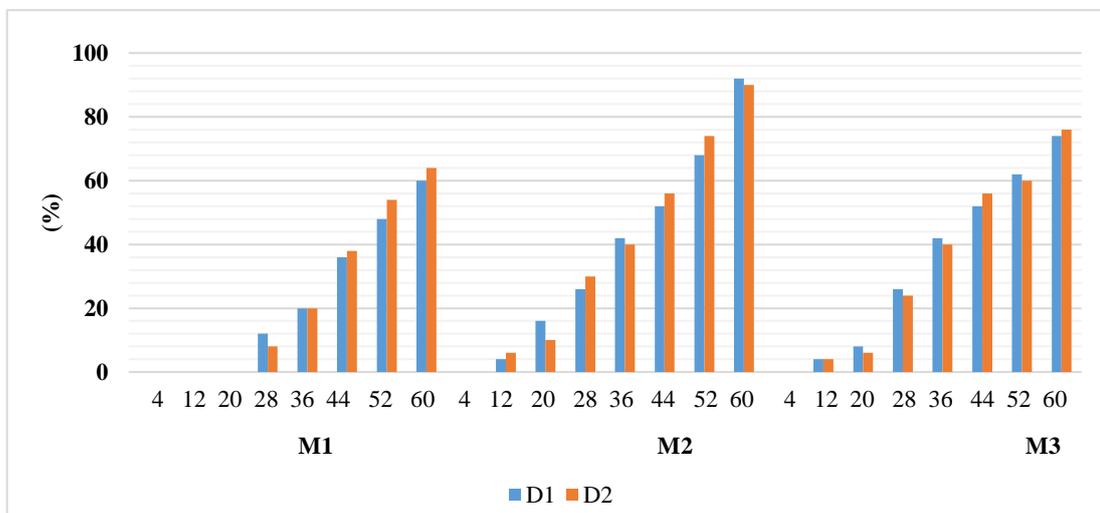


Figura 2. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S3 (**Figura 3**) con la compasión de medio de cultivo M1 no se observó porcentajes de germinación en los primeros 20 días (misma tendencia observada en la S1 y S2 siendo un aspecto relevante a considerar). En el M2 y M3 se observan una tendencia similar desde el doceavo día para ambos métodos de desinfección (D1, D2); en el M2 se obtuvo un porcentaje de germinación del 90% al día 60 y en el M3 del 78%. La diferencia es del 28,26 y 22,22% superior en comparación con el M1. En cuanto a la variable desinfección no existe una marcada diferencia significativa entre el D1 y D2, sin embargo, en la mayoría de tratamientos es ligeramente superior el D2 para M1 y M2.

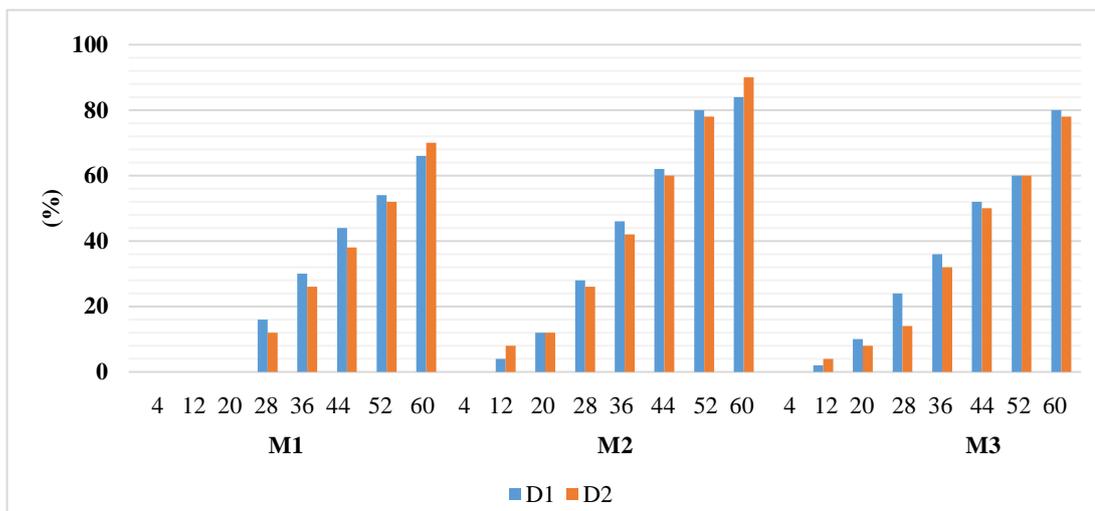


Figura 3. Porcentaje (%) promedio de germinación en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

De manera general se puede evidenciar que tanto para la S2 y S3 en el medio M1 la germinación se ve retardada (hasta los 28 días) frente a los otros medios de cultivo evaluados, donde se obtiene resultados desde los primeros 4 días. Las semillas tratadas S1 y S2 presentan los más altos porcentajes de germinación en M2 y seguido en el M3. En cuanto al proceso de desinfección no existe una marcada diferencia significativa entre el D1 y D2, sin embargo, en la mayoría de tratamientos es ligeramente superior el D2.

3.1.2. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el porcentaje de contaminación en las semillas S1, S2 y S3.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre el porcentaje de contaminación (*Figuras 4, 5 y 6*). En la S1 con el método de desinfección 1 y 2 se pudo observar porcentajes de contaminación bajos frente al M1, con valores de hasta 6, 58% a los 60 días en el M2, así mismo el M3 con valores de máximo un 18, 62% 60 días, mientras que el M1 presentó valores entre 8, 68% y 12, 74%, con el D1 y D2, respectivamente.

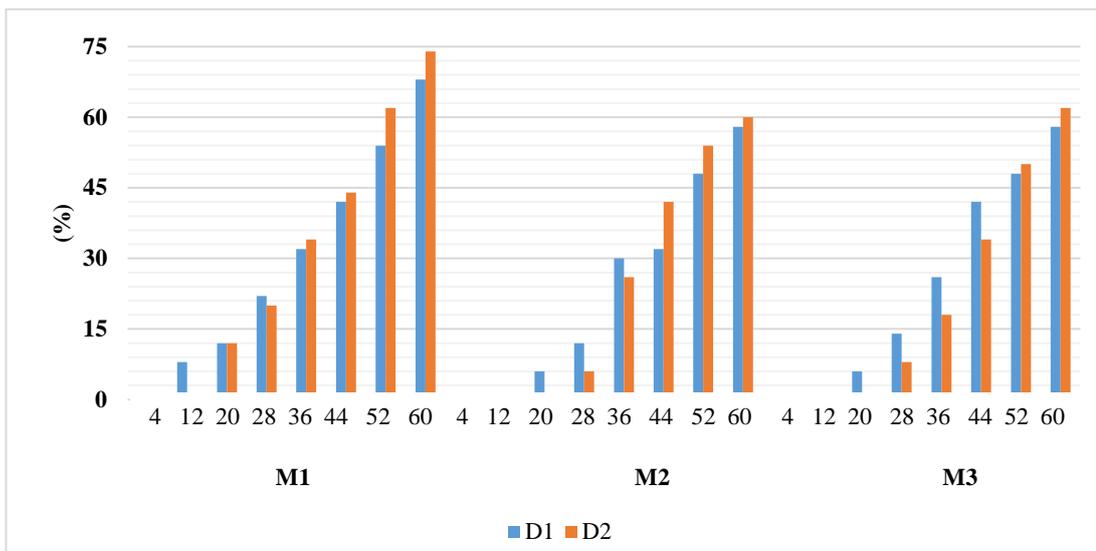


Figura 4. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S2 con el método de desinfección D1 se obtuvo menos porcentaje de contaminación en los tres medios de cultivo en comparación con el D2, sin embargo, el M1 presentó valores de contaminación más altos (10, 60% y 10, 62%) en comparación con el M2 (2, 48% y 4, 52%) y M3 (6, 54% y 8, 56%) entre los 20 y 60 días, respectivamente.

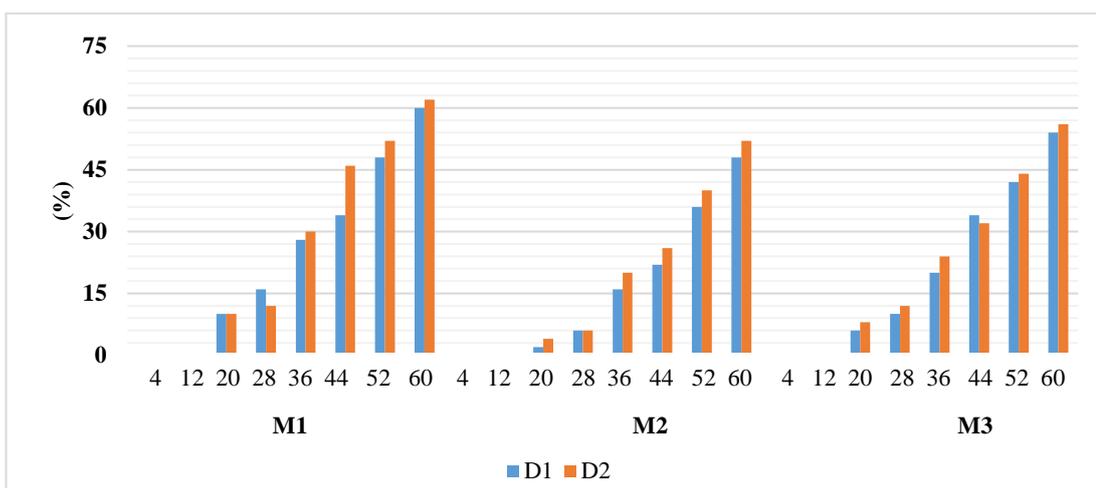


Figura 5. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S3 con el M2 y M3 se obtuvo valores de 48% y 54% con el D1, mientras que con el D2 se obtuvo porcentajes de 52 y 56% respectivamente a los 60 días. El M1

presento porcentajes altos de contaminación entre 12, 70% con el D1 y 14, 74% con el D2 entre los 20 y 60 días, respectivamente.

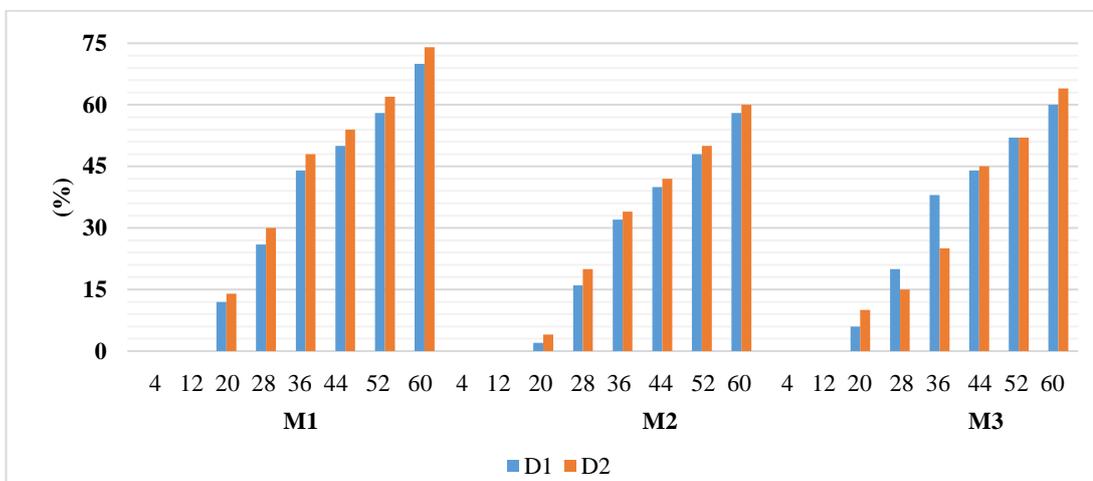


Figura 6. Porcentaje (%) promedio de contaminación en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

3.1.3. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre la altura (cm.) en las semillas 1, 2 y 3.

Se observó un efecto marchante del método de desinfección sobre el desarrollo de las plántulas (altura promedio cm) representado en las **Figuras 7, 8 y 9**. En el M2 se obtuvo en ambos métodos de desinfección mayor altura con valores de hasta 1,18 cm a los 60 días con el D1, presentando un incremento del 41% frente al M1 que llegó a obtener valores de hasta 0,70 cm a los 60 días. El M3 presentó valores superiores a M1, pero inferiores a M2 con 0,91 cm al final de la experimentación

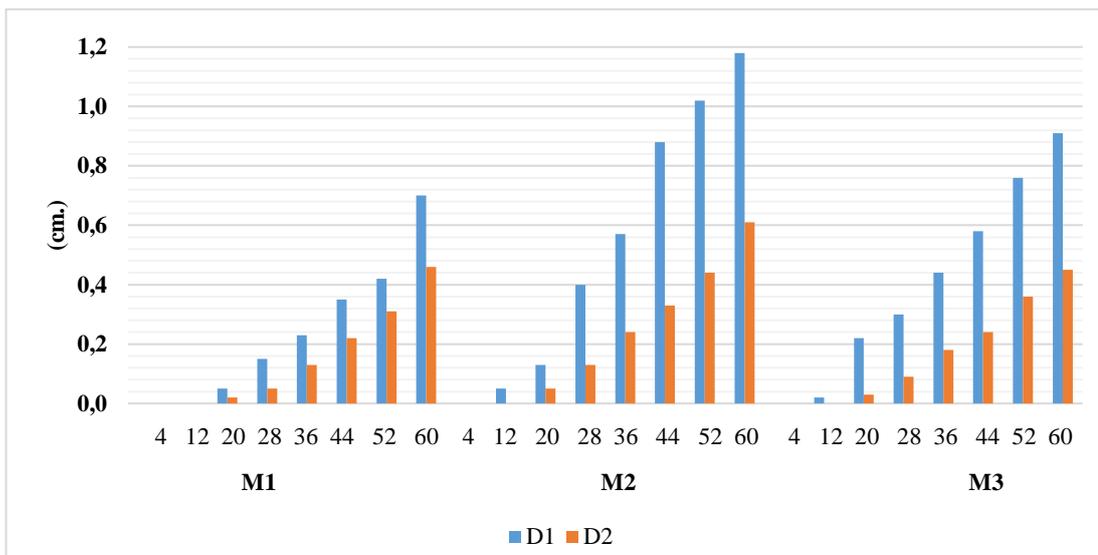


Figura 7. Altura (cm.) promedio en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S2 con los métodos de desinfección 1 y 2 y en combinación con el medio de cultivo M2 se obtuvieron alturas promedio superiores al M1 con valores de hasta 2,42 cm (D2) y 3,35 (D1) a los 60 días, mientras que el M1 presento valores de 0,65 cm (D2) y 2,29 (D1) a los 60 días.

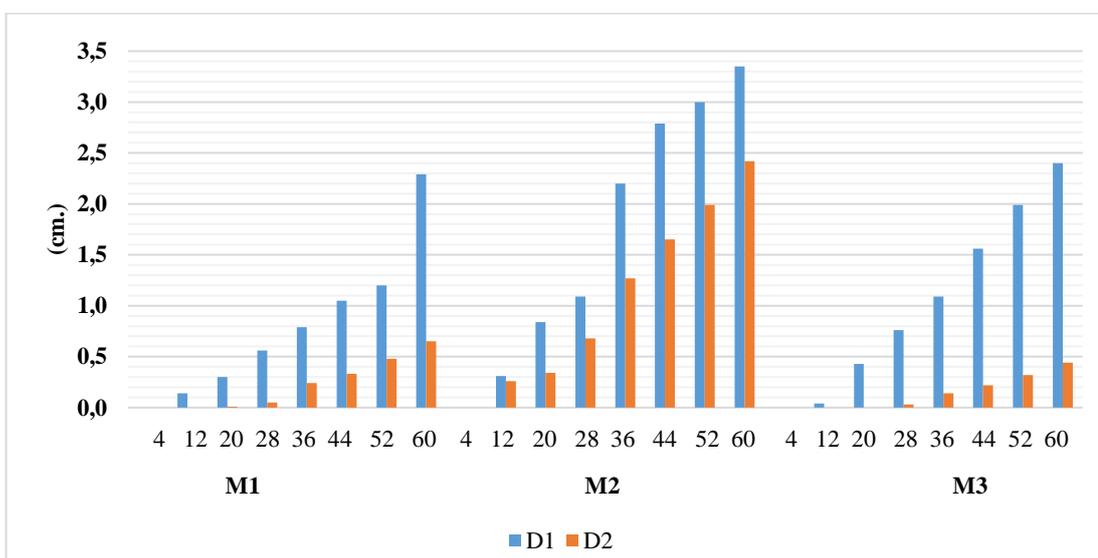


Figura 8. Altura (cm.) promedio en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S3 se evidencia que con el D1 y D2 en el medio de cultivo M2 los valores superiores respecto a los demás tratamientos (1,0 cm en D1 y 0,87 cm en D2) en comparación al M1 cuyo valor máximo es de 0,48 cm en D2, y M3 con 0,64 cm en D1.

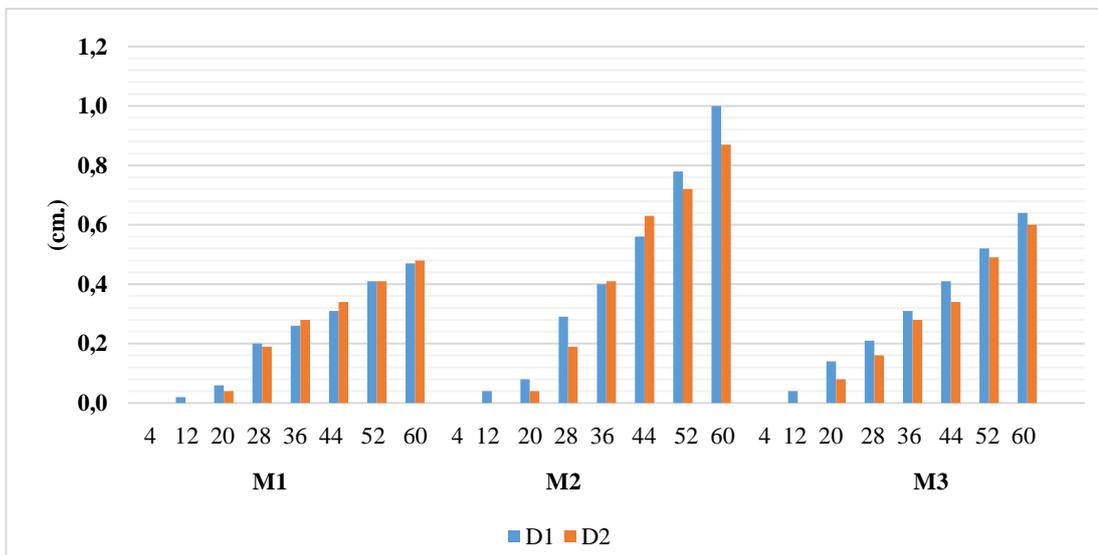


Figura 9. Altura (cm.) promedio en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En resumen, de este análisis donde se evaluó el desarrollo de la planta mediante altura promedio se observa que el tratamiento de desinfección tiene un efecto marcante especialmente en S1 y S2 con el tratamiento D1, en el cual se obtuvo mayor altura promedio. En lo que a medio de cultivo se refiere, el mejor tratamiento es aquel cuya composición está el M2.

3.1.4. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de hojas verdaderas en las semillas S1, S2 y S3.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre el número de hojas verdaderas (*Figuras 10, 11 y 12*). Para el S1, el M2 y M3 presentaron valores superiores a M1 tanto con el método de desinfección D1 y D2, con un promedio de hojas verdaderas de 10,5 y 9,6 respectivamente en el M2, mientras

que para el M3 fue de 9,8 (D1) y 9,2 (D2) a los 60 días. El M1 presento valores promedios de hasta 5 con ambos métodos de desinfección.

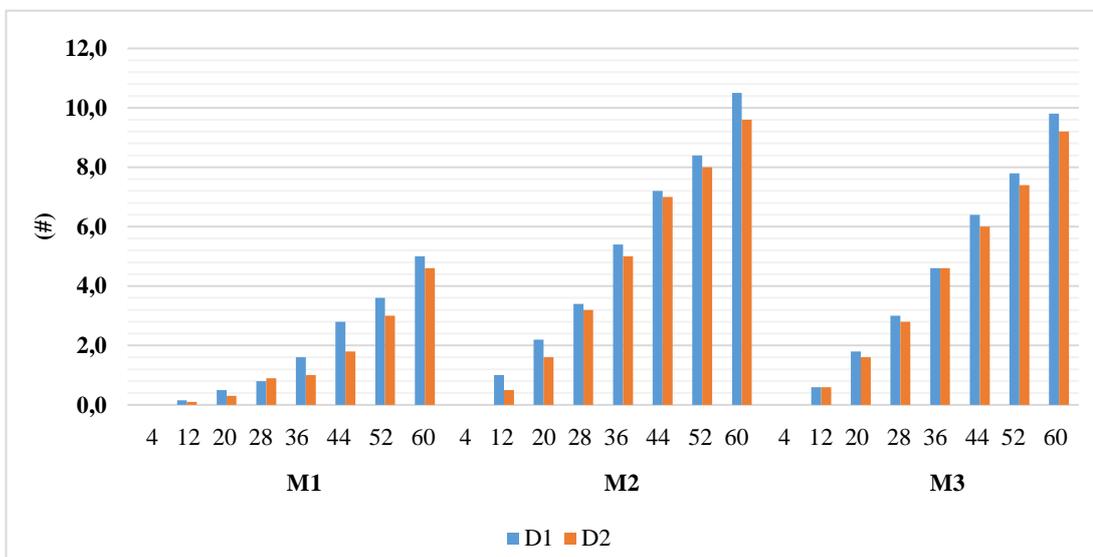


Figura 10. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 1 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo

En la S2 con el medio de cultivo M2 se observó un numero promedio de hojas verdaderas superior al M1 y M3 con ambos métodos de desinfección, en el caso de M1 los valores fueron de 11,5 a los 60 días de experimentación, mientras que en M3 los valores fueron de hasta 10,0. No se observó un efecto marcante en el método desinfección de esta variable.

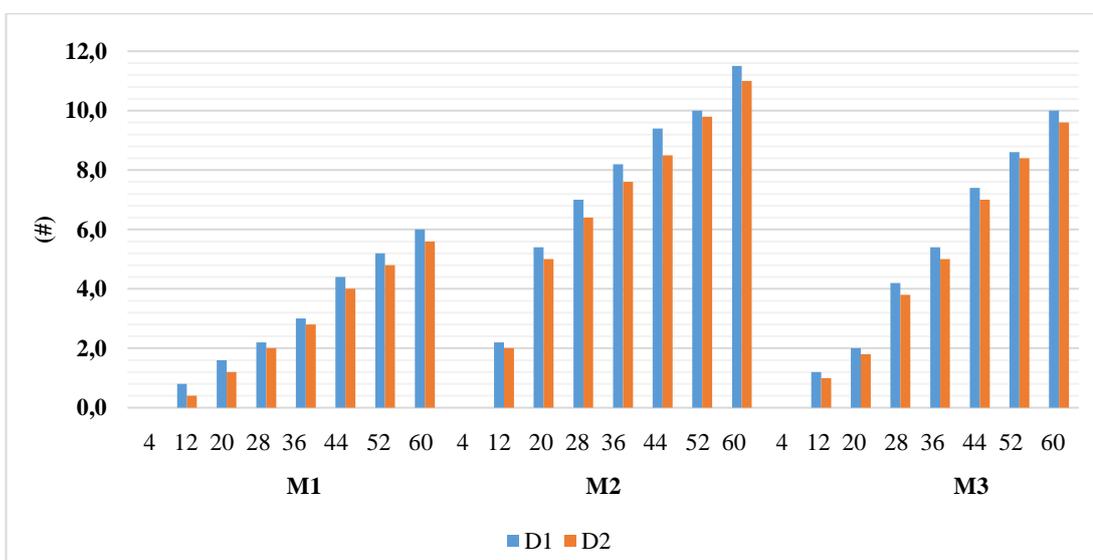


Figura 11. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 2 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En la S3, el medio de cultivo M2 con el método de desinfección 1 y 2, presento valores promedios de hojas verdaderas de 11,0 y 9 respectivamente, con un incremento del 87, 36% y 92, 36% en comparación al M1 (7, 0) y M3 (9,1). Si existe una ligera diferencia en cuanto al método de desinfección siendo superior el D1.

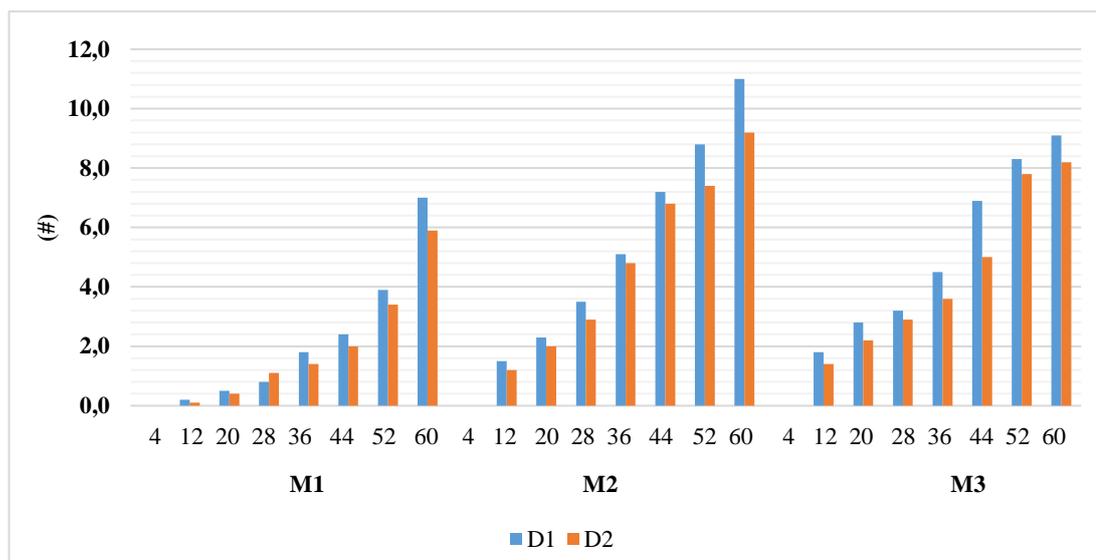


Figura 12. Numero de hojas verdaderas promedio en la semilla 3 tratada con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

De manera general se observa que medio de cultivo M2 permite mayor número de hojas verdaderas tanto para S1, S2 y S3, seguido del M3 y finalmente M1. Por otro lado, si existe diferencia en cuanto al método de desinfección siendo ligeramente superior el D1.

3.1.5. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de brotes en explantes.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre el número de brotes en explantes (**Figura 13**). El M2 presento valores de 0,35 – 1,5 y 0,2 – 1,3 entre los 12 y 60 días con el D1 y D2, respectivamente, valores superiores a M3 el cual presento un numero de brotes promedio de 0,2 – 1,1 y 0,15 – 1.

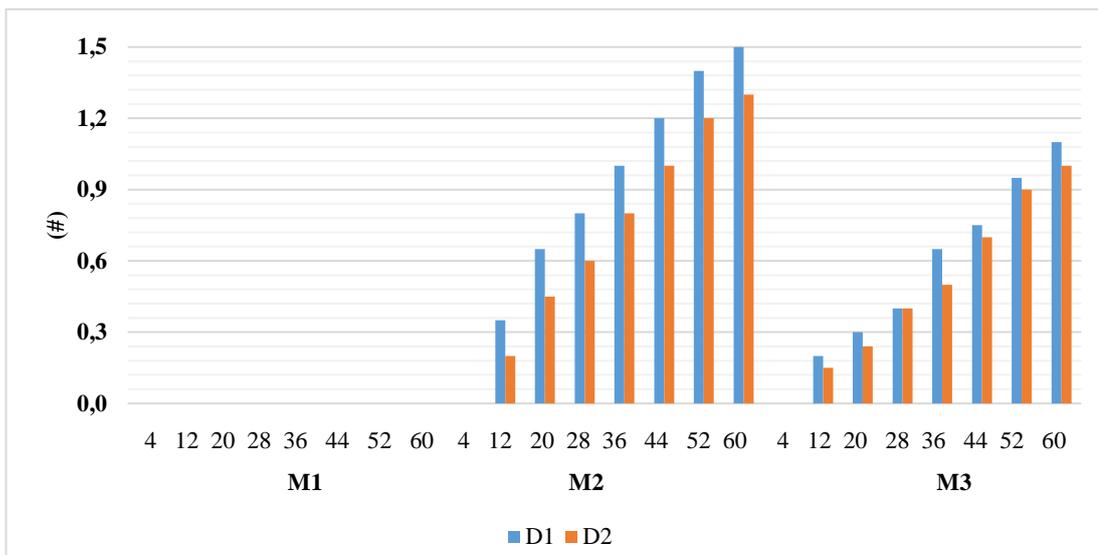


Figura 13. Numero de brotes promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

3.1.6. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre la altura de explantes.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre la altura promedio de explantes (*Figura 14*). El M2 presenta alturas promedio con un incremento del 23 – 45% y 10 – 45% con valores de 0,35 – 11,9 cm y 0,2 – 10,8 cm entre los 20 y 60 días para D1 y D2, respectivamente, en comparación con M3 que presenta valores de 0,27 – 6,6 cm y 0,18 – 5,9 cm entre los 20 y 60 días, respectivamente.

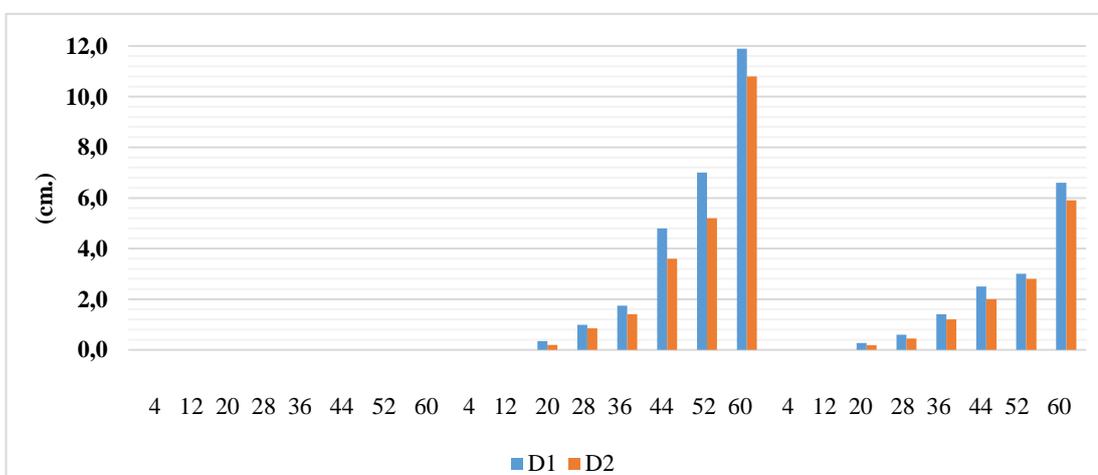


Figura 14. Altura (cm.) promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

3.1.7. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de hojas verdaderas en explantes.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre la altura promedio de explantes (*Figura 15*). El medio de cultivo 2 entre los 20 y 60 días presento valores de 0,3 – 2,0 y 0,2 – 1,8 para el D1 y D2, respectivamente, mientras que el M3 presento valores promedios de 0,15 – 1,5 y 0,1 – 1,4 para el D1 y D2 entre los 20 y 60 días, respectivamente.

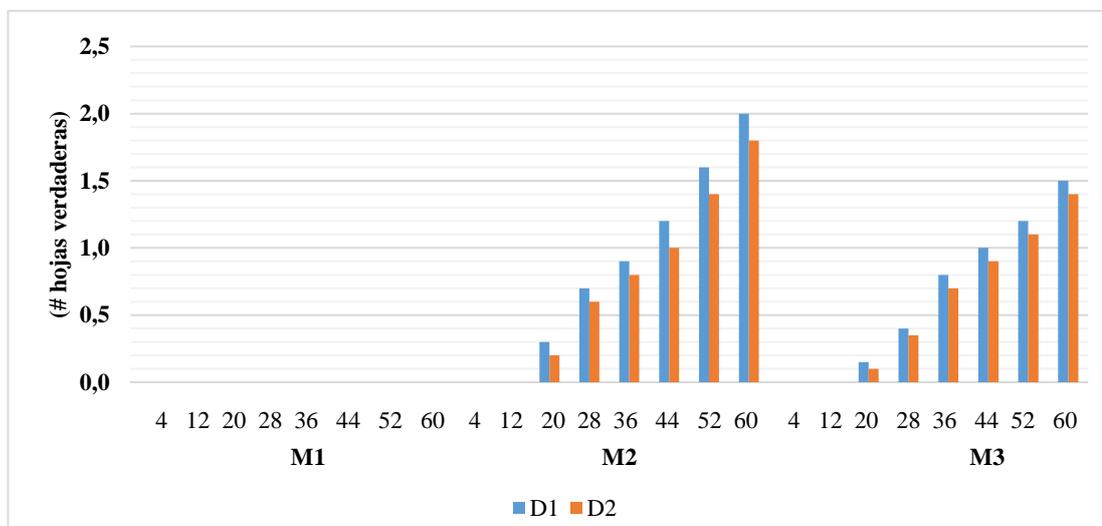


Figura 15. Numero de hojas verdaderas promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

3.1.8. Influencia del medio de cultivo y método de desinfección sobre el número de raíz en explantes.

Se observó efecto tanto del método de desinfección como del medio de cultivo sobre el número de raíz promedio en explantes (*Figura 16*). M2 y M3 presentaron una reducida diferencia con respecto al número de raíz, presentando valores de 3,3 (D1) y 3,2 (D2) para M2, mientras que para M3 valores de 3,2 (D1) y 3,0 (D2) a los 60 días de estudio. El M1 no presenta número de raíz en ambos métodos de desinfección Cabe recalcar que en los explantes no se presentó porcentajes de contaminación en ningún de los medios de cultivos 1.

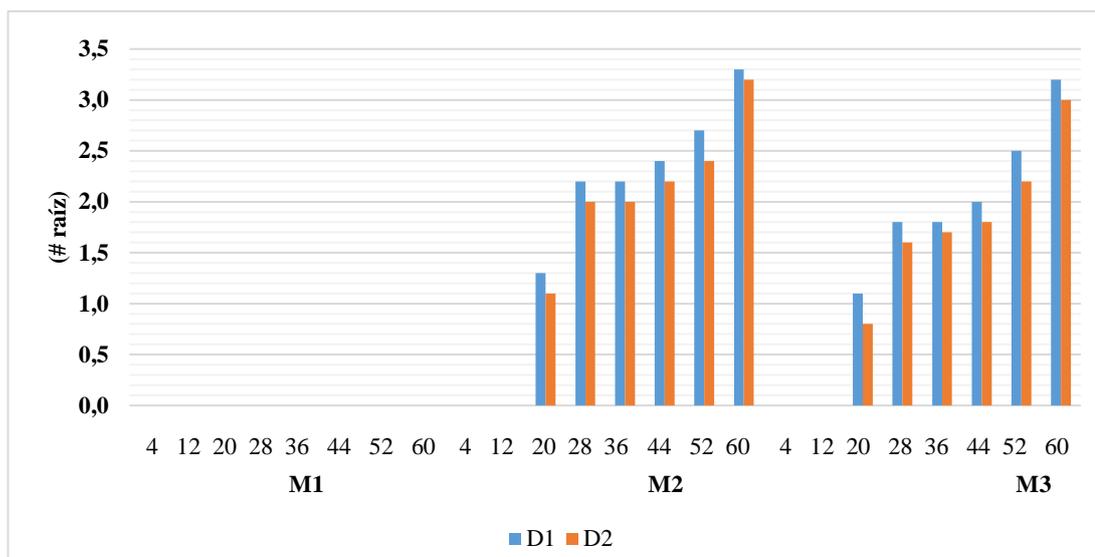


Figura 16. Número de raíz promedio en explantes tratados con dos métodos de desinfección en 3 medios de cultivo.

En M1 no se presenció crecimiento de brotes, número de hojas verdaderas ni raíces en ambos métodos de desinfección, esto debido a que los explantes se encontraron bajo un medio de cultivo que no presentaba hormonas de crecimiento.

3.2 Discusión de los resultados

Porcentaje de germinación de las semillas

De manera general, las tres semillas de tomate de árbol respondieron positivamente a ambos métodos de desinfección junto a los tres medios de cultivos. Sin embargo, el medio de cultivo 2 presentó los mejores resultados sobre el porcentaje de germinación, tomando en cuenta que este porcentaje es un indicador de calidad de las semillas (Gracia-López et al., 2016). Las tres semillas lograron obtener los mejores resultados, sin embargo, la que más destacó fue la semilla 2 en el medio de cultivo 2, a los 60 días en comparación al M1 (tratamiento o testigo). Estos porcentajes fueron similares entre los 62 días a los reportados por Niño y Cotrino (2015), que exhibe resultados del 95% en semillas de tomates de árbol de dos años de edad.

El M2 expresa los porcentajes más altos de germinación en la semilla 2, esto puede deberse al contenido de Auxinas (ANA- α -naftalen-acético) y giberelinas (GA3) que

ayudan en la aceleración de su germinación, brindando de esta manera mayor porcentaje de semillas germinadas, así como lo mencionan **Martin (2015); Zurita-Valencia et al. (2014)** y **Amador-Alfárez, Díaz-González, Loza-Cornejo y Bivián-Castro (2013)**.

Porcentaje de contaminación de las semillas y explantes

El medio de cultivo 2 presento los mejores resultados con respecto al porcentaje de contaminación en las tres semillas de tomate de árbol, siendo la semilla 2 quien obtuvo menos porcentajes de contaminación bajo los dos métodos de desinfección, tomando en cuenta que la contaminación es causada por microorganismos fitopatógenos siendo la causa principal de pérdidas de plantas in vitro, así como lo mencionan **Alvarado-Capó et al. (2003)**. En cuanto a los explantes no se presentó ningún tipo de contaminación, siendo 0% durante los días de observación, por ser muestras de plantas jóvenes (**Domínguez et al. 2008**). El tratamiento S2D1M2 logró presentar porcentajes bajos de contaminación a los 60 días en comparación con el M1, estos porcentajes fueron relativamente superiores a los reportados por **Morales (2016)**, presentando porcentajes promedios de 16% de contaminación en *Solanum caripense* utilizando alcohol 30% + NaClO 30% + H₂O₂ 7%.

El M2 presento porcentajes bajos de contaminación en la semilla, esto puede atribuirse al método de desinfección usado, puesto que al utilizar concentración de NaClO al 5% que junto con BAP se mantiene una ligera estabilidad en el porcentaje de contaminación, sin embargo, el tiempo de desinfección de las semillas puede inferir en que las semillas sigan presentando microorganismos fúngicos y bacterias que se propagan rápidamente en un medio de cultivo rico en sacarosa, así como lo mencionan (**Domínguez et al. 2008; Pérez-Alonso, Capote, Pérez, Gómez y Jiménez 2015; Uribe, Delaveau, Garcés y Escobar 2008**). Sin embargo, en los explantes al no presentar contaminación se presume que es por la fuente del material utilizado (material joven) así como lo menciona **Alvarado-Capó et al. (2003)**.

Altura (cm.) en plantas de semilla y explantes

Para la altura (cm.) la semilla 2, método de desinfección 1 y el medio de cultivo 2 presento valores superiores en comparación al resto de tratamientos, la altura a es considerada como una de las características morfológicas más importantes en cultivos *in vitro*, así como lo mencionan **Cantero (2014); Uribe- Moraga y Cifuentes (2004)**. A los 60 días de la S2 junto con el M2 presento alturas superiores al M1, estas alturas fueron inferiores a las mencionadas por **Ortega-Martínez, Ocampo-Mendoza, Martínez-Valenzuela, Pérez-Serrano y Sánchez-Olarte (2013)**, con valores promedios de 16,8 cm en tomate riñón, tratados con 10000 µg/L, pero valores similares a la altura de los explantes.

Al presentar el M2 mejores alturas se presume que la aplicación de giberelinas en el medio de cultivo y en la estratificación de la semilla, inducen a un mayor crecimiento en su altura **Serna, Hurtado-Salazar y Ceballos-Aguirre (2017)**, así mismo **Bohórquez-Sandoval, Álvarez-Herrera y Niño-Medina (2011); Bari y Jones, 2009; Nemhauser et al. 2006**), mencionan que el crecimiento o elongación del tallo (aumento de la zona meristematica) se ve reflejado por la acción del fotoperiodo del metabolismo, produciendo mayor biosíntesis de la hormona y por ende aceleración de la elongación del tallo.

Numero de hojas verdades en plantas de semillas y explantes

El M2 con el D1, brindo los mejores resultados frente al M1 tanto en las semillas como en los explantes, considerando que las hojas verdaderas son de vital importancia puesto que en sus axilas se generan yemas, formando un meristemo apical (células capaces de dividirse) así como lo menciona **Millones (2005)**. Los valores presentados en M2 fueron similares a los reportados por **Posada-Pérez (2005)** con 7 y 12 hojas verdaderas en semillas de papaya con aplicación de 6-BAP y AG₃, por otro lado los valores presentados de los explantes son similares a los expuestos por **Garcia et al. (2015)** con un promedio de 1,99 hojas en *Nothofagus alpina* con 0,5 mg/L de BAP.

El D1M2 presento los mejores resultados en cuanto al número de hojas verdaderas en semillas y explantes, esto puede deberse a la acción fitohormonal de la citoquinina (BAP) junto con giberelinas (AG₃) en el medio de cultivo, facilitando y promoviendo la rápida división celular (**Arévalo 2017**), Además **Uribe et al. (2008)**, mencionan que la aparición de las hojas verdaderas son el resultado de varias divisiones celulares del

meristemo apical las cuales se ven influenciadas por hormonas (auxinas y citoquininas), en donde altos porcentajes de citoquininas incrementan el número de hojas al ser sintetizadas en mayor porcentaje en ellas.

Número de brotes en explantes

El E1D1M2 presento valores superiores al número promedio de brotes por explantes en comparación con el M1, tomando en cuenta que los brotes son órganos (tallos, yema o ramas) que empiezan a desarrollarse en una planta así como lo menciona **Castillo 2017**). Los valores presentados en M2 son similares a los presentados por **Garcia et al. (2015)** con valores de 1,15 brotes/explante en *Nothofagus alpina* con 0,5 mg/L de BAP, pero inferiores a los mostrados por **Zurita-Valencia et al. (2014)** con 7,75 brotes/explante a los 60 días, tratados con ANA y BA combinados.

E1D1M2 presento valores superiores en comparación con el resto de tratamientos en cuanto a número de brotes por explante, esto puede deberse a los contenidos adecuados de citoquininas en el medio de cultivo, en donde las citoquininas (BAP) se encargan de la proliferación de brotes y su elongación (**Larson et al., 2017**), sintetizándose en raíces y tallos, estimulando el desarrollo de brotes y la multiplicación meristemal apical (división celular y aumento de clorofila) mientras mayor sea su concentración (**Hoyos et al. 2008; Venegas-González, Loewe-Muñoz y Toral-Ibañeza 2016**).

Número de raíz en explantes

El E1D1M2 presento valores altos en comparación con el resto de los tratamientos con respecto al número de raíces en explantes, donde las raíces son parte importante en la morfología de la planta puesto que ayudan en el transporte de agua y nutrientes absorbidos del medio de cultivo (**Alcántara, Geovanna, Jonathan y Sánchez 2019**). Estos valores presentados por M2 son similares a los obtenidos por **Zurita-Valencia et al. (2014)** con 3,3 raíces/explante usando reguladores de crecimiento como ANA y AIB, pero superiores a los presentados por **Garcia et al. (2015)** con valores de 0,59 raíces/explante a los 45 días de observación tratados con BAP (0,05 mg/l).

Al presentar el M2 mejores resultados en cuanto al número de raíces en explantes, se presume que la adicción de hormonas como auxinas, giberelinas y citoquininas inducen la formación y desarrollo de raíces; las citoquininas se sintetizan en los órganos jóvenes (ápices radiculares) aumentando y promoviendo mayor división celular (**Rodríguez et al. 2012**). Las auxinas promueven la formación de raíces laterales (**Amador-Alfárez et al. 2013**), mientras que las giberelinas en cambio ayudan en el mejoramiento del diámetro radicular, formando raíces más fuerte y gruesas (**Zurita-Valencia et al., 2014**).

Cabe mencionar que en M1 de los explantes a los 60 días de observación se evidenció crecimiento de callo, sin embargo no se presenciaron número, altura de brotes, número de hojas verdaderas ni raíces en ambos métodos de desinfección, esto puede deberse a que los explantes se encontraron bajo un medio de cultivo sin hormona, por lo que es necesaria la aplicación de reguladores de crecimiento, así como lo menciona **Trujillo (2009)**, que tuvo que utilizar a los 45 días de la siembra *in vitro* reguladores de crecimiento como GA₃, BAP y ANA para obtener crecimiento de masa radicular y foliar.

3.3 Verificación de la hipótesis

Se cumple la hipótesis planteada, debido a que la diferente composición del medio de cultivo si tiene influencia directa sobre el desarrollo de la plántula de Tomate de árbol (*S. betaceum*) *in vitro*.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La aplicación de dos métodos de desinfección tuvo efecto positivo sobre el porcentaje de contaminación en la semilla 2, que junto con el M2 alcanzaron bajos niveles o porcentajes de contaminación: 92% a los 60 días, sin embargo, estos porcentajes son elevados al ser tratados en un laboratorio, esto se debe a la ligera estabilidad que presenta el NaClO al 5% junto con BAP, así como el tiempo de desinfección que influye en la cantidad de microorganismo fitopatógenos. Mientras que en los explantes no se presentó ningún tipo de contaminación debido a que el material vegetal usado era joven.
- Con el medio de cultivo M2, en la semilla 2 se reporta los mejores resultados de germinación entre los 12 y 60 días, mientras que en el crecimiento de explantes se reportan mejores resultados entre los 20 y 60 días, influenciados por el contenido de auxinas (ANA- α -naftalen-acético) y giberelinas (GA₃) que favorecen el poder germinativo y aceleran el crecimiento de los explantes (aumento de la zona meristemal apical).
- El tratamiento S2D1M2 en semillas y E1D1M2 de los explantes presentaron los mejores resultados en cuanto a la obtención de plantas *in vitro*, en donde la adición o utilización de fitohormonas (ANA, BAP y AG₃) tienen influencia directa sobre el desarrollo acelerado de los meristemos radicales, apicales y por ende favorecen un mejor tamaño, número de brotes y hojas.

MATERIALES DE REFERENCIA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara, J., Geovanna, A., Jonathan, A., & Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109–129. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Alvarado-Capó, Y., Cruz-Martín, M., González, N., García-Águila, L., Freire-Seijo, M., Quiala, E., & Gómez-Kosky, R. (2003). Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal*, 3(2). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/221>
- Amador-Alfárez, K., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. (2013). Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de Ferocactus (Cactaceae). *Polibotánica*, 0(35), 109–113.
- Ango, J., & Chica, G. (2013). *Asesoría de exportación de productos no tradicionales*. Universidad del Pacífico.
- Arahana, V., Cabrera, A., & Torres, M. (2010). Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 2(1), 16–21. <https://doi.org/10.18272/aci.v2i2.28>
- Arévalo, A. (2017). *Evaluación de fitohormonas suplementadas al medio de cultivo para la propagación in vitro de albahaca (Ocimum basilicum L.) a partir de meristemas*.
- Ávila, E. (2015). Manual de Tomate de árbol. In *Cámara de Comercio de Bogotá*. Retrieved from [https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/file/Tomate de árbol.pdf](https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/file/Tomate%20de%20%C3%A1rbol.pdf)
- Bari, R., & Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008->

- Bedoya-Reina, O., & Barrero, L. (2009). Filogenia de lulo, tomate de árbol y sus parientes silvestres. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 180–190. https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num2_art:140
- Bohórquez-Sandoval, C., Álvarez-Herrera, J., & Niño-Medina, R. (2011). GIBERELINAS Y 6-BENCILAMINOPURINA EN LA PLANTULACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L .) HÍBRIDO ADRALE RZ F1 GIBBERELLINS AND 6-BENZYLAMINOPURINE ON PLANT SEEDING IN HYBRID TOMATO (*Solanum lycopersicum* L .) ADRALE RZ F1. *Temas Agrarios*, 16(2), 42–53.
- Borrero, E. (2007). *Protocolo para la Regeneración de Plántulas a partir de Explantes de Hojas de Cinco Variedades Ecuatorianas de Tomate de Árbol (Solanum betaceum)*. Universidad San Francisco de Quito.
- Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R. (2015). Molecular regulation of reproductive development. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 872–924. Retrieved from www.wiley.com/go/buchanan/biochem
- Buono, S., Aguirre, C., Abdo, G., Perondi, H., & Ansonnaud, G. (2018). *Tomate árbol*. Argentina.
- Burgos, H., Chávez, C., Julca, J., & Amaya, J. (2006). Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Send.). In *Biodiversidad y Conservación de los Recursos Fitogenéticos Andinos*. (Vol. 11).
- Calvo, I. (2009). Cultivo de tomate de arbol. In *Proyecto microcuencia Plantón, Pacayas* (INTA, Vol. 8). San José, Costa Rica.
- Cantero, E. (2014). *Influencia Hormonal en el Uso Eficiente del Agua y en Respuesta al Estrés Abiótico en Tomate (Solanum lycopersicum L.)*. Universidad de Murcia.
- Castillo, A. (2017). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*.
- Chacón-Cerdas, R., Flores-Mora, D., Alvarado-Marchena, L., Schmidt-Durán, A., &

- Alvarado-Ulloa, C. (2014). Cultivo in vitro del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(506), 45. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i0.2014>
- Chañag-Miramag, H. A., Viveros-Rojas, J., Álvarez-Ordoñez, S., Criollo-Escobar, H., & Lagos-Mora, L. E. (2017). Evaluación de genotipos de tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.] frente al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary sensu lato. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(1), 11–20. <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.4725>
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. *Ciencias Agrícolas*, 10(2), 252–261. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>
- Cuevas-Arias, C. T., Vargas, O., & Rodríguez, A. (2008). Solanaceae diversity in the state of Jalisco, Mexico Diversidad de la familia Solanaceae en el estado de Jalisco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79(1), 67–79.
- Delgado, W., & Insuasti, Y. (2015). *REGENERACIÓN “IN VITRO” DE PLANTULAS DE TOMATE DE ÁRBOL (Cyphomandra betacea (Cav) Sendt) A PARTIR DE HIPOCOTILOS* (Vol. 16). <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2013.0625>
- Díaz, D. A., Figueroa, M. E. C., Escobar, H. C., & Burbano, T. C. L. (2013). Evaluation of cultivation media for in vitro propagation of seeds and explants from wild *Solanum* species. *Acta Agronómica*, 62(1), 27–36.
- Domínguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., & Pérez, E. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53–62.
- Espinosa, J., Trillos, O., Hoyos, R., Afanador, L., & Correa, G. (2005). POTENCIAL DE PROPAGACIÓN in vitro PARA EL TOMATE DE ÁRBOL PARTENOCÁRPICO *Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 58(1), 1–11.
- FAO. (2006). *Sistema de semillas de calidad declarada*. Retrieved from

<http://www.fao.org/3/a0503s/a0503s02.pdf>

- García, L., Carrasco, J., Morante, J., Luna, R., González, B., & Castro, J. (2015). Micropropagación in vitro de *Nothofagus alpina* utilizando fitohormonas. 2 *Ciencia y Tecnología.*, 8(1), 51–58.
- Gracia-López, J., Ruiz-Torres, N., Lira-Saldivar, R., Vera-Reyes, I., & Méndez-Argüello, B. (2016). Técnicas Para Evaluar Germinación, Vigor y Calidad Fisiológica de Semillas Sometidas a Dosis de Nanopartículas. In *Centro de Investigación en química Aplicada (CIBQ)*.
- Hoyos, J., Perea, C., & Velasco, R. (2008). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano dominico hartón (musa AAB Simmonds). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 6(2), 99–104.
- Kahia, J., Sallah, K., Diby, L., Kouame, C., Kirika, M., Niyitegeka, S., & Asimwe, T. (2015). A novel regeneration system for tamarillo (*Cyphomandra betacea*) via organogenesis from hypocotyl, leaf, and root explants. *HortScience*, 50(9), 1375–1378. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.9.1375>
- Larson, C., Hasbún, R., Paz, M., Sánchez-Olate, M., & Ríos, D. (2017). Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo in vitro de tejido adulto de *Castanea sativa* Mill. *Gayana Bot*, 74(1), 30–40.
- León, J., Viteri, P., & Cevallos, G. (2004). INIAP -Estación Experimental Santa Catalina. In Estación Experimental Santa Catalina (Ed.), *Varietades de papa cultivadas en el Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Lobo, M., Medina, C., Delgado, O., & Bermeo, A. (2007). VARIABILIDAD MORFOLOGICA DE LA COLECCIÓN COLOMBIANA DE LULO (*Solanum quitoense* Lam.) Y ESPECIES RELACIONADAS DE LA SECCIÓN *Lasiocarpa*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 60(2), 3939–3964.
- Lucas, K. A., Tenorio, M., & Yagual, M. J. (2011). *Creación de una empresa de producción, comercialización y exportación de tomate de árbol en el área de Sangolquí, provincia de Pichincha* (ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL). Retrieved from

[https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10688/2/TOMATE DE ARBOL.pdf](https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10688/2/TOMATE%20DE%20ARBOL.pdf)

- Martin, J. (2015). *Hormonas AIA, ANA, AG3 para estimular la germinación de semilla de palma aceitera (Elaeis guineensis)*. UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO.
- Millones, C. (2005). Desarrollo de técnicas de cultivo in vitro para la micropropagación de plantas de piña (Ananas comOSIIS 1 . Merr .) ecotipo Santa Rosa provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza , región Amazonas Development of culture techniques for in vitro m. *Investigaciones Amazonenses*, 3(1), 7–11.
- Morales, J. (2016). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN in vitro A PARTIR DE LA SEMILLA DE Solanum caripense Dunal, PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE BACTERIAS Y HONGOS*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO CARRERA:
- Moreno-Bermúdez, L., Reyes, M., Gómez-Kosky, R., & Chong-Pérez, B. (2017). Mínima concentración de polietilenglicol 6000 para seleccionar in vitro plantas de Musa spp. tolerantes a estrés hídrico. *Bioteología Vegetal*, 17(2). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/549>
- Murillo-Gómez, P., Hoyos, R., & Chavarriaga, P. (2017). Organogénesis in-vitro usando tres tipos de tejidos de tomate de árbol [Solanum betaceum (Cav.)]. *Agronomía Colombiana*, 35(1), 5–11.
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n1.61330>
- Nee, M. (1986). Flora de Veracruz solanaceae 1. In *Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Xalapa, Veracruz, México*. (Instituto). Veracruz.
- Nemhauser, J., Hong, F., & Chory, J. (2006, August 4). Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell*, Vol. 126, pp. 467–475.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.050>

- Niño, D., & Cotrino, E. (2015). *Análisis del comportamiento ecofisiológico y la germinación en tomate de árbol Solanum betaceum, material Naranja común, en el Municipio de Pasca-Cundinamarca*. UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA FACULTAD.
- Ortega-Martínez, L., Ocampo-Mendoza, J., Martínez-Valenzuela, C., Pérez-Serrano, A., & Sánchez-Olarte, J. (2013). Efecto De Las Giberelinas Sobre El Crecimiento Y Calidad De Plántulas De Tomate. *BIOtecnica*, 15(3), 56. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i3.159>
- Pazmiño, A. (2013). *Proyecto de prefactibilidad de la exportación de tomate de árbol a North Plainfield (New Jersey-USA)*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Pérez-Alonso, N., Capote, A., Pérez, A., Gómez, L., & Jiménez, E. (2015). Establecimiento y multiplicación in vitro de brotes de Aloe vera L. *Bioteología Vegetal*, 15(2). Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/14>
- Pilapaña, G. (2013). *Rentabilidad de aguacate, durazno, mora y tomate de árbol en Carchi, Imbabura y Tungurahua*. Universidad Central del Ecuador.
- Posada-Pérez, L. (2005). Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Bioteología Vegetal*, 5(2), 67–79.
- Quiroz-Chávez, J., García-Pérez, L., & Quiroz-Figueroa, F. (2012). Mejoramiento vegetal usando genes con funciones conocidas. *Ra Ximhai*, 8(3), 79–92.
- Rathore, M., Yadav, S., Yadav, P., Kheni, J., & Jha, B. (2015). Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhanced axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.023>
- Revelo, J., Mora, E., Gallegos, P., & Garcés, S. (2008). *Enfermedades, Nematodos E Insectos Plaga Del Tomate De Árbol* (pp. 5–29). pp. 5–29.
- Revelo, J., Pérez, E., & Maila, M. (2004). *Cultivo ecológico del Tomate de árbol en Ecuador*. Retrieved from <http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

- Rodríguez, R., Rodríguez, C., Murga, S., & Llich, S. (2012). Efecto del ácido naftalenacético y 6 bencilaminopurina en la germinación y crecimiento de *Lepidium peruvianum* Chacón “maca” in vitro. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 8(22), 35–42.
- Rout, G., Mohapatra, A., & Jain, S. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant : A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24, 531–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo in vitro en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97–105. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=94332687&lang=es&site=ehost-live>
- Sandoval, C., & Calispa, A. (2015). Buenas Prácticas Agrícolas para Tomate de Árbol. In *Agrocalidad* (Vol. 1). Ecuador.
- Serna, A., Hurtado-Salazar, A., & Ceballos-Aguirre, N. (2017). Efecto del ácido giberélico en el crecimiento, rendimiento y calidad del tomate bajo condiciones controladas. *Temas Agrarios*, 22(2), 70–79. <https://doi.org/10.21897/rta.v22i2.946>
- Sierra-Muñoz, J. C., Siqueiros-Delgado, M. E., Flores-Ancira, E., Moreno-Rico, O., & Arredondo-Figueroa, J. L. (2015). Riqueza y distribución de la familia solanaceae en el estado de Aguascalientes, México. *Botanical Sciences*, 93(1), 97–117. <https://doi.org/10.17129/botsci.63>
- Trujillo, D. (2009). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)* (Universidad San Francisco de Quito). <https://doi.org/10.18272/aci.v2i2.27>
- Uribe- Moraga, M., & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque (Valdivia)*, 25(1), 129–135. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002004000100012>
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque*, 29(1), 58–64. [50](https://doi.org/10.4067/s0717-</p>
</div>
<div data-bbox=)

92002008000100007

- Venegas-González, A., Loewe-Muñoz, V., & Toral-Ibañeza, M. (2016). INFLUENCIA DEL USO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO SOBRE BROTES VEGETATIVOS Y NÚMERO DE ESTRÓBILOS MASCULINOS EN *Pinus pinea* L. EN CHILE. *Ciência Florestal, Santa Maria*, 26(4), 1087–1096. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2_39
- Vilchez, J., Martínez, L., Alvarez, C., Albornoz, A., Albany, N., & Molina, M. (2014). Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro *Psidium guajava* L. *Biotechnología Vegetal*, 14(1), 15–20.
- Villasanti, C., Román, P., & Pantoja, A. (2013). El manejo del suelo en la producción de Hortalizas con Buenas Prácticas Agrícolas. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3361s.pdf>
- Waweru, B., Ishimwe, R., Kajuga, J., Kagiraneza, B., Kanze, P., Ahishakiye, V., ... Gahakwa, D. (2011). In vitro Plant Regeneration of *Cyphomandra betacea* through Nodal Culture. *Rwanda Journal*, 24(0), 1–10.
- Zurita-Valencia, W., Gómez-Cruz, E., Atrián-Mendoza, E., Hernández-García, A., Granados-García, M., García-Magaña, J., & Sánchez-Vargas, Rafael Salgado-Garciglia, N. (2014). ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO EFICIENTE DE GERMINACIÓN IN VITRO Y MICROPROPAGACIÓN DEL CIRIMO (*TILIA MEXICANA* SCHLECHT.) (TILIACEAE). *Polibotánica*, 38(1), 129–144.

ANEXOS

Anexo 1. ADEVA. Prueba Tukey al 5%

Porcentaje de germinación (%)

SEMILLA 1

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,85	0,83	39,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	173505,00	23	7543,70	52,29	<0,0001
MED	1560,00	2	780,00	5,41	0,0051
DIAS	166731,67	7	23818,81	165,11	<0,0001
MED*DIAS	5213,33	14	372,38	2,58	0,0018
Error	31160,00	216	144,26		
Total	204665,00	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,89	0,88	33,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	219540,00	23	9545,22	73,85	<0,0001
MED	2230,00	2	1115,00	8,63	0,0002
DIAS	214046,67	7	30578,10	236,56	<0,0001
MED*DIAS	3263,33	14	233,10	1,80	0,0395
Error	27920,00	216	129,26		
Total	247460,00	239			

SEMILLA 2

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,89	0,88	32,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	183918,33	23	7996,45	76,16	<0,0001
MED	4123,33	2	2061,67	19,63	<0,0001
DIAS	177678,33	7	25382,62	241,74	<0,0001
MED*DIAS	2116,67	14	151,19	1,44	0,1365
Error	22680,00	216	105,00		
Total	206598,33	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,89	0,88	34,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	199345,00	23	8667,17	74,65	<0,0001
MED	5880,00	2	2940,00	25,32	<0,0001
DIAS	191478,33	7	27354,05	235,59	<0,0001
MED*DIAS	1986,67	14	141,90	1,22	0,2606
Error	25080,00	216	116,11		
Total	224425,00	239			

SEMILLA 3

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,93	0,92	25,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	244385,00	23	10625,43	120,29	<0,0001
MED	1890,00	2	945,00	10,70	<0,0001
DIAS	240918,33	7	34416,90	389,63	<0,0001
MED*DIAS	1576,67	14	112,62	1,27	0,2246
Error	19080,00	216	88,33		
Total	263465,00	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% GER	240	0,93	0,92	26,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	236758,33	23	10293,84	126,05	<0,0001
MED	903,33	2	451,67	5,53	0,0045
DIAS	234971,67	7	33567,38	411,03	<0,0001
MED*DIAS	883,33	14	63,10	0,77	0,6982
Error	17640,00	216	81,67		
Total	254398,33	239			

Porcentaje de contaminación (%)

SEMILLA 1

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,77	0,75	48,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo	99173,33	23	4311,88	32,34	<0,0001
MED	463,33	2	231,67	1,74	0,1784
DIAS	97973,33	7	13996,19	104,97	<0,0001
MED*DIAS	736,67	14	52,62	0,39	0,9755
Error	28800,00	216	133,33		
Total	127973,33	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,86	0,85	43,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	145545,00	23	6328,04	58,21	<0,0001
MED	1000,00	2	500,00	4,60	0,0111
DIAS	143491,67	7	20498,81	188,58	<0,0001
MED*DIAS	1053,33	14	75,24	0,69	0,7810
Error	23480,00	216	108,70		
Total	169025,00	239			

SEMILLA 2

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,84	0,82	45,14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	102958,33	23	4476,45	49,43	<0,0001
MED	123,33	2	61,67	0,68	0,5072
DIAS	102105,00	7	14586,43	161,08	<0,0001
MED*DIAS	730,00	14	52,14	0,58	0,8823
Error	19560,00	216	90,56		
Total	122518,33	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,84	0,82	49,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	101733,33	23	4423,19	48,35	<0,0001
MED	1463,33	2	731,67	8,00	0,0004
DIAS	98106,67	7	14015,24	153,20	<0,0001
MED*DIAS	2163,33	14	154,52	1,69	0,0594
Error	19760,00	216	91,48		
Total	121493,33	239			

SEMILLA 3

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,88	0,87	38,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	165065,00	23	7176,74	70,59	<0,0001
MED	310,00	2	155,00	1,52	0,2200
DIAS	163038,33	7	23291,19	229,09	<0,0001
MED*DIAS	1716,67	14	122,62	1,21	0,2723
Error	21960,00	216	101,67		
Total	187025,00	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% CONT	240	0,90	0,89	34,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	138678,33	23	6029,49	82,01	<0,0001
MED	543,33	2	271,67	3,70	0,0264
DIAS	136438,33	7	19491,19	265,12	<0,0001
MED*DIAS	1696,67	14	121,19	1,65	0,0684
Error	15880,00	216	73,52		
Total	154558,33	239			

Altura (cm.)

SEMILLA 1

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,80	0,78	60,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	36,84	23	1,60	37,92	<0,0001
MED	8,74	2	4,37	103,47	<0,0001
DIAS	21,40	7	3,06	72,35	<0,0001
MED*DIAS	6,70	14	0,48	11,33	<0,0001
Error	9,13	216	0,04		
Total	45,96	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,89	0,88	53,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	107,40	23	4,67	77,04	<0,0001
MED	37,25	2	18,63	307,27	<0,0001

DIAS	43,49	7	6,21	102,50	<0,0001
MED*DIAS	26,66	14	1,90	31,42	<0,0001
Error	13,09	216	0,06		
Total	120,50	239			

SEMILLA 2

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,82	0,81	75,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	701,59	23	30,50	44,26	<0,0001
MED	363,68	2	181,84	263,87	<0,0001
DIAS	158,94	7	22,71	32,95	<0,0001
MED*DIAS	178,97	14	12,78	18,55	<0,0001
Error	148,85	216	0,69		
Total	850,44	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,90	0,89	34,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,74	23	0,34	85,09	<0,0001
MED	0,25	2	0,13	31,63	<0,0001
DIAS	7,33	7	1,05	264,68	<0,0001
MED*DIAS	0,16	14	0,01	2,94	0,0004
Error	0,85	216	4,0E-03		
Total	8,59	239			

SEMILLA 3

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,90	0,89	30,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,94	23	0,35	84,69	<0,0001
MED	0,01	2	2,6E-03	0,64	0,5260
DIAS	7,82	7	1,12	274,32	<0,0001
MED*DIAS	0,11	14	0,01	1,88	0,0295
Error	0,88	216	4,1E-03		
Total	8,82	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AL cm.	240	0,91	0,90	28,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,07	23	0,35	98,86	<0,0001
MED	0,02	2	0,01	2,15	0,1193
DIAS	7,99	7	1,14	321,40	<0,0001
MED*DIAS	0,07	14	5,0E-03	1,40	0,1564
Error	0,77	216	3,6E-03		
Total	8,84	239			

Numero de hojas verdaderas (#)**SEMILLA 1****D1**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,43	0,37	339,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,30	23	0,40	6,98	<0,0001
MED	0,11	2	0,05	0,94	0,3938
DIAS	8,43	7	1,20	20,81	<0,0001
MED*DIAS	0,76	14	0,05	0,94	0,5209
Error	12,50	216	0,06		
Total	21,80	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,69	0,66	210,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24,42	23	1,06	21,22	<0,0001
MED	0,68	2	0,34	6,81	0,0014
DIAS	18,97	7	2,71	54,16	<0,0001
MED*DIAS	4,77	14	0,34	6,81	<0,0001
Error	10,81	216	0,05		
Total	35,22	239			

SEMILLA 2**D1**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,83	0,81	121,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	148,46	23	6,45	44,83	<0,0001
MED	17,10	2	8,55	59,38	<0,0001
DIAS	79,13	7	11,30	78,51	<0,0001
MED*DIAS	52,23	14	3,73	25,91	<0,0001
Error	31,10	216	0,14		
Total	179,56	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,78	0,76	154,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	50,93	23	2,21	33,22	<0,0001
MED	0,53	2	0,27	4,00	0,0197
DIAS	46,67	7	6,67	100,00	<0,0001
MED*DIAS	3,73	14	0,27	4,00	<0,0001
Error	14,40	216	0,07		
Total	65,33	239			

SEMILLA 3

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,86	0,85	112,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	65,30	23	2,84	58,40	<0,0001
MED	0,11	2	0,05	1,11	0,3300
DIAS	64,43	7	9,20	189,34	<0,0001
MED*DIAS	0,76	14	0,05	1,11	0,3464
Error	10,50	216	0,05		
Total	75,80	239			

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
H.VER	240	0,89	0,88	99,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	52,05	23	2,26	74,06	<0,0001
MED	0,08	2	0,04	1,23	0,2951
DIAS	51,45	7	7,35	240,55	<0,0001
MED*DIAS	0,52	14	0,04	1,23	0,2569
Error	6,60	216	0,03		
Total	58,65	239			

Porcentaje de contaminación explantes

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
# CON	240	sd	sd	sd

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,00	23	0,00	sd	sd
MED	0,00	2	0,00	sd	sd
DIAS	0,00	7	0,00	sd	sd
MED*DIAS	0,00	14	0,00	sd	sd

Error	0,00	216	0,00
Total	0,00	239	

Numero de brotes

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
# BR	240	0,64	0,60	97,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	109,40	23	4,76	16,57	<0,0001
MED	109,20	2	54,60	190,22	<0,0001
DIAS	0,07	7	0,01	0,03	>0,9999
MED*DIAS	0,13	14	0,01	0,03	>0,9999
Error	62,00	216	0,29		
Total	171,40	239			

Altura (cm.)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
cm ALT	240	0,97	0,97	25,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2678,20	23	116,44	338,96	<0,0001
MED	860,30	2	430,15	1252,14	<0,0001
DIAS	1111,13	7	158,73	462,06	<0,0001
MED*DIAS	706,77	14	50,48	146,95	<0,0001
Error	74,20	216	0,34		
Total	2752,40	239			

Numero de hojas verdaderas (#)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
# HV	240	0,25	0,17	221,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14,90	23	0,65	3,17	<0,0001
MED	7,76	2	3,88	19,00	<0,0001
DIAS	4,36	7	0,62	3,05	0,0044
MED*DIAS	2,78	14	0,20	0,97	0,4842
Error	44,10	216	0,20		
Total	59,00	239			

Numero de raíces (#)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
# RAIZ	240	0,78	0,76	57,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	505,46	23	21,98	34,03	<0,0001
MED	247,27	2	123,64	191,44	<0,0001
DIAS	161,26	7	23,04	35,67	<0,0001

MED*DIAS	96,93	14	6,92	10,72	<0,0001
Error	139,50	216	0,65		
Total	644,96	239			
