



**Universidad Estatal Península de Santa Elena**  
**Facultad de Ciencias Agrarias**  
**Carrera De Ingeniería Agropecuaria**

**“EVALUACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS  
EN EXPLANTES *in vitro* DE TOMATE  
(*Lycopersicon esculentum* Mill.), REGULADOS  
POR LA EDAD FISIOLÓGICA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Jonathan Adrián Santana Pincay

La Libertad, 2019



**Universidad Estatal Península de Santa Elena**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Carrera de Ingeniería Agropecuaria**

**“EVALUACIÓN DE CAMBIOS MORFOLÓGICOS  
EN EXPLANTES *in vitro* DE TOMATE  
(*Lycopersicon esculentum* Mill.), REGULADOS  
POR LA EDAD FISIOLÓGICA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

**Autor:** Jonathan Adrián Santana Pincay.

**Tutor:** Ing. Lourdes Ortega Maldonado, MSc.

**La Libertad, 2019**

## TRIBUNAL DE GRADO



---

Ing. Andrés Drouet Candell, MSc.  
**DECANO DE LA FACULTAD  
CIENCIAS AGRARIAS**



---

Ing. Clotilde Andrade Varela, MSc.  
**DOCENTE REPRESENTANTE  
DEL DIRECTOR (E) CARRERA  
INGENIERIA AGROPECUARIA**



---

Ing. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D  
**PROFESOR DEL ÁREA**



---

Ing. Lourdes Ortega Maldonado, MSc.  
**PROFESOR TUTOR**



---

Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt.  
**SECRETARIO GENERAL**

## AGRADECIMIENTOS

A nuestro señor *Dios Todo Poderoso* por permitirme llegar a esta etapa sublime, por enseñarme que con dedicación y esfuerzo se logran cumplir metas, gracias por hacer realidad este sueño anhelado de mi vida de concluir mi carrera universitaria.

A *mis padres* por ser los pilares fundamentales en mi vida y brindarme su apoyo en situaciones de alegría y de llanto, como no agradecer los consejos y valores que siempre me supieron impartir con seguridad y que hicieron de mí una persona honesta y responsable, gracias por ese apoyo espiritual e incondicional.

A *mi facultad de Ciencias Agrarias* y sus docentes por permitirme formarme como un buen profesional gracias a los conocimientos científicos que me impartieron en lo largo de mi carrera universitaria.

A *mi tutora Ing Lourdes Ortega Maldonado MSc.*, por su experiencia y enseñanzas a nivel de laboratorio, por el tiempo, paciencia y la motivación que me dedicó para lograr culminar este proyecto.

A *mi compañera del proyecto Renata García*, por toda la ayuda y apoyo moral durante el desarrollo del proyecto de investigación, a *todos mis familiares* que me brindaron su apoyo durante toda mi travesía académica, a *mis amigos y compañeros de clases*, gracias.

*Jonathan Santana Pincay*

## DEDICATORIA

Este logro va dirigido a mi madre *Nelly Pincay* y a mi padre *Epifanio Santana*.

A mi *Madre Nelly Pincay*: sé que no podrás leer este mensaje, pero sé que estarás muy feliz desde donde estés, no estarás físicamente pero te siento como mi ángel guardián que me cuida y guía mi camino por el bien, gracias por impartirme en la vida todos esos consejos que aún recuerdo como si fuera ayer, gracias por prepararme a una futura vida sin ti, aunque sea dura, te agradezco por darme ejemplos tan bonitos de amor y sacrificios y sé que no los fallaré, por eso este logro es especialmente para ti mamá .

A mi *Padre Epifanio Santana*: gracias papá por brindarme tu apoyo incondicional en mis estudios, gracias por enseñarme que en la vida nada es fácil, y que todo se puede lograr con esfuerzo y sacrificio, te admiro mucho por todo tu trabajo y humildad, eres parte de este logro y que deseo compartirlo contigo. Gracias Papá.

A mi *Hermano Francisco Santana*: por todo el apoyo incondicional que me brindas, por los consejos y la paciencia que me tienes, por todas esas noches de desvelo que compartimos haciendo tareas, viendo series, jugando o estudiando, gracias por ser mi amigo y por creer en mí, por lo que comparto junto a ti y a tu familia este logro tan esperado, mil gracias hermanito.

A mis amigos, compañeros, profesores de la academia y familiares que de una u otra forma fueron partícipes de este logro gracias a sus consejos, gracias.

*Jonathan Santana Pincay*

## RESUMEN

El cultivo *in vitro* en la provincia de Santa Elena es escaso, no existen bases para la micropropagación vegetal de hortalizas. Mediante la propagación *in vitro* se aplica el concepto de conservación de especies y la posibilidad de generar nuevos materiales genéticos resistentes a plagas y enfermedades. El tomate es considerado una de las especies con más producción a nivel mundial y nacional. Debido a las diferentes problemáticas que presentan los agricultores por no disponer de un material genético que se adapte a las condiciones agroclimáticas presentes en Santa Elena, se planteó como objetivo de investigación determinar la edad óptima del explante para la propagación *in vitro* de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). En el estudio se utilizó un diseño experimental Completamente Aleatorio con un arreglo factorial 2x4, estableciendo 8 tratamientos conformados por 2 materiales genéticos Variedad Floradade e Híbrido Micaela y 4 edades fisiológicas (10, 15, 20 y 25 días), además se aplicó análisis estadísticos mediante la evaluación de la F calculada. La germinación en condiciones controladas ocurrió en menor tiempo al estimado, definiendo el uso del medio (MS) Murashige y Skoog (1962), como medio de cultivo necesario para una rápida germinación. Los resultados de las unidades experimentales que se obtuvo determinaron las edades fisiológicas de 15 y 20 días, consiguiendo desarrollar mejores respuestas morfológicas, con respecto al material genético Híbrido Micaela, el cual alcanzó una mejor respuesta en las variables evaluadas, como porcentaje de germinación, velocidad de germinación y respuesta morfológica.

**Palabras claves:** Medio de cultivo, edades fisiológicas, respuestas morfológicas.

## ABSTRACT

*In vitro* cultivation in Santa Elena province is scarce, there are no bases for vegetable micropropagation. Through *in vitro* propagation, the concept of species conservation and the possibility of generating new genetic materials resistant to pests and diseases are applied. Tomato is considered one of the most produced species worldwide and nationally. Due to the different problems presented by farmers because they do not have a genetic material that adapts to the agroclimatic conditions present in Santa Elena, it was raised as a research objective to determine the optimal age of the explanter for *in vitro* spread of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). The study used a completely randomized experimental design with a 2x4 factorial arrangement, establishing 8 treatments consisting of 2 genetic materials Floradade variety and Micaela Hybrid and 4 physiological ages (10, 15, 20 and 25 days), in addition it is applied statistical analysis through the evaluation of the calculated F. Germination under controlled conditions occurred in less time than the estimate, defining the use of the medium (MS) Murashige and Skoog (1962), as the culture medium necessary for rapid germination. The results of the experimental units obtained determined the ages of 15 and 20 physiological days, getting to develop better morphological responses, with respect to the material genetic Hybrid Micaela, which reached a better response on the evaluated variables, as a percentage of germination, speed of germination and morphological response

**Keywords:** Culture medium, physiological ages, morphological responses

El contenido del presente trabajo de titulación es de nuestra responsabilidad, el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Problema científico .....	2
OBJETIVOS .....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos .....	3
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
1.1. Importancia del cultivo de tomate.....	4
1.2. La biotecnología y su desarrollo en cultivos <i>in vitros</i> .....	5
1.3. Micropropagación o cultivo <i>in vitro</i> .....	5
1.4. Fases de la micropropagación.....	6
1.4.1. Fase 0.- Selección del material vegetal a propagar .....	7
1.4.2. Fase 1.- Establecimiento del cultivo asépticos. ....	7
1.4.3. Fase 2.- Multiplicación de brotes o vástagos.....	7
1.4.4. Fase 3.- Enraizamiento y adaptación.....	8
1.5. Estrategias para la Micropropagación.....	8
1.5.1. Propagación de brotes a partir de yemas apicales, laterales o axilares.....	8
1.5.2. Organogénesis directa.....	8
1.5.3. Organogénesis indirecta .....	8
1.5.4. Microinjerto .....	9
1.5.5. Embriogénesis Somática de Células.....	9
1.5.6. Fases de la embriogénesis somática. ....	9
1.6. Compuestos químicos que influyen en la morfogénesis <i>in vitro</i> . ....	10
1.6.1. Composición salina del medio de cultivo.....	10
1.6.2. Reguladores de crecimiento.....	10
1.6.2.1. Auxinas .....	10
1.6.2.2. Citocininas .....	11

1.7. Estreses bióticos y abióticos .....	11
1.8. Contaminación Microbiana en cultivo <i>In vitro</i> .....	12
1.9. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de Tomate .....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
2.1. Ubicación y descripción del lugar del experimento.....	17
2.2. Materiales y equipos .....	17
2.2.1. Material genético .....	17
2.2.2. Insumos.....	17
2.2.3. Material de laboratorio .....	17
2.3. Diseño experimental y tratamientos.....	19
2.3.1. Diseño experimental.....	19
2.3.2. Tratamientos .....	19
2.3.3. Análisis de la varianza.....	20
2.3.4. Delineamiento experimental.....	20
2.3.5. Conversión logarítmica.....	20
2.4. Manejo del experimento .....	21
2.4.1. Limpieza de equipos .....	21
2.4.2. Lavado y esterilización de los materiales de laboratorio.....	21
2.4.3. Esterilización de las semillas .....	21
2.4.4. Preparación de medio para germinación (M1) .....	22
2.4.5. Siembra de semillas.....	22
2.4.6. Preparación de medio para siembra de explantes (M2).....	23
2.4.7. Siembra de Meristemas apicales.....	23
2.5. Variables experimentales.....	24
2.5.1. Evaluación de Germinación.....	24
2.5.2. Velocidad de germinación .....	24
2.5.3. Porcentaje de contaminación .....	24

2.5.4. Respuestas morfológicas .....	24
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
3.1. Porcentaje de Germinación .....	26
3.2. Velocidad de germinación .....	27
3.3. Porcentaje de contaminación .....	28
3.4. Respuestas Morfológicas .....	29
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	
ANEXOS	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuestas morfológicas obtenidas por explantes de diferentes días de edad, provenientes de plantas <i>in vitro</i> de <i>Lycopersicon esculentum</i> M. ....	25
Figura 2. Porcentajes de germinación de los materiales genéticos V. Floradade (MG1) y H. Micaela (MG2) .....	26
Figura 3. Resultados del Factor A (Materiales genéticos) en la diferentes evaluaciones de la variable Respuesta morfológica.....	30
Figura 4. Respuesta morfológica del Factor B (Edades fisiológica del explante) a los 10,20 y 25 días.....	31
Figura 5. Resultados de la Interacción Factor A (Materiales Genéticos) * Factor B (Edades fisiológicas del explante) en la evaluación a los 10 días, de la variable Respuesta morfológica.....	32
Figura 6. Resultados de la Interacción Factor A (Materiales Genéticos) * Factor B (Edades fisiológicas del explante) en la evaluación a los 20 días, de la variable Respuesta morfológica.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores en estudio .....	19
Tabla 2. Tratamientos de la investigación .....	19
Tabla 3. Grados de libertad del experimento.....	20
Tabla 4. Componentes del M1.....	22
Tabla 5. Componentes del M2.....	23
Tabla 6. Respuestas morfológicas en el desarrollo <i>in vitro</i> de explantes.....	25
Tabla 7. Velocidad de germinación de los Materiales Genéticos evaluados.....	27
Tabla 8. ANDEVA de la variable Contaminación a los 10,15, 20 y 25 días evaluados.	28
Tabla 9.- ANDEVA de la variable Respuestas Morfológicas de los 10, 15, 20, 25 días evaluados. ....	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Figura 1A. Matriz de evaluación de porcentaje de germinación
- Figura 2A. Matriz de evaluación velocidad de germinación
- Figura 3A. Matriz de evaluación de la variable contaminación
- Figura 4A. Escala de evaluación para la matriz de contaminación
- Figura 5A. Medias de Factor A, Primera evaluación, Variable contaminación
- Figura 6A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable contaminación
- Figura 7A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Primera Evaluación, Variable contaminación
- Figura 8A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable contaminación
- Figura 9A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, Variable contaminación
- Figura 10A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable contaminación
- Figura 11A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Segunda Evaluación, Variable contaminación
- Figura 12A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable contaminación
- Figura 13A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, Variable contaminación
- Figura 14A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable contaminación
- Figura 15A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Tercera Evaluación, Variable contaminación
- Figura 16A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable contaminación
- Figura 17A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, Variable contaminación
- Figura 18A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable contaminación
- Figura 19A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable contaminación
- Figura 20A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable contaminación
- Figura 21A. Matriz de evaluación de la variable respuestas morfológicas
- Figura 22A. Matriz de evaluación de la variable respuestas morfológicas
- Figura 23A. Escala de evaluación para la matriz de respuestas morfológica
- Figura 24A. Medias de Factor A, Primera evaluación, 6 días, Variable Respuesta morfológica
- Figura 25A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica
- Figura 26A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Primera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 27A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 28A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 29A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, 12 días, Variable Respuesta morfológica

Figura 30A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Segunda Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 31A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 32A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, 18 días, Variable Respuesta morfológica

Figura 33A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 34A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Tercera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 35A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 36A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, 24 días, Variable Respuesta morfológica

Figura 37A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 38A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura A 39. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Figura 40A. Siembra de los materiales genéticos en tubos de ensayos

Figura 41A. Materiales Genéticos en desarrollo dentro de la cámara de crecimiento

Figura 42A. Desarrollo morfológico de las unidades experimentales en la cámara de crecimiento

Figura 43A. Siembra de explantes de diferentes edades fisiológicas

Figura 44A. Desarrollo del explante a los 15 días de la variedad Floradade

Figura 45A. Contaminación por hongos en el establecimiento en el establecimiento del cultivo *in vitro*

Figura A 46. Desarrollo del explante de 25 días de edad, trasplantado a sustrato orgánico

Figura 47A. Desarrollo de la unidad experimental, lista para la aclimatación

## INTRODUCCIÓN

La producción mundial del cultivo hortícola de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), ha alcanzado a nivel mundial un 2.2% del total sembrado emitiendo 211 021 843 millones de toneladas importadas. El continente asiático domina la producción de tomate, destacando La República Popular de China, país que ocupa los primeros lugares en importaciones, a diferencia de Jordania, que apenas importa un total de 787 141 toneladas métricas de tomates (FAO, 2019).

El tomate durante los últimos años ha incrementado su producción anual principalmente por el aumento en el rendimiento y en menor proporción por el incremento de la superficie cultivada. Además esta hortaliza tiene cada vez mayor relevancia nutricional por las diferentes sustancias antioxidantes que el fruto posee (Escobar & Lee, 2009).

En Ecuador la producción de tomate, domina el cuarto puesto en cuanto a la importancia de las área sembrada de cultivo de hortalizas, con una superficie de 3 599 hectáreas, con una producción total de 55 550 toneladas métricas y un total de 54 784 toneladas métricas de ventas, siendo la región sierra donde existe la mayor producción (INEC, 2018). En el año 2017 Ecuador llego a producir un total de 62 675 toneladas métricas de tomates frescos (FAO, 2019).

En los últimos años en la provincia de Santa Elena se ha incrementado la siembra de hortalizas, pero existe un uso indiscriminado de semilla importada, ocasionando la susceptibilidad del cultivo frente a las principales plagas que lo afligen, produciendo perjuicios a los agricultores por el uso excesivo de varios productos químicos que contaminan el ambiente y afectan a la salud de los consumidores (Barzola, 2017).

Los agricultores enfrentan un sin número de problemas al momento de establecer cualquier cultivo como son, altas y bajas temperaturas, sequias relacionada con las escasas precipitaciones, corrientes de vientos, problemas sanitarios de enfermedades y plagas, afectando la producción e imposibilita una producción agrícola sostenible; esta situación exige a los agricultores a buscar nuevas alternativas de producción hortícola (Barzola, 2017).

La micropropagación es una alternativa en la producción de plantas, consiste en un conjunto de métodos y técnicas utilizadas para la multiplicación asexual masiva de



plantas seleccionadas, con el fin de obtener especies vegetales resistentes, con una descendencia semejante o idénticas. Actualmente se plantea el uso de plantas propagadas asexualmente que presenten características genéticas deseables resistentes a estreses bióticos y abióticos.

Por mucho tiempo la península de Santa Elena fue un lugar donde se producía grandes cantidades de tomate, pero años más tarde las producciones comenzaron a disminuir por diversos factores bióticos y abióticos como la aparición de plagas y enfermedades en las plantas y en el suelo, además con la presencia de fenómenos climáticos adversos como las bajas precipitaciones y las altas radiaciones solares que provocaron salinidad en los suelos. (Rodríguez, 2015)

En la provincia de Santa Elena existen áreas donde se dedican a la siembra de diversas hortalizas, pero generalmente los agricultores hacen uso de materiales vegetales importados que son predestinados a otras condiciones ambientes diferentes a las existentes en la provincia, por lo que se vuelven monocultivos y susceptibles a enfermedades y plagas.

Considerando los diversos problemas antes mencionados y que la producción de tomate ha disminuido últimamente, se plantea en la presente investigación desarrollar protocolos *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* Mill, de esta manera se pretende probar 2 genotipos de tomate más usados, se adapten a las condiciones controladas *in vitro*, además de aportar con los resultados al proyecto de investigación “ESTUDIO Y SELECCIÓN DE HÍBRIDOS Y VARIEDADES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.), TOLERANTES AL ESTRÉS HÍDRICO A PARTIR DE CULTIVARES INTRODUCIDOS EN LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA”

## **PROBLEMA CIENTÍFICO**

¿Cuál será el comportamiento fisiológico del cultivo *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* Mill, a diferentes edades fisiológicas?

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la edad óptima del explante para la micropropagación *in vitro* de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Definir protocolos de propagación *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* Mill.
2. Determinar la germinación en condiciones controladas de dos genotipos de *Lycopersicon esculentum* Mill.
3. Identificar las edades del explante apical que mejor comportamiento presente en el cultivo *in vitro*.
4. Evaluar las respuestas morfológicas en explantes de diferentes edades de siembra de tomate *in vitro*.

### **HIPÓTESIS**

Las 4 edades de siembra inducen a cambios morfológicos, en las dos materiales genéticos de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill cultivado *in vitro*.

## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Importancia del cultivo de tomate**

Según Srinivasan (2010), el tomate es una especie originaria de América, al parecer de las regiones montañosas de Perú, Ecuador y Chile, adaptado a climas tropicales de alta humedad. Su fruto es muy apetecible por lo que contiene antioxidantes, vitaminas, licopeno, fósforo, calcio y potasio, importantes en la dieta del ser humano.

Según la clasificación taxonómica del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), pertenece a la familia Solanáceas, en la actualidad es un cultivo de gran importancia económica para la investigación por la fisiología, bioquímica y genética molecular (Kinet *et al*, 2009).

Es una planta herbácea, de tallo semileñoso, cuyo sistema radicular está compuesto por una raíz principal ramificada con numerosas raíces secundarias; la raíz está compuesta por una epidermis en donde se encuentran los pelos absorbentes especializados en absorber agua y nutrientes; las hojas son imparipinadas, compuestas por folíolos alternos e impares que terminan en un folíolo individual en su parte apical; el fruto está constituido por 94-95% de agua y el restante 5-6% es una mezcla compleja de constituyentes orgánicos, los cuales dan al fruto su sabor característico y su textura (Rodríguez, 2013).

Fernqvist (2014), manifiesta que el tomate es la hortaliza de mayor comercialización a nivel mundial. Se siembran en diferentes formas, en invernaderos, túneles de plásticos o directamente al campo. El consumo del fruto se lo realiza en estado fresco o en productos procesados.

De acuerdo con López (2016), el tomate es una planta dicotiledónea, se desarrolla a temperaturas de 18 y 30 °C y es insensible al fotoperiodo; la humedad relativa ideal está entre 70 al 80 % y la polinización es autógamas. Se adapta bien a climas templados, preferibles aquellos lugares ubicados en alturas 100 y 1 500 msnm, se siembra todo el año y presenta problemas cuando cambia el clima según la época.

El tomate otorga múltiples beneficios a la salud de las personas, se ha convertido en uno de los cultivos estudiados por la biotecnología y la ingeniería genética. A nivel mundial existen aproximadamente 10000 variedades de tomate, siendo algunas variedades propagadas vía laboratorio (*in vitro*) y siendo seleccionadas comercialmente por su calidad y por las cualidades morfológicas únicas que presentan, informó (Gerszberg *et al.*, 2015).

### **1.2. La biotecnología y su desarrollo en cultivos *in vitros***

Las ciencias biotecnológicas han alcanzado avances importantes en los últimos años, realizando estudios sobre el desarrollo de las plantas desde el nivel celular como molecular, las condiciones de laboratorio a producir y todos los factores que puedan afectar en el desarrollo y crecimiento de las plantas *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

Según Sharry *et al.* (2015), indican que la expresión cultivo *in vitro* de plantas, representa realizar un cultivo de plantas dentro de tubos o frasco de vidrio en condiciones artificiales. Esta forma de propagación presenta dos características principales la primera es la asepsia, que se refiere a la ausencia de agentes contaminantes, y segundo el control de los elementos que afectan el desarrollo de la planta.

### **1.3. Micropropagación o cultivo *in vitro***

Se identifica como cultivo *in vitro* a los diversos procesos y técnicas que se emplean como herramientas eficaces durante la multiplicación asexual de especies vegetales, por lo general se relaciona al cultivo *in vitro* con trabajos de laboratorio, con procedimientos asépticos de aislamiento (Izquierdo, 2009).

Según Izquierdo (2009), el desarrollo de la industria de la micropropagación empezó en diferentes países de Europa y en Estados Unidos, logrando extenderse a países de Latinoamérica, África y Asia, en la actualidad la micropropagación es un método exitoso en especies ornamentales, forestales y hortícolas, mostrando una amplia ventaja a diferencia de los métodos de propagación tradicionales.

La micropropagación consiste en la utilización de células o tejidos, partes de la planta denominadas explantes, que en condiciones asépticas y controlas de laboratorio, darán paso a la obtención de nuevas plantas. Las células vegetales poseen la capacidad de dar

origen a un organismo o nueva planta, conocido por la totipotencialidad que estas presentan (González, 2016).

González (2016), expone que las células que son más óptimas y conservan dicha capacidad son aquellas que no están diferenciadas para el desarrollo de una función específica, pudiendo ser células meristemáticas o también células adultas que mantienen el núcleo.

Para la obtención de nuevas plantas se inicia con un cultivo de meristemas, usando tejidos vivos, que darán origen a una nueva planta que conserve las características genotípicas de la planta madre de interés agroproductivo o agroindustrial.

Criollo, *et al.* (2016), indica que una de las herramientas más utilizadas en el desarrollo biotecnológico es el cultivo *in vitro*, utilizando la totipotencia celular para la obtención de nuevos clones idénticos al material genético vegetal del cual fueron extraídos sea independientemente de la posición o función, las respuestas de totipotencia celular ocurren cuando existen los niveles apropiados de auxinas y citoquininas gran parte es la morfogénesis *in vitro* y de la regeneración de plantas.

Dentro de las técnicas de micropropagación existen elementos necesarios para realizar un establecimiento de cultivos como la propagación, enraizamiento y adaptación de la planta *in vitro* (Varela, 2018).

#### **1.4. Fases de la micropropagación**

Para realizar el cultivo *in vitro* se debe realizar la selección y preparación del material vegetativo, tomando en cuenta elementos determinantes como la edad fisiológica del material y edad previa a la floración, tamaño del explante, las condiciones esterilizadas en la que se encuentra la planta madre (Varela, 2018).

Varela (2018), manifiesta que en la micropropagación de materiales vegetales se desarrollan 4 fases:

#### **1.4.1. Fase 1.- Selección del material vegetal a propagar**

Para proceder a propagar es necesario que las plantas madres seleccionadas presenten características como: libres de estrés (no presentes problemas externos probacados por hongos o virulencias), vigorosas y sanas.

Esta etapa es esencial para ejecutar la micropropagación de donde se obtendrán explantes libres de contaminación.

#### **1.4.2. Fase 2.- Establecimiento del cultivo asépticos.**

En los explantes a manipular la desinfección es inevitable, se la realiza con soluciones de cloro durante un tiempo establecido, seguido de enjuagues con agua destilada estéril. Comenzar cuando el explante es hipocotílo, es necesario que las semillas se hayan esterilizado antes de su germinación anulando las posibles contaminaciones microbianas.

En la esterilización de medio de cultivo y de instrumental necesarios para propagar explantes de tomate, se utiliza autoclave (esterilización con vapor) y estufa (esterilización con aire caliente), eliminando así cualquier tipo de patógeno que afecte la micropropagación.

Los explantes idóneos a utilizar son las yemas apicales y axilares, teniendo en cuenta que los tejidos jóvenes son considerados los mejores por tener una capacidad regenerativa alta.

#### **1.4.3. Fase 3.- Multiplicación de brotes.**

El objetivo principal de la fase es obtener y mantener el número de brotes deseado de plantas, con aplicaciones de dosis hormonales balanceadas en el medio de cultivo. El desarrollo de la fase se puede dar por dos formas de regeneración, la embriogénesis y la organogénesis, siendo esta la más frecuente en la industria de la micropropagación de cultivos.

#### **1.4.4. Fase 4.- Enraizamiento y adaptación.**

a) Enraizamiento.- Durante la etapa se obtiene crecimiento de raíces adventicias, inducidas por los diversos reguladores de crecimiento, en modo *in vitro*. Para el desarrollo adecuado de los explantes se los ubica en medios de cultivos dependiendo de las necesidades y del tipo de explante.

b) Aclimatación.- Proceso mediante el cual se transfiere los explantes al ambiente *ex vitro*. El enraizamiento *ex vitro* permite que la planta desarrolle su sistema radicular y se adapte a las nuevas condiciones. Las plántulas se ubicaran en viveros o invernaderos que presten las condiciones óptimas para el desarrollo de la nueva planta de forma paulatina.

#### **1.5. Estrategias para la Micropropagación.**

Para la realización de propagación de cultivos *in vitro* existen diversas formas, entre ellas existen:

##### **1.5.1. Propagación de brotes a partir de yemas apicales, laterales o axilares**

Las células meristemáticas son el inicio de todo proceso de propagación ya que estas poseen la capacidad de totipotencialidad, las cuales las encontramos en yemas y brotes de las plantas.

##### **1.5.2. Organogénesis directa**

Da inicio a la formación de brotes adventicios o de la raíz, a partir de explantes de un órgano o en alguna parte de la planta.

##### **1.5.3. Organogénesis indirecta**

Empieza con la formación de brotes adventicios que se desarrollan en el callo. El desarrollo del callo inicia a partir de explantes de un tejido órgano o alguna parte seccionada de la planta.

#### **1.5.4. Microinjerto**

Es una técnica de propagación de ápices de retoños que por lo general se los realiza en especies frutales como cítricos, especialmente para la revigorización orientado a la clonación de materiales adultos de buena producción. La propagación del material vegetal adulto es *in vitro*, cultivado en medio MS y con presencia de reguladores de crecimiento para facilitar su desarrollo (Navarro & Juárez, 2005)

#### **1.5.5. Embriogénesis Somática de Células**

Del explante primario se pueden desarrollar directamente los embriones o indirectamente de las células que fueron cultivadas en medio semisólido o en suspensión.

Una de las técnicas *in vitro* para la regeneración y propagación de nuevas plantas es a través de la embriogénesis somática, siendo la técnica más utilizada dentro de la industria de la micropropagación (Gallego, 2013).

#### **1.5.6. Fases de la embriogénesis somática.**

De acuerdo con lo mencionado por Chitra & Narmathabai (2011), se pueden distinguir 4 fases dentro de la embriogénesis las cuales son: inducción, multiplicación, maduración y regeneración.

En la fase de la inducción, las células somáticas específicas del explantes codifican un nuevo programa de genes de la embriogénesis para dar lugar a aquellas células del explante que puedan generar embriones somáticos (Freire, 2003).

Las tres últimas fases de multiplicación, maduración y regeneración las células embriogénicas ingresan en una competencia embriogénica y se distinguen para desarrollar embriones somáticos (Gallego, 2013).

En el proceso de proliferación de plantas *in vitro* es necesario considerar y conocer los conceptos sobre las fases de la embriogénesis, a partir de la utilización de células somáticas

Los cambios morfológicos que se desarrollan en las plantas se denominan morfogénesis, que son el resultado de cambios estructurales y de organización celular durante el crecimiento y desarrollo de un organismo. La totipotencia de las células vegetales permite



iniciar la formación de tejidos y órganos de la nueva planta. Por lo que la morfogénesis *in vitro* radica en la obtención de embriones o órganos a partir de un explante (Sharry *et al.*, 2015).

Según Freire (2003), la inducción de la embriogénesis somática no es más que la terminación del patrón que se encuentran dentro de las características de los genes del explante, estando reemplazado con un sistema de expresión de genes o gen de la embriogénesis, donde ciertas células especializadas del tejido del explante logran dar lugar a nuevos embriones somáticos

### **1.6. Compuestos químicos que influyen en la morfogénesis *in vitro*.**

Dentro de las condiciones para la obtención y desarrollo de plantas *in vitro* tenemos:

#### **1.6.1. Composición salina del medio de cultivo**

Existen varios medios de cultivos empleados en muchas investigaciones, donde la más utilizada en la multiplicación de explantes, células, órganos y formación de callos vegetales tenemos la (Murashige & Skoog, 1962)(MS).

#### **1.6.2. Reguladores de crecimiento.**

Los reguladores de crecimientos son sustancias que funcionan sobre los tejidos vegetales que por lo general el uso de las mismas se las realiza en concentraciones muy bajas. Dentro de las moléculas reguladoras encontramos de origen sintético y otras aquellas que se la produce la planta de forma natural, a esta se las conocen como fitohormonas u hormonas vegetales.

Gallego (2013), indica que los reguladores de crecimiento vegetal son los factores mas importantes dentro del desarrollo de la embriogénesis en la producción de plantulas *in vitro*, además menciona que el uso correcto y equilibrado de las fitohormonas mejora y fortalece el desarrollo del cultivo vegetal *in vitro*.

##### **1.6.2.1. Auxinas**

Según lo que indican Garay, *et al.* (2014), las auxinas tienen la capacidad de participar en todos los procesos de desarrollo de la planta e intervenir a nivel celular en los procesos

de segmentación, elongación y diferenciación celular, las fitohormonas se localizan diferencialmente entre células y tejidos en algunos casos se encuentra distribuida en células específicas o grupos de ellas.

Existen auxinas endógenas en todos los materiales vegetales, presentándose en mayor cantidad en los tejidos que se encuentran en crecimiento como los meristemas apicales, hojas jóvenes y frutos. Además, las auxinas juegan un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de las raíces. En cuanto al crecimiento, las auxinas ayudan con la elongación, regulación de la dirección del tallo por el efecto tropismo en la raíces e inhibe el desarrollo de la raíz principal y facilita del desarrollo de nuevas raíces secundarias (Jiménez, 2015).

#### **1.6.2.2. Citocininas**

Dentro de la citocininas existen dos tipos, las de origen natural y las procedentes de compuestos químicos sintéticos. Las citocininas de origen de natural son derivadas de compuestos nitrogenados entre ellas están Zeatina, n-bencil adenina y Kinetina; mientras que las de origen sintético son derivadas de la difenilurea, como CPPU y tidiazuron, que actúan como análogos estructurales de la molécula natural y presentan una actividad muy potente (Villatoro, 2014).

Villatoro (2014), indica que al aplicar citocininas en forma exógena en las plantas, estimulan en los procesos metabólicos, fisiológicos y bioquímicos que se desarrollan en la planta. Como principal respuesta a esta fitohormona es al desarrollo y división celular a través de la plasticidad de las paredes celulares.

#### **1.7. Estrés bióticos y abióticos**

El estrés (biótico o abiótico) es responsable de pérdidas que oscilan de 10 a 90% en la producción de los cultivos de mayor importancia económica. La tolerancia al estrés es uno de los principales objetivos en los planes de mejora genética. Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes encontrados, tanto en la selección de materiales, como en el manejo de factores de producción que amenoran el efecto del estrés, es determinar cuáles son los parámetros más confiables o aquellos más afectados por los diferentes tipos de estrés. El segundo problema que se enfrenta es dilucidar cuál es el método más apropiado para evaluar la tolerancia o la falta de tolerancia (Castro & García, 2012).

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensas y se adaptan a diferentes tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, frío y calor) y biótico impuesta por el medio ambiente, manifestándose por vías de señalización que regulan respuestas en los vegetales a estas condiciones adversas (Moreno, 2009).

### **1.8. Contaminación Microbiana en cultivo *In vitro***

La contaminación microbiana es uno de los principales problemas más difíciles de afrontar durante la micropropagación *in vitro* de materiales vegetales, produce grandes pérdidas de material ya sea de trabajos netamente comercial o trabajos investigativos.

Los agentes contaminantes más habituales en condiciones asépticas son los vitropatógenos, los cuales tenemos los hongos, bacterias y levaduras, también existen otros agentes menos frecuentes como lo son los virus y viroides (Alvarado, 2003).

Según Alvarado (2003), los hongos son los principales contaminantes presentes en el cultivo *in vitro*, se desarrollan muchas veces en el explante pudiendo ser estos, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, que se pueden desarrollar durante el establecimiento del cultivo, y en ocasiones también se pueden presentar en el medio de cultivo.

Pérez Álvarez *et al.* (2016), manifiesta que entre las estrategias para controlar la contaminación microbiana se conoce que los microorganismos epífitos o endófitos responsables de la contaminación de las plantas pueden ingresar al cultivo *in vitro* por medio de la siembra del primer explante que sufrió algún contacto extra, antes de ser introducido al medio.

Comúnmente es complejo tratar de identificar el origen de la contaminación y de los cuales se han desarrollado protocolos para tratar de reducir estos microorganismos patógenos, que pueden encontrarse en el medio de cultivo o en el interior del explante o en ciertos casos en ambos (Hernández & González, 2010).

### **1.9. Antecedentes del cultivo *in vitro* de Tomate**

En las investigaciones realizadas se ha usado medio MS para el cultivo de tejidos. Para la formación de callos se aplica también reguladores de crecimiento, con el fin de desarrollar

el explante. La relación citocinina : auxina parece ser más importante para el control de la formación del brote de tomate que de la hormona específica utilizada. Dentro de los trabajos científicos y biotecnológicos, desarrollaron un procedimiento para regenerar plantas a partir de meristemos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire), A partir de plántulas de siete días de edad; aislaron los meristemos del brote apical y fueron cultivados asépticamente sobre el medio de Murashige y Skoog (MS) adicionado con varias concentraciones de citocininas y auxinas bajo condiciones ambientales definidas (Ambriz, 1995).

En la micropropagación de tomate se requiere utilizar metodologías que faciliten aumentar la producción de brotes procedentes de yemas axilares y adventicias en poco tiempo. Además se necesita tener materiales vegetales idóneos para realizar la propagación *in vitro*. Así se podrá aprovechar la variabilidad genotípica de los materiales biológicos para iniciar la inducción de organogénesis *in vitro*, ya que cada genotipo presenta características morfológicas, nutricionales y organogénicas diferentes de cada especie (Iracheta *et al.*, 2006).

Se trata de inducir tolerancia o resistencia a plantas de tomate a través de métodos *in vitro* en las variedades comerciales, es una alternativa promisoriosa, debido a las dificultades para transferir caracteres de otras variedades, por los métodos convencionales de mejoramiento genético (Capote *et al.*, 2009).

### **1.10. Protocolos de micropropagación vegetal en tomate**

Altarés (2015), planteó el siguiente protocolo de micropropagación:

➤ **Obtención de semilla.**

Se obtendrán semillas para realizar la propagación en el laboratorio, de la siguiente manera:

El fruto de las plantas de interés debe estar limpio y muy bien identificado, será cortado en dos mitades y colocada su pulpa en un recipiente donde se coloca ácido clorhídrico comercial (37%) más agua y se deja reposar por un día.

A las 24 horas posteriores se saca la semilla y se coloca sobre una capa de gasa colocando 50 semillas en cada bolsa, posteriormente se etiqueta y se cierra valiéndose de un alambre fino y se almacena en un lugar donde permita la evaporación del exceso de agua de forma

Con la finalidad de tener material inicial para la propagación masiva de tomate, se utilizaran cotiledones para su regeneración y posterior clonación natural.

También se puede utilizar material de invernadero o de campo, para esto se obtienen meristemas apicales o axilares, los cuales deben ser desinfectados igual que en el caso de las semillas.

#### ➤ Germinación

La germinación de las semillas de tomate se las realiza en envases de vidrio con medio o se realiza una pregerminación en cajas Petri con papel filtro.

Se puede preparar medios básicos para germinar donde se utiliza sales MS, Sacarosa y Agar regulando la solución a un pH 5.7.

#### ➤ Regeneración

Con la finalidad de tener material inicial para la propagación masiva de tomate, se utilizaran cotiledones de plántulas germinadas de 7 días, para su regeneración y posterior clonación. Para esto se prepara un medio con las siguientes soluciones: con sales de MS (4,3 gr/l), Sacarosa (30 gr/l), Inositol (100 mg/l), T-HCl (1 mg/l), AIA (4 mg/l), kinetina (4 mg/l), en 500 ml de agua destilada ajustando el pH a 5.72. Además se puede agregar la zeatina (1 mg/l), y antibiótico antes de servir.

#### ➤ Clonación

Para realizar una propagación masiva de tomate, se utilizan plántulas de tomate de 1 a máximo 4 meses, de los cuales se obtiene explantes de 2 a 3 cm aproximadamente, el número de explantes va a depender del tamaño de la planta, se puede obtener explantes de meristemo apical o axilar, se debe evitar meristemas que estén en la parte más vieja de la plántula.

#### ➤ Subcultivos de callos

Se realizan subcultivo a partir de callos de explantes de cotiledones, con la finalidad de obtener un número mayor de plántulas por tejido. Cabe recordar que este tipo de propagación va a generar 50% de diploidia y 50% de tetraploidia en la mayoría de los casos.

➤ Solución de reguladores de crecimiento.

El stock de reguladores de crecimiento se puede hacer a una concentración de 1mg/ml.

- Soluciones de IAA de 1mg/ml
- Solución de Kn de 1 mg/ml
- Solución de GA<sub>3</sub> de 1 mg/l
- Solución de BAP de 1mg/l

Las auxinas se pueden disolver primeramente en una pequeña cantidad de etanol al 95%, KOH o NaOH 1M. Una vez disueltas, se añade agua destilada suavemente, procurando que las auxinas no precipiten, hasta alcanzar el volumen deseado.

De la misma forma, el ácido abscísico se puede disolver previamente en NaOH 1N y las giberelinas en el etanol al 95%.

Las citoquininas se disuelven previamente en una pequeña cantidad de HCl 0,5 N. Se puede calentar suavemente para favorecer la disolución y posteriormente se enrasa al volumen deseado. Se prepararán 10 ml de cada una de las disoluciones.

Para cada una de ellas se procederá del siguiente modo: Se pesará la hormona en un tubo aforado. Se le añaden unas gotas de solución correspondiente y se disuelve. A continuación se va añadiendo poco a poco y agitando, agua destilada hasta enrasar los 10 ml. Se agita bien y se reparte en 10 eppendorf. Se rotulan cada uno de ellos y se guardan en el congelador

## **1.11. Materiales genéticos**

### **Variedad Floradade**

Benavides (2015), manifiesta que la variedad de tomate Floradade, presenta las siguientes características: frutos de buen tamaño y redondos de peso promedio de 260 - 300 gr. Siembra en semillero y trasplante con 5 - 6 hojas y 15 cm de altura. Para su densidad de siembra, se requiere de 150 a 200 gr/ha. para trasplantar y 1 a 1,5 kg de semilla /ha. para siembra directa. Es una variedad muy apreciada para su buena adaptación a los diferentes tipos de climas. Se cosecha a partir de los 75 días después de la siembra. . Es resistente a enfermedades como: Verticillium, Fusarium 0-1, Stemphylium.

### **Hibrido Micaela HA 1903**

Rodríguez (2015), menciona que el genotipo de tomate Micaela HA 1903 tiene crecimiento indeterminado, es una planta muy productiva, vigorosa, follaje con buena abertura. Además presenta una fruta de mayor tamaño con duración muy prolongada y racimo uniforme, el fruto tienen un peso que fluctúa entre 190 a 250 gramos, forma redondeada profunda. Es resistente a Fusarium razas 1 y 2, Nematodos y Virus del Mosaico del Tabaco.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Ubicación y descripción del lugar del experimento**

El proyecto de investigación se efectuó en las instalaciones del Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIB) perteneciente a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE) del cantón La Libertad, provincia de Santa Elena. Ubicación geográfica  $2^{\circ}13'55,83''$  latitud sur y  $80^{\circ}52'33,30''$  de longitud oeste.

El mismo se encuentra a 10 msnm; clima cálido seco. Temperatura promedio  $24^{\circ}\text{C}$ , temperatura máxima  $39,5^{\circ}$  en verano y temperatura mínima  $15,6^{\circ}\text{C}$  en lluvioso; precipitación anual 200 milímetros, concentrándose las lluvias en los meses de enero a abril mientras que el resto del año es seco, humedad relativa 81,6%.

### **2.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **2.2.1. Material genético**

Semillas certificadas de variedad Floradade e Híbrido Micaela HA 1903.

#### **2.2.2. Insumos**

- Sales de Macro y Micronutrientes de SIGMA M5524
- Bacto agar
- Sacarosa
- Vitamina Inositol
- Vitamina T-HCl
- Hormona Citocinina bencilaminopurina (BAP)

#### **2.2.3. Material de laboratorio**

##### **Equipos**

- Balanza analítica
- Autoclave
- Estufa
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de crecimiento artesanal



- Micropipetas 1000-100 $\mu$ l, 100 - 10 $\mu$ l
- Termo – agitador
- Refrigerador
- Peachimetro digital

### **Materiales**

- Vasos de precipitación 50 ml, 200 ml y 500 ml
- Matraz Erlenmeyer 250 ml, 500 ml y 1000 ml
- Cajas petri esterilizadas
- Probeta de 50 ml y 250 ml
- Tubos de ensayo de vidrio con tapas roscas
- Tubos falcon 15 ml
- Frascos de vidrio esterilizados 250 ml
- Puntas de pipeta 100 - 10 $\mu$ l, 1000-100 $\mu$ l
- Espátula de acero
- Pinzas bayoneta de Jansen
- Bisturís #15, #22
- Mango de bisturí #4, #3
- Varilla agitadora magnética
- Gasa
- Papel toalla
- Papel filtro
- Algodón
- Papel adhesivo transparente
- Papel aluminio
- Agua destilada
- Alcohol industrial
- Cloro comercial
- Jabón líquido
- Mechero de alcohol
- Cinta adhesiva blanca
- Cinta Parafilm

## 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

### 2.3.1. Diseño experimental.

Los datos fueron analizados mediante Diseño Completamente Aleatorio (DCA) con un arreglo factorial 2 x 4, donde el primer factor corresponde a 2 materiales genéticos y el otro factor corresponde a las 4 edades fisiológicas de los explantes, dando un total de 8 tratamientos con 5 repeticiones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Factores en estudio

MATERIAL GENÉTICO	EDAD DE EXPLANTES
V. FLORADADE: MG1	Edad 1: 10 días ds: E1
H. MICAELA: MG2	Edad 2: 15 días ds: E2
	Edad 3: 20 días ds: E3
	Edad 4: 25 días ds: E4

ds/ Después de la siembra

### 2.3.2. Tratamientos

En total 8 tratamientos, cada tratamiento fue conformado por 5 repeticiones. Lo que indicó que los tratamientos constan de 5 explantes. Se consideró pérdida de muestras en el camino por lo que se adicionó un explante más (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tratamientos de la investigación

Tratamientos	Nomenclatura	Descripción
T1	MG1E1	V. Floradade x Edad 1
T2	MG1E2	V. Floradade x Edad 2
T3	MG1E3	V. Floradade x Edad 3
T4	MG1E4	V. Floradade x Edad 4
T5	MG2E1	H. Micaela x Edad 1
T6	MG2E2	H. Micaela x Edad 2
T7	MG2E3	H. Micaela x Edad 3
T8	MG2E4	H. Micaela x Edad 4

La respuesta de los tratamientos fue proporcionada por la edad de los explantes. En total se necesitó 2 frascos por tratamiento, es decir un total de 16 frascos en los 8 tratamientos. En el desarrollo del ensayo no se utilizaron tratamientos testigos.

### 2.3.3. Análisis de la varianza

Esquema del análisis de la varianza y la disposición de los tratamientos se detallan en el ANDEVA-DCA (Tabla 3).

**Tabla 3. Grados de libertad del experimento**

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Tratamientos (t-1)	(8-1)	7
Repeticiones (r-1)	(5-1)	4
Error Experimental (t-1) (r-1)	(8-1) (5-1)	28
Total (t x r) -1	(8 x 5) -1	39

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba de *Duncan* para determinar las significancias a un nivel de  $P \leq 0.05$ . Para el desarrollo del análisis estadístico se utilizó el software “InfoStat”.

### 2.3.4. Delineamiento experimental

a. Diseño experimental	DCA con arreglo factorial 2 x 4
b. Tratamientos	8
c. Repeticiones	5
d. Total de unidades experimentales	40
e. Número de semillas por unidad experimental	1
f. Número de frascos por tratamiento	2
g. Total de semillas por tratamiento	5
h. Total de semillas del ensayo	40

### 2.3.5. Conversión logarítmica.

La información de los datos obtenidos en las evaluaciones fueron transformados a logaritmo utilizando la siguiente fórmula  $\log(x+1)$ , por presentar variación que ocasionaba el aumento del coeficiente de variación.

## **2.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### **2.4.1. Limpieza de equipos**

Para evitar cualquier alteración en los procesos de micropropagación se utilizó equipos de laboratorio totalmente limpios y en buen estado.

La limpieza de la cámara de flujo laminar se realizó a los 10 o 15 minutos antes de efectuar el manejo del material vegetal seleccionado o durante la realización de cualquier actividad que necesite el uso del equipo. Se recomienda limpiar la cámara antes y después de haber sido utilizada, además en el manejo del equipo se debió utilizar implementos personales de aseo para mantener especia dentro de la zona de trabajo.

Se realizó la desinfección de toda la cámara de crecimiento, debido a que es el lugar donde se manipularon los explantes para su desarrollo.

### **2.4.2. Lavado y esterilización de los materiales de laboratorio**

La esterilización de los materiales del laboratorio es una de los factores que influye discretamente en la propagación del material vegetativo. El lavado se lo realizó con soluciones de cloro y agua, donde estuvieron sumergidas por 30 minutos y luego enjuagadas, además se eliminó el exceso de agua presente en los materiales.

Posteriormente se llevó a la estufa los materiales limpios para realizar la debida esterilización tanto de materiales de vidrio como los materiales quirúrgicos. A los materiales de vidrio se colocó algodón y papel aluminio sobre la superficie, donde las altas temperaturas de la autoclave o de la estufa, lograron con la eliminación de microorganismos que aún se encontraban presentes en los materiales.

### **2.4.3. Esterilización de las semillas**

Se realizó un prelavado de semillas con jabón líquido agitando para eliminar presencia de fungicidas o restos de fruto, luego en una solución con agua destilada estéril al 5% de cloro, dejar por 20 minutos luego del tiempo transcurrido con la solución se debe realizar 4 enjuagues con agua destilada estéril. Se utilizó metodología por (Rodriguez *et al.*, 2005)

#### 2.4.4. Preparación de medio para germinación (M1)

Para la preparación de 1 Litro medio de cultivo para germinación de semillas se necesitaron los siguientes componentes (Tabla 4)

**Tabla 4. Componentes del M1**

Agar	7 g/L
Sales MS	5 g/L
Sacarosa	30 g/L
<b>Vitaminas B5 *</b>	(10ml)
Inositol (100 mg/L)	
TH-Cl (1 mg/L)	

\*Solución madre

Se colocó en un matraz 500 ml de agua destilada estéril, se añadirá sales, sacarosa y vitaminas (preparando previamente una solución madre) componentes pesados anteriormente y disolver. Se debió medir el regular el pH de la solución preparada entre 5,6 a 5,8. Se ubicó la solución preparada anteriormente en un matraz, agregar el agar y añadir los 500 ml de agua destilada restante.

La solución obtenida se llevó al termo agitador para mezclar y para disolver las partículas restantes, durante un periodo de 15 minutos.

Posteriormente se llevó el medio de cultivo preparado al autoclave, la temperatura alcanzó 121 °C y 15 psi durante la esterilización. Antes de servir, se puede agregar antibióticos si fuese necesario luego se sirvió en tubos de ensayo y se dejó enfriar para que solidifique.

#### 2.4.5. Siembra de semillas.

Para la siembra se debió tener la cámara de flujo laminar limpia y con los implementos como pinzas, papel filtro esterilizado, mechero de alcohol, recipiente con alcohol, plástico transparente, rotulador y tubos con medio solidificado.

Se colocó las semillas previamente esterilizadas en el papel filtro para quitar el exceso de humedad, con las pinzas se colocó las semillas en los tubos con medio, tapar y se selló con plástico adherente para evitar la contaminación.

La germinación se la realizó en la cámara de crecimiento artesanal con temperaturas de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , con fotoperiodos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz proporcionada por lámparas fluorescentes “luz de día”, de 60 W.

#### 2.4.6. Preparación de medio para siembra de explantes (M2)

En la preparación 1 Litro del medio cultivo para la siembra de explantes se consideraron los siguientes componentes en la (tabla 5).

**Tabla 5. Componentes del M2**

Agar	7 g/L
Sales MS	5 g/L
Sacarosa	30 g/L
<b>Vitaminas B5 *</b>	(10ml)
Inositol (100 mg/L)	
TH-Cl (1 mg/L)	
<b>Fitohormona</b>	
Bencilaminopurina	1,5 mg/L

\*Solución madre

Se colocó en un matraz 500 ml de agua destilada estéril, donde se añadió sales, sacarosa, vitaminas y las fitohormonas (preparando previamente una solución madre para vitaminas y las citocininas), componentes que fueron pesados anteriormente y luego se disolvió. Se debió regular el pH de la solución preparada entre 5,6 a 5,8. Se ubicó la solución preparada anteriormente en un matraz, donde se añadió el agar y se agregó los 500 ml de agua destilada restante. La solución obtenida se la ubicó en el termo agitador para que se mezcló y se disuelva las partículas restantes, durante un periodo de 15 minutos.

Posteriormente se llevó el medio de cultivo preparado al autoclave, la temperatura debe alcanzar  $121^\circ\text{C}$  y 15 psi para su esterilización. Antes de servir, se añadió antibióticos si fuese necesario luego se sirvió en frascos de vidrio y se dejó enfriar para que solidifique.

#### 2.4.7. Siembra de Meristemas apicales.

Se ubicó los materiales como pinzas, papel filtro esterilizado, mechero de alcohol, recipiente con alcohol, plástico transparente, rotulador, frascos de vidrio con medio de cultivo solidificado y las plántulas a utilizar en la cámara de flujo laminar.

Las plántulas se cortaron con bisturí desde donde comienza el hipocotílo, obteniendo meristemas apicales de 1 a 1,5 cm, además se debió seccionar por la mitad los cotiledones, posteriormente se sembró 2 a 3 meristemas por frascos con medio de cultivo (M2), sellando con plástico adherente y etiquetando respectivamente.

## **2.5. VARIABLES EXPERIMENTALES**

### **2.5.1. Evaluación de Germinación**

Las semillas de los materiales vegetales seleccionados estuvieron evaluadas por días, desde la siembra en el medio M1 (Murashige y Skoog, 1962) hasta la apertura de cotiledones, se evaluó el número de semillas germinadas expresadas en porcentajes. Se utilizaron semillas germinadas de 10, 15, 20 y 25 días para cada tratamiento.

### **2.5.2. Velocidad de germinación**

Se determinó la velocidad de germinación de los materiales genéticos considerando las semillas que presentaron radícula como semilla en estado de emergencia. Para el cálculo de la velocidad de germinación se aplicó la fórmula propuesta por Maguire en 1962.

$$VG = \sum_{i=1}^n \frac{N^{\circ} \text{ semillas}}{\text{Día inicial de conteo}}$$

### **2.5.3. Porcentaje de contaminación**

Los tratamientos fueron evaluados a los 5, 10, 15 días después de la siembra, identificando si existió presencia de microorganismos causantes de contaminación.

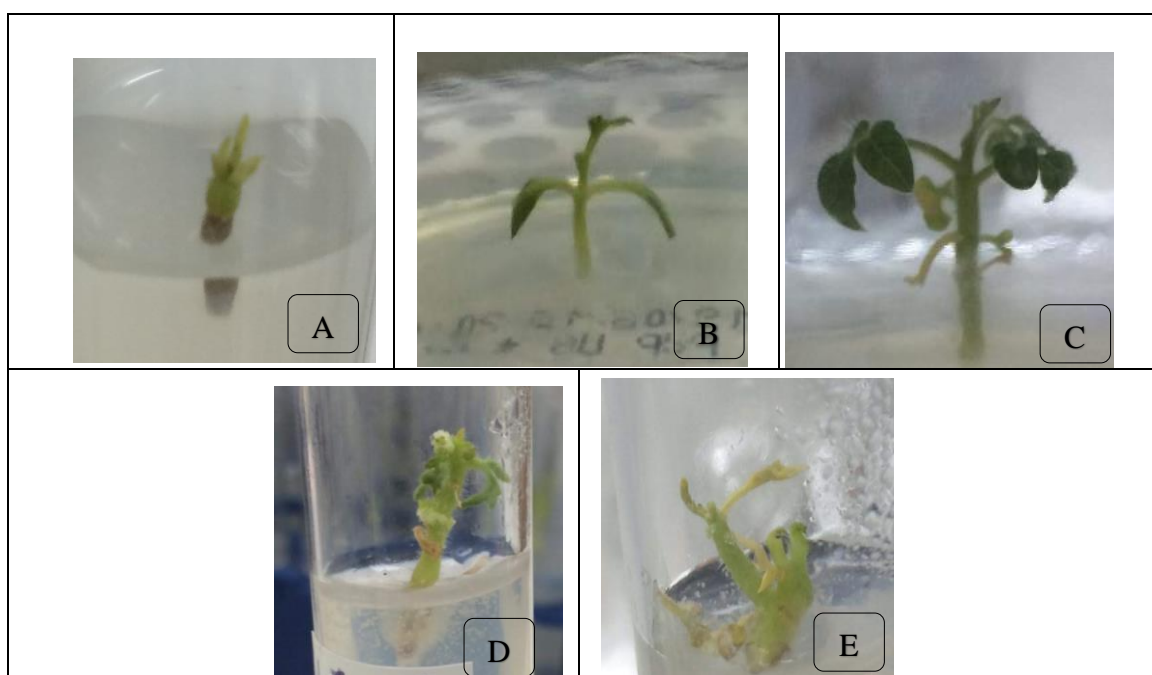
### **2.5.4. Respuestas morfológicas**

El tiempo de respuesta determinó la diferenciación celular y desarrollo de los explantes en cada tratamiento, se evaluó los cambios morfológicos que presentaron cada explante.

Las evaluaciones se realizaron con el uso de la escala arbitraria propuesta por Jonathan Santana, autor de la presente investigación, utilizando la escala mostrada en la siguiente (tabla 6).

**Tabla 6. Respuestas morfológicas en el desarrollo *in vitro* de explantes**

Escala	Características en el desarrollo del explante
A = 0,3	Desarrollo de meristemas apical
B = 0,5	Engrosamiento de tallo y nuevas hojas
C = 0,6	Desarrollo foliar
D = 0,7	Presencia de callos
E = 0,8	Callos con tallos adventicios



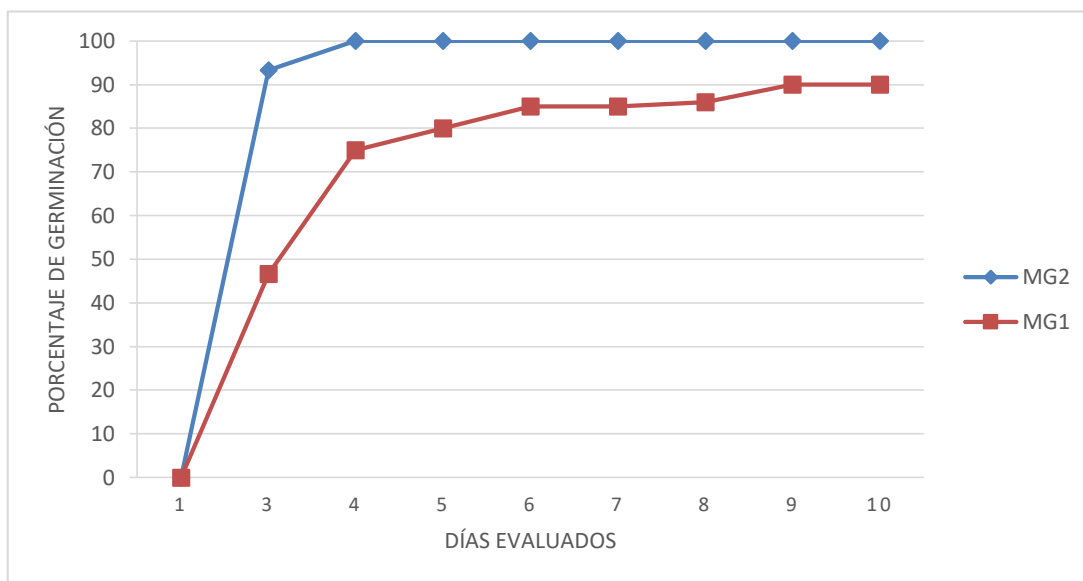
**Figura 1.** Respuestas morfológicas obtenidas por explantes de diferentes días de edad, provenientes de plantas *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* M.



### 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Porcentaje de Germinación

Se presentan los porcentajes de germinación evaluados a partir de los materiales vegetales sembrados en medio de cultivo MS, obteniendo los siguientes resultados.



**Figura 2.** Porcentajes de germinación de los materiales genéticos V. Floradade (MG1) y H. Micaela (MG2)

En la figura 2, se observa el porcentaje de germinación de las semillas de los 2 materiales genéticos hasta los 10 días después de la siembra y se pudo notar que el material MG2 desde el primer día de evaluación hasta el último con un rango de germinación de 90 al 100%. Mientras que MG1 inicia con una germinación del 50% al día 3 y va aumentando paulatinamente hasta llegar al 80% al día 4 y a partir de este día aumenta el porcentaje al 90% hasta el día 10 de evaluación.

Ambos materiales genéticos germinaron a partir del tercer día, sin embargo el Material MG2 alcanzó porcentajes de 90% y el material MG1 de 45%. Dentro de los porcentajes de germinación se logró apreciar que los materiales MG1 y MG2 obtuvieron promedios altos, encontrándose MG2 el 100 % de germinación al quinto día y MG1 obteniendo el 90% al décimo día, utilizando medio MS.

Los resultados obtenidos en la variable son similares a los que obtuvo Rodríguez (2015) cuando evaluó el porcentaje de germinación utilizando el material genético H. Micaela, donde obtuvo valores de 90% a los 3 días y valores máximos 100% a los 10 días. Según

lo evaluado por Benavides (2015) el material genético V. Floradade logra obtener porcentajes de 90 % germinación a los 10 días.

Según Siavichay (2011), utilizó en investigaciones sobre tomate el material genético H. Micaela presentando buenos resultados en cuanto a la variable porcentaje de germinación lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Con los resultados obtenidos en el porcentajes de germinación para los dos materiales genéticos tuvieron relación a lo que describe Salazar *et al.* (2013) en estudios realizados con genotipos de tomate para obtener porcentajes altos de germinación concidero buenos porcesos de desinfección, Mweetwa *et al.* (2008) en estuios similares menciona que puede existir sensibilidad en los materiales genéticos por porcesos largos de desinfección que probocan la baja germinación.

### 3.2. Velocidad de germinación

**Tabla 7.** Velocidad de germinación de los Materiales Genéticos evaluados

<b>Material Genético</b>	<b>Velocidad de Emergencia</b>
Variedad Floradade	8.0
Híbrido Micaela	17.7

En la tabla 7, muestra la velocidad de germinación de los materiales genéticos, donde el Híbrido Micaela alcanzó mayor velocidad de germinación con un valor de 17.7 en los diferentes días de evaluación, mientras que el material genético V. Floradade obtuvo una velocidad de emergencia 8.0.

Según el trabajo realizado por Benavides (2015), demuestra que ciertas variedades de semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill, presentan un buen desarrollo germinativo en diferentes condiciones de fotoperiodos, recalando que obtuvo mejores resultados con fotoperiodos de 16 horas luz y 8 de oscuridad, coincidiendo con las condiciones otorgadas por la presente investigación.

Con los resultados obtenidos cabe mencionar que el material genético H. Micaela por presentar vigor híbrido mostró un índice de velocidad de germinación mayor, a diferencia del material genético V. Floradade.

### 3.3. Porcentaje de contaminación

**Tabla 8.** ANDEVA de la variable Contaminación a los 10,15, 20 y 25 días evaluados.

F.V.	gl	Ev. 1	Ev. 2	Ev. 3	Ev. 4	F. Valor	
		F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	0,05	0,01
<b>FACTOR A</b> <sup>1</sup>	1	1.00 NS	1.21 NS	0.00 NS	0.33 NS	4.17	7.56
<b>FACTOR B</b> <sup>2</sup>	3	1.00 NS	0.80 NS	2.22 NS	1.22 NS	2.92	4.51
<b>FACTOR A*FACTOR B</b>	3	1.00 NS	0.40 NS	0.74 NS	0.33 NS	2.,92	4.51
<b>C.V.</b>		9.49	16.60	17.30	16.00		

<sup>1</sup>/Materiales genéticos

<sup>2</sup>/Edades fisiológicas

En la tabla 8, se presenta el ANDEVA de las evaluaciones realizadas a los 10, 15, 20, 25 días respectivamente de la variable contaminación, aunque fueron observadas contaminaciones en las evaluaciones estas no fueron estadísticamente significativas para los Factores A, B y tampoco para la Interacción A\*B. Además se presenta un coeficiente de variación aceptable en todos los días evaluados.

En la presente investigación fueron identificado los hongos más frecuentes como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* los cuales según Otero (2014) y Gutiérrez *et al.* (2018), son microorganismos contaminantes comunes dentro del desarrollo de cultivo *in vitro*.

Corroborando con las investigaciones realizadas por Alvarado (2003), indicando que los procesos de contaminación no solo se puede expresar por la mala desinfección o el mal manejo en la siembra, si no que pueden aparecer luego de que las plantas han sido cultivadas en muchas ocasiones.

La contaminación observada podría estar relacionada con la existencia de varias bacterias que promueven la contaminación, las cuales viven y se desarrollan lentamente en los medios de cultivo de las plantas o en cierto modo se encuentran en estado latentes Otero (2014) y únicamente pueden ser asociados aun mal manejo o desinfección como lo expresado en investigaciones realizadas por Alvarado (2003)

### 3.4. Respuestas Morfológicas

Los valores obtenidos en las evaluaciones fueron analizados estadísticamente.

**Tabla 9.-** ANDEVA de la variable Respuestas Morfológicas de los 10, 15, 20, 25 días evaluados.

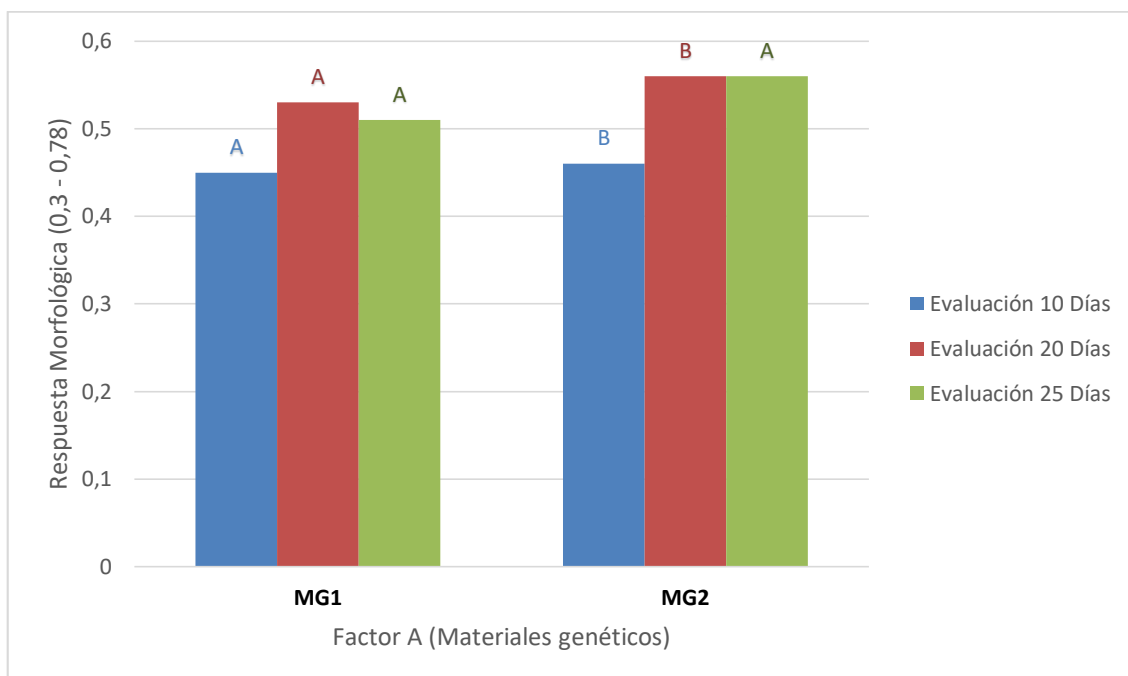
F.V.	gl	Ev. 1	Ev. 2	Ev. 3	Ev. 4	F. Valor	
		F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	0,05	0,01
<b>FACTOR A</b> <sup>1</sup>	1	5,00 *	0,09 NS	7,56 **	5,91 *	4,17	7,56
<b>FACTOR B</b> <sup>2</sup>	3	351,67 **	2,28 NS	12,90 **	4,41 *	2,92	4,51
<b>FACTOR A*FACTOR B</b>	3	5,00 **	1,55 NS	5,91 **	2,76 NS	2,92	4,51
C.V.		4,24	9,06	6,76	10,79		

1/Materiales genéticos

2/Edades fisiológicas

En la tabla 9, el ANDEVA de las evaluaciones realizadas a los 10, 15, 20, 25 días respectivamente, se puede observar en la Evaluación 1, diferencias significativas al 0.05 de probabilidades únicamente en el Factor A (Materiales genéticos), mientras que para Factor B (Edades fisiológicas) y la Interacción A\*B fue significativo al 0.01 de probabilidad. En cuanto a la Evaluación 2, se pudo notar que la F calculada para todos los Factores en estudio fue no significativa (NS).

En la Evaluación 3, se puede notar que la F calculada, para todos los Factores en estudio presentó diferencias significativas al 0.01 de probabilidad. Respecto a la evaluación 4, los valores de la F calculada para los Factores A y B, presentaron diferencias significativas al 0.05 de probabilidad, mientras que la Interacción A\*B fue no significativa.

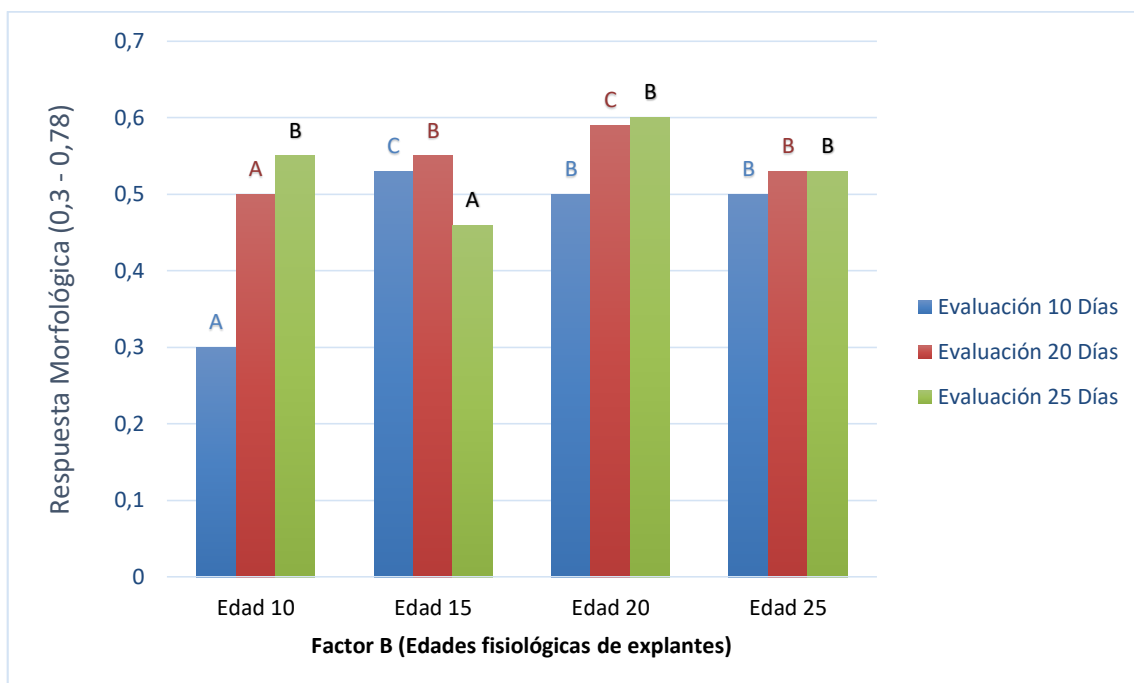


**Figura 3.** Resultados del Factor A (Materiales genéticos) en la diferentes evaluaciones de la variable Respuesta morfológica

La Figura 3, los resultados muestran diferencias estadísticas para el Factor A (Materiales genéticos) y de las evaluaciones realizadas a los 10, 20 y 25 días; donde se determinó que el material genético V. Floradade (MG1) en la evaluación 3 obtuvo una mejor respuesta morfológica con un valor de 0.53 de acuerdo a la escala, a su vez se aprecia que la menor respuesta morfológica se dio en la evaluación a los 10 días con un valor de 0.45.

El material genético H. Micaela (MG2) obtuvo una menor respuesta morfológica en la evaluación de 10 días con un valor de 0,46 conforme a la escala, mientras que la mayor respuesta morfológica se mostró en las evaluaciones 3 y 4 con un valor de 0.56 en ambos materiales.

En los resultados obtenidos sobre los materiales genéticos en estudio indican que existió diferencias entre el híbrido Micaela y la variedad Floradade, mostrando que el material genético híbrido Micaela generó más respuestas morfológicas por el potencial genético que posee. Weldt (2008), en estudios similares, uno de los factores esenciales para la micropropagación de explantes en cultivos *in vitros* es el genotipo y la edad fisiológica del material genético que influyen en el desarrollo morfológico.



**Figura 4.** Respuesta morfológica del Factor B (Edades fisiológica del explante) a los 10,20 y 25 días

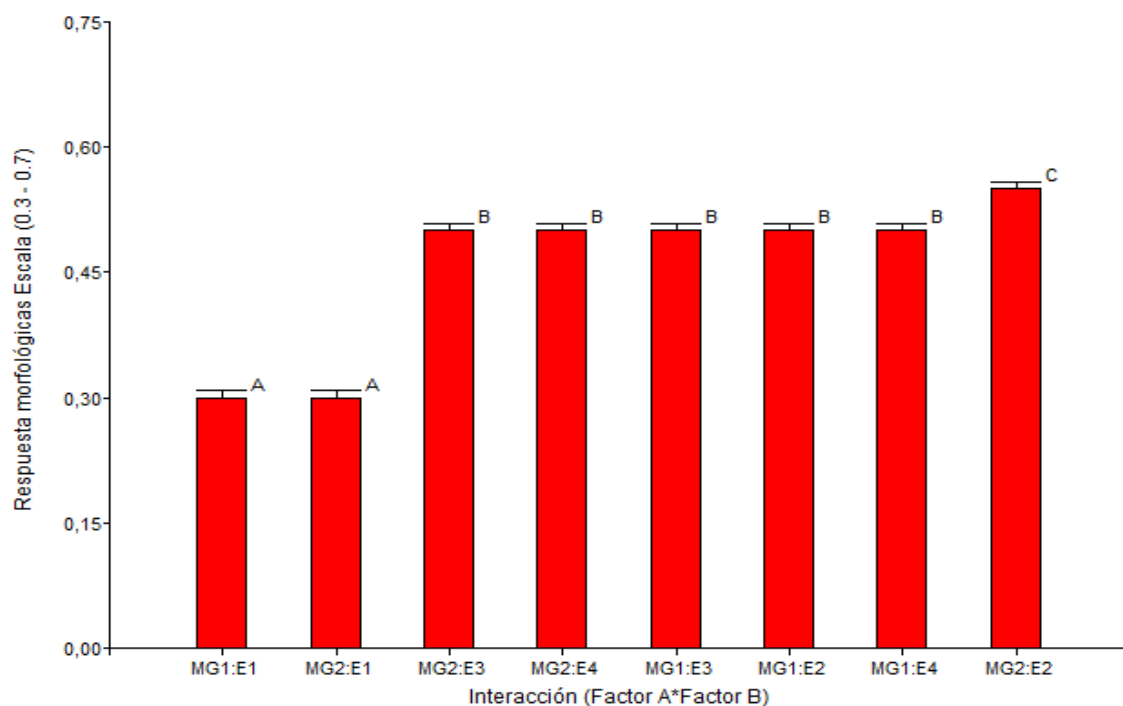
En la figura 4, los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticas para el Factor B (Edades fisiológicas) y de las evaluaciones realizadas a los 10, 20 y 25 días, donde se estableció que las unidades experimentales pertenecientes a la Edad 10, obtuvieron mayor respuesta morfológica en la evaluación 25 días con un valor de 0.55 estando entre la fase Engrosamiento de tallo y nuevas hojas y Desarrollo foliar, en base a la escala. Así mismo, la menor respuesta morfológica se dio en la evaluación de 10 días con un valor de 0.30 que es Desarrollo de meristema apical.

En la Edad 15, los explantes alcanzaron una mayor respuesta en la evaluación de 20 días con valor de 0.55 encontrándose en la fase Engrosamiento de tallo y nuevas hojas y Desarrollo foliar conforme a la escala establecida, mientras que la menor respuesta morfológica se observó en la evaluación de 25 días con valor de 0.46 entre la fase Desarrollo de meristemas apical y Engrosamiento de tallo y nuevas hojas. Respecto a la Edad 20 las unidades experimentales alcanzaron una mejor respuesta en la evaluación de 25 días obteniendo un valor de 0.60 en la fase Desarrollo foliar, a diferencia de la primera evaluación realizada que obtuvo una menor respuesta morfológica llegando a un valor de 0.50 fase de Engrosamiento de tallo y nuevas hojas.

Finalmente la Edad 25 alcanzó una mayor respuesta morfológica en las evaluaciones de 20 y 25 días con un valor de 0.53 entre las fases Engrosamiento de tallo y nuevas hojas para ambas evaluaciones, de la misma manera la menor respuesta morfológica se observó en la evaluación de 10 días con un valor de 0.50 en la fase Engrosamiento de tallo y nuevas hojas de acuerdo a la escala.

Analizando los resultados obtenidos, se pudo observar que hay diferencias significativas entre las 4 edades fisiológicas en estudio, posiblemente se deba a la concentración de citocininas (1,5 mg/L) en el medio de cultivo, donde se observó que los materiales genéticos con edades fisiológicas menores de presentaron más desarrollo en cuanto a las respuestas morfológicas.

Monrroy (2009), en un estudio similar describió que la edad fisiológica del explante influye en la morfogénesis, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta in vitro. Así mismo Borrero (2008), menciona que el uso de la citocinina sola induce a la división celular e inducen la formación de tallos y hojas.

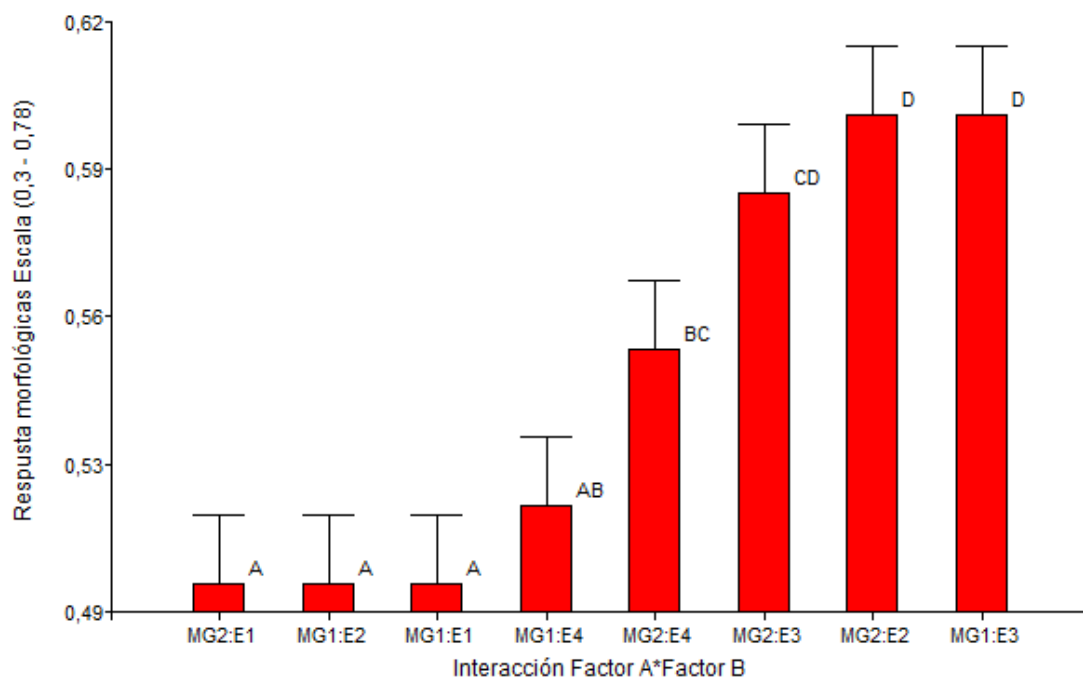


**Figura 5.** Resultados de la Interacción Factor A (Materiales Genéticos) \* Factor B (Edades fisiológicas del explante) en la evaluación a los 10 días, de la variable Respuesta morfológica

En la Figura 5, se presentan los valores promedio obtenidos de la interacción del Factor A\* B, donde se muestran 3 grupos estadísticos de los cuales, el grupo que presentó la mejor respuesta morfológica fue MG2:E2 con un valor de 0.55 estando en entre la fase engrosamiento de tallo y nuevas hojas y desarrollo foliar, según la escala, mientras que el grupo que mostró la respuesta morfológica más baja fueron MG1:E1 y MG2:E1 con un valor de 0.30 en desarrollo de meristema apical.

Mientras que el grupo intermedio que se formó obtuvo una respuesta morfológica dentro de la escala de 0.50 en la fase engrosamiento de tallo y nuevas hojas, lo conformaron MG2:E3, MG2:E4, MG1:E3, MG1:E2, MG1:E4.

Los resultados antes mencionados se deben posiblemente a que el híbrido en estudio por poseer genéticamente vigor híbrido ayudó a una mejor respuesta morfológica si lo comparamos con la variedad, cuando presentaron edades de explante de 15, 20 y 25 días. Mientras que cuando tuvieron edades de explante de 10 días en ambos casos no presentaron diferencias significativas. Al respecto Ambriz (1995), difiere con estos resultados porque en un estudio realizado con explantes de tomate, encontró mejor respuesta morfológica cuando tuvieron edades fisiológica de 7 a 10 días.



**Figura 6.** Resultados de la Interacción Factor A (Materiales Genéticos) \* Factor B (Edades fisiológicas del explante) en la evaluación a los 20 días, de la variable Respuesta morfológica



La Figura 6, se muestran los valores promedios obtenidos de la interacción del Factor A\*B, donde la mejor respuesta morfológica se presentó en MG2:E2 y MG1:E3 con un valor de 0.60 dentro de la escala y que corresponde al desarrollo foliar, mientras que las respuestas morfológicas más bajas fueron MG2:E1, MG1:E2 y MG1:E1 con un valor de 0.50 que significa dentro de la escala engrosamiento de tallo y nuevas hojas.

Así mismo, las interacciones MG1:E4, MG2:E4, MG2:E3 presentaron diferencia significativas entre ellas mostrando con valores de 0.58 y 0.55 presentando las fase engrosamiento de tallo y nuevas hojas y desarrollo foliar de acuerdo a la escala.

Los resultados antes mencionados indican que el híbrido Micaela (MG2) en estudio fue el mejor ante las respuestas morfológicas versus las edades de explantes (15, 20 y 25 días), esto se debe a la parte genética que posee el material, lo que no ocurrió con la variedad Floradade y que su respuesta únicamente fue significativa a la edad fisiología del explante de 20 días.

Similares resultados obtuvo Tello (2016), donde el desarrollo directo de los explantes se dio a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y al origen de material genético.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

- En este ensayo el mejor protocolo para la micropropagación de explantes de tomate está relacionado con el uso de materiales genéticos de edades 15 y 20 días, ya que aplicando concentraciones de citocininas de 1,5 mg/L, se pudo observar mayores respuestas morfológicas en los explantes estudiados. Esto probablemente se debe a que los tejidos vegetales de menor edad requieren de una alta cantidad de citocinina exógena.
- El material genético híbrido Micaela en condiciones controladas, obtuvo el 100% de germinación a los 4 días de su siembra, demostrando que el híbrido gracias a sus características genéticas reacciona de mejor manera frente a la variedad Floradade.
- Las mejores edades fisiológicas para los materiales genéticos fueron: 20 días para V. Floradade y 15 días de edad para H. Micaela.
- Las mejores respuestas morfológicas para los 2 materiales genéticos se mostraron en las edades fisiológicas de 15 y 20 días, por presentar organogénesis directa con rangos de 0.60 que significa desarrollo foliar según la escala establecida.

Se acepta la hipótesis planteada, demostrando que las edades de siembra aplicadas en los 2 genotipos estudiados desarrollaron al menos una respuesta morfológica.

## RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos ensayos sobre cultivos *in vitro*, utilizando diferentes variedades de tomate que presenten mayor producción en la provincia de Santa Elena.
- Realizar nuevas investigaciones que involucren la utilización de diferentes dosis de fitohormonas en las edades fisiológicas mejorando el desarrollo del explante, además de determinar protocolos para la etapa de aclimatación del explante.
- Realizar la prueba de medio en la cámara de flujo laminar para determinar los posibles agentes contaminantes.
- Considerar el registro de temperatura y de humedad relativa dentro de las cámaras de crecimiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Altarés, A. (2015). Protocolos de multiplicación vegetal. Protocolo, Valencia-España.
- Alvarado, Y. (2003). Incedencia, identificación y estrategias para la prevención y el control de contaminantes bacterianos en el cultivo in vitro de la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*). Santa Clara.
- Ambriz, J. (1995). Micropropagación de brotes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a partir de plántulas germinadas in vitro. Tesis de grado, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Barzola, G. (2017). Estudio agrosocioeconómico de la producción de tomate. Tesis de grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias Agrarias, Santa Elena.
- Benavides, P. (2015). Capacidad germinativa del genotipo Florada (*Lycopersicon esculentum* Mill) en diferentes fotoperíodos. Tesis de Grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias Agrarias, La Libertad.
- Borrero, E. (2008). 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, Biotecnología, Quito.
- Cabrera, A. (2008). Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento. tesis, PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN, Guatemala.
- Capote, R., Fundora, M., & González, C. (2009). Comportamiento in vitro de cultivares seleccionados de tomate *Lycopersicon esculentum*. II. Estudio de la calogénesis y rizogénesis espontánea. *Jardin Botanico Nacional*, II(24), 219-225. Recuperado el 25 de Junio de 2019, de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/upsesp/reader.action?docID=3178894&query=Comportamiento%2Bin%2Bvitro%2Bde%2Bcultivares%2Bseleccionados%2Bde%2Btomate%2Blycopersicon%2Besculentum>
- Castro & García, J. Y. (2012). Implementación de un banco de pruebas de sistemas industriales didáctico mediante un PLC S7-1200, en el laboratorio de ingeniería electromecánica de la Universidad Técnica de Cotopaxi periodo 2011. LATACUNGA. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/1314/1/T-UTC-0906.pdf>
- Chacón, R., Flores, D., Alvarado, L., Schimidt, A., & Alvarado, C. (2013). Cultivo in vitro del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Tecnología en Marcha* V, 45-55.

- Chitra, D., & Narmathabai. (2011). Embriogénesis somática en la leguminosa medicinal. (Houtt) Merr.
- Contreras Gatita, I., & Almeida, J. (2005). Micropropación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*(Cav.)Sendtn), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Forest*, 2(47), 9-13.
- Courtis, A. (2014). Crecimiento y desarrollo. Cátedra de Fisiología Vegetal.
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252 -261.
- Escobar, H., & Lee, R. (2009). Manual de Producción de tomate bajo Invernadero. 1(1), 180.
- FAO. (2019). Estadísticas cultivo de tomate. Recuperado el Junio de 2019, de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Fernqvist, F. (2014). Consumer experiences of tomato quality and the effects of credence. Swedish University of Agricultural Sciences. Alnarp.
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195-209.
- Gallego, P. (2013). Embriogénesis somática y regeneración de plantas de *Medicago arborea* L. Valoración como Forraje.
- Garay, A., de la Paz Sánchez, M., García, B., Álvarez, E., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. Mexico.
- Gautheret, R. J. (1966). Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro. En cell differentiation and morphogenesis Eds W Bwewemann. The Netherlands: North Holland Publishing, 55-71.
- Gerszberg, A., Gigot, & Gundersen. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Organ Cult*.
- González, A. (2016). Reproducción Asexual o Multiplicación vegetativa. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema22/multiplicacion-vegetativa.htm>
- Gutiérrez, Y., Torres, Y., Robaina, A., Reinaldo, D., Bauta, M., Rayas, A., & Santos, A. (2018). Influencia de la edad fisiológica de la planta donante sobre contaminantes microbianos en la micropropagación de *Colocasia Esculenta* (L.) Schott. Tesis de grado, Cuba.

- Gutierrez, J. A. (1995). Micropropagacion de brotes de tomate, a partir de plantulas germinadas in vitro. leon.
- Hernández, y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminacion microbana y oxidacion fenolica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Redalyc*, 4(36), 58-69.
- INEC. (2018). Encuesta de superficie y produccion agropecuaria continua (ESPAC); 2017. Recuperado el 2018 de agosto de 28, de <http://www.inec.gob.ec>
- Iracheta, D., López , M., Gonzáles , V., Sánchez, C., & Cárdenas, S. (2006). Variación Genotípica en la capacidad organogénica in vitro del maíz. Texcoco, México. Recuperado el 25 de Junio de 2019, de <https://ebookcentral.proquest.com/lib/upsesp/reader.action?docID=3166170&query=Variaci%25C3%25B3n%25Bgenot%25C3%25ADpica%25Ben%25Bla%25Bca%25Bpacidad%25Borganog%25C3%25A9nica%25Bin%25Bvitro%25Bdel%25Bma%25C3%25ADz>.
- Izquierdo, J. (2009). Evaluacion de la influencia de diferentes concentraciones de auxinas, citoquinina y giberelinas en la multiplicacion in vitro de epidendrum secundum como pauta para su conservacion in vitro. Loja.
- Jiménez, F. (2015). Interacion entre giberelinas y auxinas en tomate micropropagacion de tomate. Tesis doctoral, Valencia.
- Kinet, J., Ghanem, M., Elteren, J., & Albacete, A. (2009). Impacto de la salinidad en la fisiología reproductiva temprana del tomate ( *Solanum lycopersicum* ) en relación con una distribución heterogénea de iones tóxicos en los órganos de las flores. *Functional Plant Biology*, 2(36), 125-136.
- López Marín, L. (2016). Costa Rica. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum*). San Jose, Costa Rica.
- Monrroy, V. (2009). “EFECTO DE LA VARIACIÓN DE MEDIOS Y CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN LA MULTIPLICACIÓN Y MICROBULBIFICACIÓN IN VITRO, DE DOS ECOTIPOS DE AJO (*Allium sativum* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLA DE ALTA CALIDAD”. Tesis de Grado, Universidad Mayor De San Andrés, Carrera de ingeniería agronómica.
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. *Bdigital*, 27(2), 179-191.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. En *Physiologia Plantarum* (Vol. 15, págs. 473-497). Whisconsin.
- Mweetwa, A., Welbaum, G., & Tay, D. (2008). Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulture*, 117(3), 257-262.
- Navarro, L., & Juárez, J. (2005). Microinjerto de ápices caulinares de cítricos in vitro. *Phytohemeroteca*, 170.
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2004). Micropropagación. En *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II* (págs. 353-357). INTA.
- Ortiz, J., Villada, M., Vásquez, S., Arbeláz, S., & Zamudio, D. J. (2013). El Microinjerto.
- Otero, J. A. (2014). Tipos de Contaminación en cultivos celulares y su prevención. León: Indegsal.
- Pérez, S., Leywa, N., Magallanes, M., Arce, A., & Mendez, A. (2016). Contaminant fungi in in vitro establishment of potato apexes. *SciELO*, 37, 56-67.
- Pincay, V. (2017). Multiplicación in vitro de café caturra rojo *Coffea arábica* L. con la interacción de dos fitohormonas. Tesis, Guayaquil, Ecuador.
- Ramírez, Hernando, Lentini, Zaida, Vallejo Cabrera, & Franco Alirio. (Enero de 2009). Evaluación y Selección de un protocolo para la regeneración in vitro de la variedad de tomate Unapal-Arreboles. *Redalyc*, 58(1), 29-33.
- Rodríguez, A., Peralta, M., Hernandez, V., Garcia, A., & Lomelí, P. (2005). Effect of Genotype on Micropropagation of husk tomato. *Chapingo Serie Horticultura*, 11(1), 31-37.
- Rodríguez, G. (2013). Recursos genéticos y genómicos para mejorar la calidad del fruto en tomate. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Santa Fe, Argentina.
- Rodríguez, L. (2015). "EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE TRES GENOTIPOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) BAJO EL EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CREOLINA LÍQUIDA". Tesis de Grado, Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Salazar, S., Amaya, A., & Barrietos, F. (2013). Evaluation of different in vitro culture media in the development of *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *SciELO*, 15(2), 97-105.

- Sangwan, R. S., & Harada, H. (1975). Chemical Regulation of Callus Growth, Organogenesis, Plant Regeneration, and Somatic Embryogenesis in *Antirrhinum majus* Tissue and Cell Cultures. *Journal of Experimental Botany*, 26(6), 868-881.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro (Vol. I). La plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Siavichay, M. (2011). Aclimatación de 10 cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mil), en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo. Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador.
- Srinivasan, R. (2010). Safertomato production techniques. A field guide for soil fertility and pest management. AVRC – The World Vegetable Center. Taiwan.
- Tello, V. (2016). DESPLIEGUE DIFERENCIAL DE GENES CANDIDATOS DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* L.). Tesis de Grado, Quito.
- Van, S. J., Zazimalova, E., & George, E. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. *Institute of Experimental Botany CAS*, 3(1), 205-226.
- Varela, F. (2018). Etapas de micropropagación. *Tecno Agro*(124), 7.
- Villatoro, G. (2014). Efecto de la citoquinina sobre el cuaje y rendimiento del minisandia. Tesis de Grado, Zacapa.
- Weldt, E. (2008). Establecimiento, multiplicación y enraizamiento. Universidad Austral de Chile, Escuela de Agronomía, Valdivia-Chile.



**ANEXOS**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “Estudio y selección de híbridos y variedades de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivares introducidos en la península de Santa Elena”																																		
Registro de germinación en los material: V1= V. FLORADADE y V2= H. MICAELA																																		
FECHAS	MATERIALES	# TUBOS																														TOTAL	%	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
Día 3 26/04/2019	V1	X	X	-	-	-	X	-	-	X	-	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	X	14	46,6
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	93,3	
Día 4 27/04/2019	V1	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	22	75	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 5 28/04/2019	V1	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	24	80	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 6 29/04/2019	V1	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	25	85	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 7 30/04/2019	V1	-	X	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	25	85	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 8 1/05/2019	V1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	26	86	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 9 1/05/2019	V1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	27	90	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Día 10 1/05/2019	V1	-	X	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	27	90	
	V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	100	
Obsevaciones:																																		
Día: 5	El material V1 presenta crecimiento lento en la radícula																																	
Día: 6	Los materiales V1 y V2 presenta porcentaje de germinación del 85 y 100%																																	
Día: 10	Las plántulas comienzan con la apertura de cotiledones.																																	
Jonathan Santana P. 04/2019																																		

Figura 1A. Matriz de evaluación de porcentaje de germinación

Material Genético	Variable: Velocidad de emergencia					
	Día 3		Día 6		Día 9	
	Plantas emergidas	Plantas no emergidas	Plantas emergidas	Plantas no emergidas	Plantas emergidas	Plantas no emergidas
Variedad Floradade	14	16	22	8	27	3
Híbrido Micaela	28	2	30	0	30	0

Figura 2A. Matriz de evaluación velocidad de germinación

UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA DE SANTA ELENA											
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS											
CARRERA AGROPECUARIA											
Proyecto: Estudio y selección de híbridos y variedad de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivos introducidos en la provincia de Santa Elena.											
Fecha de Siembra:		Variable: Porcentaje de Contaminación									
Medio de Siembra: 1,5 mg de citocinina		Material Genético: V1=Floradade V2=Micaela									
TRATAMIENTOS	Explantos de:	Días de evaluación después de la siembra									Observaciones
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	
T1: V1A1 27/09/2018	15 días	02/10/2018	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	-	x	-	-	-	-	-	Presencia de presipitados (contaminado por hongos en el explante)
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R6	-	-	-	-	-	-	x	-	-	contaminación
	R7	-	-	x	-	-	-	-	-	-	Presencia de presipitados (contaminado por hongos en el explante)
%	0%	0%	14%	14%	0%	0%	20%	0%	0%		
T2: V1A2 02/10/2018	20 días	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	x	-	-	-	-	-	-	contaminado por hongos blanco algodonoso
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
T3: V1A3 08/10/2018 27/10/2018	25 días	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	30/11/2018	05/12/2018	10/12/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
T4: V1A4 12/10/2018 31/10/2018	30 días	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	30/11/2018	05/12/2018	10/12/2018	15/12/2018	
	R1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	deshidratación en el apice
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	14%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
T5: V2A1 27/09/2018	15 días	02/10/2018	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
	R2	-	-	-	-	-	-	-	x	-	medio blando, se cae el explante, contaminado
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	oxidación en la base del explante
%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	14%	100%		
T6: V2A2 02/10/2018	20 días	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	x	-	-	-	-	-	-	contaminado por hongos blanco algodonoso en el explante
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	0%	17%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
T7: V2A3 08/10/2018	25 días	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Presencia de deshidratación
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
T8: V2A4 12/10/2018	30 días	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	
	R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Presencia de deshidratación en el apice
	R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	R7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		

(-) No existe contaminación  
(x) Contaminación

(\*) Deshidratado  
(+) Oxidación

J. Santana (30/9/2018)

Figura 3A. Matriz de evaluación de la variable contaminación

Escala	Estado de las unidades experimentales
<b>1 = 0,3</b>	No contaminado
<b>2 = 0,5</b>	Contaminado

**Figura 4A.** Escala de evaluación para la matriz de contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0008 gl: 35				
Factor A	Medias	n	E.E.	
2	0,30	24	0,01	A
1	0,31	24	0,01	A

**Figura 5A.** Medias de Factor A, Primera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0008 gl: 35				
Factor B	Medias	n	E.E.	
3	0,30	12	0,01	A
2	0,30	12	0,01	A
1	0,30	12	0,01	A
4	0,32	12	0,01	A

**Figura 6A.** Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05						
Error: 0,0008 gl: 35						
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.		
2	1	0,30	6	0,01	A	
2	2	0,30	6	0,01	A	
2	3	0,30	6	0,01	A	
2	4	0,30	6	0,01	A	
1	1	0,30	6	0,01	A	
1	2	0,30	6	0,01	A	
1	3	0,30	6	0,01	A	
1	4	0,33	6	0,01	A	

**Figura 7A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Primera Evaluación, Variable contaminación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,01	12	8,3E-04	1,00	0,4690	
Factor A	8,3E-04	1	8,3E-04	1,00	0,3242	
Factor B	2,5E-03	3	8,3E-04	1,00	0,4043	
Repetición	4,2E-03	5	8,3E-04	1,00	0,4321	
Factor A*Factor B	2,5E-03	3	8,3E-04	1,00	0,4043	
Error	0,03	35	8,3E-04			
Total	0,04	47				

**Figura 8A.** Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0028 gl: 35				
Factor A	Medias	n	E.E.	
1	0,31	24	0,01	A
2	0,33	24	0,01	A

**Figura 9A.** Medias de Factor A, Segunda evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0028 gl: 35				
Factor B	Medias	n	E.E.	
4	0,30	12	0,02	A
1	0,32	12	0,02	A
3	0,32	12	0,02	A
2	0,33	12	0,02	A

**Figura 10A.** Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0028 gl: 35				
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.
2	4	0,30	6	0,02 A
1	4	0,30	6	0,02 A
1	3	0,30	6	0,02 A
1	1	0,30	6	0,02 A
2	3	0,33	6	0,02 A
2	2	0,33	6	0,02 A
2	1	0,33	6	0,02 A
1	2	0,33	6	0,02 A

**Figura 11A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Segunda Evaluación, Variable contaminación

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Contaminación Eva. 15 Días..	48	0,34	0,11	16,60	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,05	12	4,2E-03	1,51	0,1676
Factor A	3,3E-03	1	3,3E-03	1,21	0,2794
Factor B	0,01	3	2,2E-03	0,80	0,4998
Repeticion	0,04	5	0,01	2,66	0,0389
Factor A*Factor B	3,3E-03	3	1,1E-03	0,40	0,7522
Error	0,10	35	2,8E-03		
Total	0,15	47			

**Figura 12A.** Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0030 gl: 40				
Factor A	Medias	n	E.E.	
1	0,32	24	0,01	A
2	0,32	24	0,01	A

**Figura 13A.** Medias de Factor A, Tercera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0030 gl: 40				
Factor B	Medias	n	E.E.	
3	0,30	12	0,02	A
4	0,30	12	0,02	A
1	0,32	12	0,02	A B
2	0,35	12	0,02	B

**Figura 14A.** Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0030 gl: 40					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
2	1	0,30	6	0,02	A
2	3	0,30	6	0,02	A
2	4	0,30	6	0,02	A
1	4	0,30	6	0,02	A
1	3	0,30	6	0,02	A
1	2	0,33	6	0,02	A
1	1	0,33	6	0,02	A
2	2	0,37	6	0,02	A

**Figura 15A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Tercera Evaluación, Variable contaminación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,03	7	3,8E-03	1,27	0,2897	
Factor A	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999	
Factor B	0,02	3	0,01	2,22	0,1004	
Factor A*Factor B	0,01	3	2,2E-03	0,74	0,5341	
Error	0,12	40	3,0E-03			
Total	0,15	47				

**Figura 16A.** Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0025 gl: 40				
Factor A	Medias	n	E.E.	
2	0,31	24	0,01	A
1	0,32	24	0,01	A

**Figura 17A.** Medias de Factor A, Cuarta evaluación, Variable contaminación



Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0025 gl: 40				
Factor B	Medias	n	E.E.	
3	0,30	12	0,01	A
4	0,30	12	0,01	A
1	0,32	12	0,01	A
2	0,33	12	0,01	A

Figura 18A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable contaminación

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0025 gl: 40				
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.
2	1	0,30	6	0,02 A
2	3	0,30	6	0,02 A
2	4	0,30	6	0,02 A
1	4	0,30	6	0,02 A
1	3	0,30	6	0,02 A
1	1	0,33	6	0,02 A
1	2	0,33	6	0,02 A
2	2	0,33	6	0,02 A

Figura 19A. Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable contaminación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	7	1,8E-03	0,71	0,6602
Factor A	8,3E-04	1	8,3E-04	0,33	0,5669
Factor B	0,01	3	3,1E-03	1,22	0,3142
Factor A*Factor B	2,5E-03	3	8,3E-04	0,33	0,8013
Error	0,10	40	2,5E-03		
Total	0,11	47			

Figura 20A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable contaminación



Proyecto: Estudio y selección de híbridos y variedad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivos introducidos en la provincia de Santa Elena.

Ficha N°: 3

Variable: Fases fenológicas en el desarrollo in vitro de explantes

Fecha de Siembra: 27/07/18 - 14/08/18

Medio de Siembra: 1,5 mg de citocinina

Material Genético: V1=Floradade V2=Micaela

TRATAMIENTOS	Explantes de:	Días de evaluación después de la siembra									Observaciones
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	
	15 días	02/10/2018	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	
T1: V1A1 27/09/2018	R1	E	C	C	C	C	C	C	E	E	El desarrollo es en la yema apical
	R2	E	C	C							descartada
	R3	E	C	C	C	C	C	C	C	E	engrosamiento del tallo
	R4	E	C	C	C	C	C	C	C	C	engrosamiento del tallo
	R5	E	C	C	C	C	C	C	E	E	engrosamiento del tallo
	R6	E	C	C	C	C	C				engrosamiento del tallo
	R7	E	C								descartada
T2: V1A2 02/10/2018	20 días	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	
	R1	A	C	C	C	C	C	C	E	E	engrosamiento del tallo
	R2	A	C	C	C	C	C	C	D	D	engrosamiento del tallo
	R3	A	C	C	C	C	C	C	E	E	engrosamiento del tallo
	R4	A	C	C	C	C	C	C	E	E	engrosamiento del tallo
	R5	A	C								descartada
	R6	A	C	C	C	C	C	C	C	E	engrosamiento del tallo
T3: V1A3 08/10/2018 27/10/2018	25 días	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	30/11/2018	05/12/2018	10/12/2018	
	R1	A	E	D	C	C	C	C			desarrollo de hojas
	R2	A	E	D	E	E	E	E			desarrollo de hojas
	R3	A	E	D	C	C	C	C			desarrollo de hojas
	R4	A	E	D							desarrollo de hojas
	R5	A	E	D	E	E	E	E			desarrollo de hojas
	R6	A	E	D	C	C	C	C			desarrollo de hojas
R7	A	E	C	F	F	F	F			desarrollo de hojas y brotes, engrosamiento de tallo	
T4: V1A4 12/10/2018 31/10/2018	30 días	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	30/11/2018	05/12/2018	10/12/2018	15/12/2018	
	R1	E	C	C	C	C	C				presento desarrollo vegetal, solo en las hojas
	R2	E	C	C	C	C	C				Medios con precipitados
	R3	E	C	C	C	C	C				desarrollo de hojas
	R4	E	C	E	E	E	E				desarrollo de hojas
	R5	E	C	C	C	C	C				desarrollo de hojas
	R6	E	C	C	C	C	C				desarrollo de hojas

Figura 21A. Matriz de evaluación de la variable respuestas morfológicas

T5: V2A1 27/09/2018	15 días	02/10/2018	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	
	R1	E	C	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R2	E	C	C	C	C	C	C			desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R3	E	C	C	C	C	C	C	E	E	Medios con precipitados
	R4	E	C	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R5	E	C	C	C	C	C	C	E	F	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R6	E	C	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R7	E	C	C	C	C	C	C	C	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
T6: V2A2 02/10/2018	20 días	09/10/2018	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	
	R1	C	C	C	C	C	C	C	E	C	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R2	E	E								descartada
	R3	C	C	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R4	E	E	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R5	E	E	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
	R6	C	C	C	C	C	C	C	E	E	desarrollo de hojas y engrosamiento de tallo
T7: V2A3 08/10/2018	25 días	12/10/2018	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	
	R1	B	B	C	C	C	C	C	E	E	
	R2	B	B	C	C	C	C	C			engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
	R3	B	B	C	C	C	E	C	E	E	engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
	R4	B	B	C	C	C	D	C	E	E	engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
	R5	B	B	C	C	C	D	C	E	E	engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
	R6	B	B	C	C	C	D	C	E	E	engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
	R7	B	B	C	C	C	D	C	E	E	engrosamiento del tallo, dejo de desarrollar hojas
T8: V2A4 12/10/2018	30 días	17/10/2018	22/10/2018	27/10/2018	31/10/2018	05/11/2018	10/11/2018	15/11/2018	20/11/2018	25/11/2018	
	R1	C	C	D	D	C	C	C	C	C	el engrosamiento es leve en la base del explante
	R2	C	C	C	C	C	C	C	C	C	engrosamiento de tallo
	R3	C	F	F	F	F	F	F	F	F	desarrollo de brotes (4 brotes) Los brotes presentan deshidratación
	R4	C	C	C	C	C	C	C	C	C	engrosamiento de tallo
	R5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	engrosamiento de tallo
	R6	C	C	C	C	C	C	C	C	C	engrosamiento de tallo

**Figura 22A.** Matriz de evaluación de la variable respuestas morfológicas

Escala	Características en el desarrollo del explante
<b>A = 0,3</b>	Desarrollo de meristemas apical
<b>B = 0,5</b>	Engrosamiento de tallo y nuevas hojas
<b>C = 0,6</b>	Desarrollo foliar
<b>D = 0,7</b>	Presencia de callos
<b>E = 0,8</b>	Callos con tallos adventicios

**Figura 23A.** Escala de evaluación para la matriz de respuestas morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0004 gl: 35				
Factor A Medias n E.E.				
1	0,45	24	4,0E-03	A
2	0,46	24	4,0E-03	B

**Figura 24A.** Medias de Factor A, Primera evaluación, 6 días, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0004 gl: 35				
Factor B Medias n E.E.				
1	0,30	12	0,01	A
3	0,50	12	0,01	B
4	0,50	12	0,01	B
2	0,53	12	0,01	C

**Figura 25A.** Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0004 gl: 35					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
1	1	0,30	6	0,01	A
2	1	0,30	6	0,01	A
2	3	0,50	6	0,01	B
2	4	0,50	6	0,01	B
1	3	0,50	6	0,01	B
1	2	0,50	6	0,01	B
1	4	0,50	6	0,01	B
2	2	0,55	6	0,01	C

**Figura 26A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Primera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	12	0,03	90,00	<0,0001
Factor A	1,9E-03	1	1,9E-03	5,00	0,0318
Factor B	0,40	3	0,13	351,67	<0,0001
Repeticion	1,9E-03	5	3,7E-04	1,00	0,4321
Factor A*Factor B	0,01	3	1,9E-03	5,00	0,0054
Error	0,01	35	3,7E-04		
Total	0,42	47			

**Figura 27A.** Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0023 gl: 35					
Factor A Medias n E.E.					
1		0,53	24	0,01	A
2		0,53	24	0,01	A

**Figura 29A.** Medias de Factor A, Segunda evaluación, 12 días, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0023 gl: 35					
Factor B Medias n E.E.					
1		0,50	12	0,01	A
2		0,53	12	0,01	A B
4		0,53	12	0,01	A B
3		0,55	12	0,01	B

**Figura 28A.** Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0023 gl: 35					
Factor A Factor B Medias n E.E.					
2	1	0,50	6	0,02	A
1	2	0,50	6	0,02	A
1	1	0,50	6	0,02	A
2	3	0,53	6	0,02	A B
2	4	0,53	6	0,02	A B
1	4	0,53	6	0,02	A B
2	2	0,55	6	0,02	A B
1	3	0,57	6	0,02	B

**Figura 30A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Segunda Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	12	2,9E-03	1,28	0,2735
Factor A	2,1E-04	1	2,1E-04	0,09	0,7642
Factor B	0,02	3	0,01	2,28	0,0959
Repetición	0,01	5	1,7E-03	0,75	0,5921
Factor A*Factor B	0,01	3	3,5E-03	1,55	0,2180
Error	0,08	35	2,3E-03		
Total	0,11	47			

**Figura 31A.** Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0014 gl: 35				
Factor A	Medias	n	E.E.	
1	0,53	24	0,01	A
2	0,56	24	0,01	B

**Figura 32A.** Medias de Factor A, Tercera evaluación, 18 días, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 0,0014 gl: 35				
Factor B	Medias	n	E.E.	
1	0,50	12	0,01	A
4	0,53	12	0,01	B
2	0,55	12	0,01	B
3	0,59	12	0,01	C

**Figura 33A.** Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0014 gl: 35					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
2	1	0,50	6	0,02	A
1	2	0,50	6	0,02	A
1	1	0,50	6	0,02	A
1	4	0,52	6	0,02	A B
2	4	0,55	6	0,02	B C
2	3	0,58	6	0,02	C D
2	2	0,60	6	0,02	D
1	3	0,60	6	0,02	D

**Figura 34A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Tercera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,09	12	0,01	5,60	<0,0001
Factor A	0,01	1	0,01	7,56	0,0094
Factor B	0,05	3	0,02	12,90	<0,0001
Repetición	4,4E-03	5	8,7E-04	0,65	0,6651
Factor A*Factor B	0,02	3	0,01	5,91	0,0023
Error	0,05	35	1,4E-03		
Total	0,14	47			

**Figura 35A.** Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05			
Error: 0,0141 gl: 35			
Factor A	Medias	n	E.E.
1	0,51	24	0,02 A
2	0,56	24	0,02 A

**Figura 36A.** Medias de Factor A, Cuarta evaluación, 24 días, Variable Respuesta morfológica



Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 0,0141 gl: 35					
Factor B	Medias	n	E.E.		
2	0,46	12	0,03	A	
4	0,53	12	0,03	A	B
1	0,55	12	0,03	A	B
3	0,60	12	0,03		B

**Figura 38A.** Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Test:Duncan Alfa=0,05						
Error: 0,0141 gl: 35						
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.		
1	2	0,42	6	0,05	A	
1	1	0,50	6	0,05	A	B
2	2	0,50	6	0,05	A	B
1	4	0,52	6	0,05	A	B
2	4	0,55	6	0,05	A	B
2	3	0,58	6	0,05		B
2	1	0,60	6	0,05		B
1	3	0,62	6	0,05		B

**Figura 37A.** Medias de Interacción Factor A\* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,26	12	0,02	1,50	0,1697
Factor A	0,03	1	0,03	1,78	0,1904
Factor B	0,12	3	0,04	2,92	0,0474
Repetición	0,07	5	0,01	1,04	0,4096
Factor A*Factor B	0,03	3	0,01	0,76	0,5234
Error	0,49	35	0,01		
Total	0,75	47			

**Figura A 39.** Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica



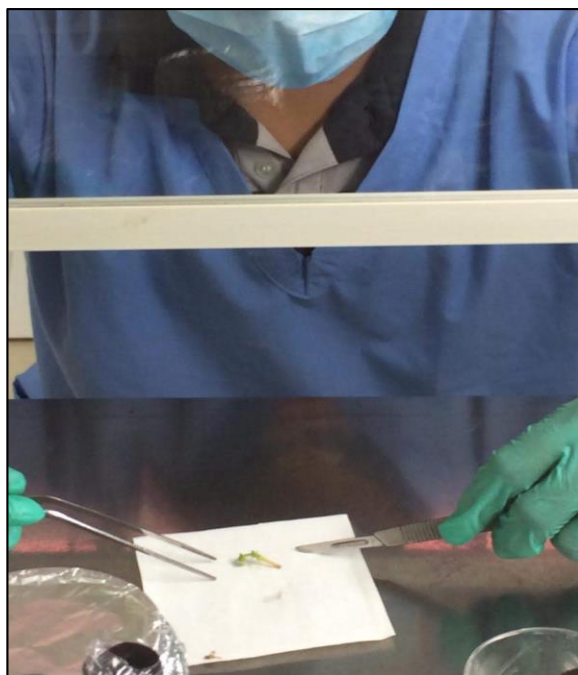
**Figura 40A.** Siembra de los materiales genéticos en tubos de ensayos.



**Figura 41A.** Materiales Genéticos en desarrollo dentro de la cámara de crecimiento



**Figura 42A.** Desarrollo morfológico de las unidades experimentales en la cámara de crecimiento



**Figura 43A.** Siembra de explantes de diferentes edades fisiológicas.



**Figura 44A.** Desarrollo del explante a los 15 días de la variedad Floradade



**Figura 45A.** Contaminación por hongos en el establecimiento en el establecimiento del cultivo *in vitro*.



**Figura A 46.** Desarrollo del explante de 25 días de edad, trasplantado a sustrato orgánico





**Figura 47A.** Desarrollo de la unidad experimental, lista para la aclimatación