



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA

**PRODUCCIÓN DE BROTES MERISTEMÁTICOS EN
BAJAS CONCENTRACIONES DE CITOCININAS PARA LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum*)**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: Edwin Omar Alejandro Torres.

LA LIBERTAD, 2022



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE AGROPECUARIA

**PRODUCCIÓN DE BROTES MERISTEMÁTICOS EN
BAJAS CONCENTRACIONES DE CITOCININAS PARA LA
PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum*)**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Requisito parcial para la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

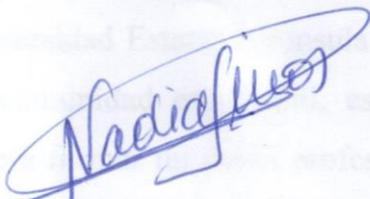
Autor: Edwin Omar Alejandro Torres

Tutora: Lourdes Ortega Maldonado

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **EDWIN OMAR ALEJANDRO TORRES** como requisito parcial para la obtención del grado de Ingeniero Agropecuario de la Carrera de Agropecuaria.

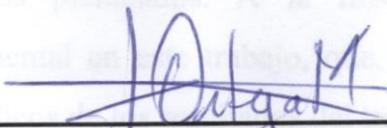
Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 09 / Febrero /2022 (Día, mes, año)



Ing. Nadia Quevedo Pinos, Ph.D
DIRECTORA DE CARRERA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Javier Soto Valenzuela, Ph.D
PROFESOR ESPECIALISTA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ing. Lourdes Ortega Maldonado, Msc
PROFESORA TUTOR/A
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ing. Ana Villalta Gómez
PROFESOR GUÍA DE LA UIC
SECRETARIO

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios en primer lugar, por darme la fortaleza y ser mi guía para continuar y poder llegar a mi objetivo de culminar mis estudios de tercer nivel.

A mi madrecita Manuela Torres Asencio, por ser una mujer luchadora que día a día ha hecho un gran esfuerzo, ya que siempre me dio sus palabras de aliento para no rendirme y dándome sus buenas energías. Estaré siempre agradecido por darme los estudios y la educación inculcada con los valores de la buena familia que ella viene. A mis abuelitos maternos por ser unos grandes padres y por estar la mayor parte de mi vida, ahora por guiarme y protegerme espiritualmente. Así como también al resto de mi familia materna.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, por darme la oportunidad de ser parte de a la comunidad estudiantil, especialmente a la Facultad de Ciencias Agrarias por ayudarme a formar mi perfil profesional. A los docentes por brindar sus conocimientos y experiencias otorgada en cada clase durante estos años. Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la UPSE, al Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal donde desarrolle el presente estudio de investigación.

A la Ingeniera Lourdes Ortega Maldonado que como tutora me permitió formar parte del proyecto de investigación que ejecutaba, logrando con su conocimiento cumplir los objetivos planteados. A la Ingeniera Clotilde Andrade Varela por ser otro pilar fundamental en este trabajo, que, gracias a su ayuda brindada se estableció los análisis estadísticos de los resultados del trabajo de investigación.

A mis compañeros de aula, quienes siempre expresaron apoyo mutuo; por ser un grupo unido y solidario; y a mis compañeras de trabajo, por el apoyo brindado durante el periodo del presente estudio.

Bendiciones para todos/as. Muchas Gracias.

Edwin Omar Alejandro Torres.

DEDICATORIA

Quiero expresar desde lo más profundo de mi alma, este trabajo de investigación y titulación a una mujer que ha sido el pilar fundamental durante todo este tiempo hasta llegar a esta tercera etapa de estudios, mi amada y querida Madre que a base de mucho esfuerzo, sacrificio y perseverancia siempre estuvo ahí en todo momento para seguir y culminar mis estudios con responsabilidad, apoyarme para ser un profesional y persona de bien, siendo ella mi ejemplo y fortaleza para cumplir unos de mis objetivos de mi vida y no dejarme solo a mitad del camino. Dios me la siga dando salud y bendiciendo.

Edwin Omar Alejandro Torres

RESUMEN

Solanum lycopersicum es una hortaliza muy consumida e importante en Ecuador, sin embargo, produce 63 955 toneladas de tomate, además, este cultivo tiene buenas respuestas fenológicas en la sierra y en la costa ecuatoriana, En Ecuador se obtiene un promedio de 20 ton/ha el cual está por debajo del rendimiento promedio de los países vecinos (Yunda, 2020). En la provincia de Santa Elena la producción anual de tomates alcanza 1 399 toneladas (Barreiro, 2015). Al ser una hortaliza de gran demanda, en investigaciones previas del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la UPSE, se planteó en multiplicar la especie, realizando mejoramiento genético y adaptándola al entorno ambiental de la provincia de Santa Elena, realizando una propagación masiva mediante método de propagación *in vitro* en ambiente aséptico para tener plantas libres de enfermedades, patógenos, etc. El objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de brotes a partir de explantes meristemáticos cultivados en bajas concentraciones de citocininas (BAP), obtenidas mediante micropropagación *in vitro* de tres genotipos de tomate UPSE 78, UPSE 19 e híbrido Micaela. Para el análisis de los resultados, se aplicó el diseño completamente aleatorio (DCA) con un arreglo factorial de 3x4 donde se utilizaron los tres materiales vegetales mencionados, con tres concentraciones de citocininas más el testigo, siendo los siguientes tratamientos 0.0 mg/L (testigo), 0.2 mg/L BAP, 0.3 mg/L BAP y 0.4 mg/L BAP para los genotipos 78, 19 y Micaela. Como resultado con respecto a la producción de brotes, se concluye que el material genético Micaela requiere concentraciones de 0,3 mg/ y 0,4 mg/L para aumentar la producción de brotes.

Palabras claves: Micropropagación, *in vitro*, producción de brotes, bajas concentraciones.

ABSTRACT

Solanum lycopersicum is a widely consumed and important vegetable in Ecuador, however, it produces 63,955 tons of tomato. In addition, this crop has a good phenological responses in the highlands and on the Ecuadorian coast. In Ecuador, the average yield is 20 tons/ha, which is below the average yield of neighboring countries (Yunda, 2020). In the province of Santa Elena, annual tomato production reaches 1 399 tons (Barreiro, 2015). Being a vegetable in great demand, previous research by the Biotechnological Research Center of the UPSE has proposed to multiply the species, performing genetic improvement and adaptation to the environment in the province of Santa Elena, mass propagation by *in vitro* propagation method in an aseptic environment in order to have plants free of diseases, pathogens, etc. The objective of this research was to evaluate the production of shoots from meristematic explants grown in low concentrations of cytokinins (BAP), obtained by *in vitro* micropropagation of three tomato genotypes UPSE 78, UPSE 19 and hybrid Micaela. For the analysis of the results, a completely randomized design (CRD) was applied with a 3x4 factorial arrangement where the three plant materials mentioned above were used, with three cytokinin concentrations plus the control, the following treatments being 0.0 mg/L (control), 0.2 mg/L BAP, 0.3 mg/L BAP and 0.4 mg/L BAP for genotypes 78, 19 and Micaela. As a result, with respect to shoot production, it is concluded that the genetic material Micaela requires concentrations of 0.3 mg/L 0,4 mg/L to increase shoot production.

Palabras claves: Micropropagation, *in vitro*, shoots production, low concentrations.

INTRODUCCIÓN... **DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD**

Problema Científico.....

El presente Trabajo de Integración Curricular titulado **“PRODUCCIÓN DE BROTES MERISTEMÁTICOS EN BAJAS CONCENTRACIONES DE CITOCININAS PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)”** y elaborado por **Edwin Omar Alejandro Torres**, declara que la concepción, análisis y resultados son originales y aportan a la actividad científica educativa agropecuaria.

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....

1.1 Generalidades del tomate.....

1.1.1 Taxonomía.....

1.1.2 Características botánicas.....

1.2 Condiciones edafoclimáticas.....

Transferencia de derechos autorales.

1.3 Plagas y enfermedades del tomate.....

"El contenido del presente Trabajo de Graduación es de mi responsabilidad; el patrimonio intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena".

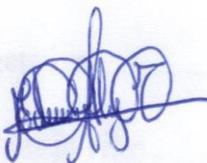
1.3.2 Enfermedades.....

1.4 Reproducción de plantas en general.....

1.4.1 Propagación vegetativa.....

1.4.2 Tipos de propagación vegetativa.....

1.4.6 Micropropagación de plantas.....



Firma del estudiante

1.4.7 Protocolos de propagación.....

1.4.8 Técnicas para la propagación de tejidos.....

1.5 Biotecnología Vegetal.....

1.6 Fitohormonas u hormonas de crecimiento.....

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Problema Científico:.....	3
Objetivos.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos	3
Hipótesis:	3
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Generalidades del tomate.....	4
1.1.1 Taxonomía	4
1.1.2 Características botánicas	4
1.2 Condiciones edafoclimáticas	5
1.3 Plagas y enfermedades del tomate.....	6
1.3.1 Plagas	6
1.3.2 Enfermedades.....	7
1.4 Reproducción de plantas en general	9
1.4.1 Propagación vegetativa	10
1.4.2 Tipos de propagación vegetativa	10
1.4.6 Micropropagación de plantas in vitro	13
1.4.7 Protocolos de propagación de tomate in vitro.....	14
1.4.8 Técnicas para la propagación de tejidos en laboratorios	15
1.5 Biotecnología Vegetal	17
1.6 Fitohormona u hormona de crecimiento.....	17
1.6.1 Citocininas	18
1.6.2 Kinetina.....	18
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

2.1	Caracterización del área de estudio	19
2.2	Material genético	20
2.2.1	Líneas promisorias de tomate tolerantes al estrés hídrico UPSE 78 y UPSE 19.....	20
2.2.2	Hibrido Micaela Ha 1903.....	21
2.3	Materiales, equipos e insumos.....	21
2.4	Tratamientos y Delineamiento experimental.....	22
2.4.1	Delineamiento experimental	23
2.5	Manejo del experimento	23
2.5.1	Protocolo de desinfección	23
2.5.2	Lavado de los materiales de laboratorio	24
2.5.3	Preparación de medio Murashige & Skoog (MS).....	24
2.5.4	Metodología para la preparación del medio de cultivo MS.....	25
2.5.5	Desinfección de semillas.....	26
2.5.6	Pre germinación de semillas	26
2.5.7	Preparación del medio de cultivo para semillas germinadas (MS1).....	26
2.5.8	Siembra de semillas pregerminadas.....	27
2.5.9	Preparación de medio para siembra de explantes (MS2).....	27
2.5.10	Siembra de meristemos apicales	28
2.6	Parámetros evaluados	28
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		30
3.1	Porcentaje de germinación	30
3.2	Número de brotes	31
3.3	Longitud de brotes	32
3.4	Número de hojas	37
3.5	Porcentaje de oxidación	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		40

Conclusiones.....	40
Recomendaciones	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del cultivo de tomate	4
Tabla 2. Composición de los medios de cultivos utilizados en las diferentes etapas de la regeneración de tomate.....	14
Tabla 3. Descripción agronómica de la línea UPSE 78.....	20
Tabla 4. Descripción agronómica de la línea UPSE 19.....	20
Tabla 5. Descripción agronómica del Híbrido Micaela.....	21
Tabla 6. Detalle de materiales genéticos y concentraciones de hormonas.....	22
Tabla 7. Número de tratamientos.....	22
Tabla 8. ANDEVA	23
Tabla 9. Concentración de vitaminas en medio de Murashige & Skoog.....	24
Tabla 10. Composición de sales del medio Murashige & Skoog (MS)	24
Tabla 11. Materiales para preparar 1 L de medio Murashige & Skoog	25
Tabla 12. Componentes del Medio de cultivo (MS1)	26
Tabla 13. Materiales de medio de cultivo Murashige & Skoog con hormona (MS2).....	28
Tabla 14. Porcentaje de germinación de cada material genético <i>S. lycopersicum</i> durante 4 días en oscuridad.	30
Tabla 15. ANDEVA ($p < 0.05$) realizada a la variable de longitud de brotes (mm) de <i>S. lycopersicum</i> los 6, 13, 19 y 26 días de estudio.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Del explante (a) se obtiene yemas (b) que se desarrollan formando tallo adventicios d, e). Estos tallos se pueden aislarse para alcanzar su diferenciación y luego trasplantarse a recipientes con suelo (f-j).	11
Figura 2. Hay varias técnicas de injerto que permiten la unión de segmentos de dos individuos diferentes: a) injerto de una rama sobre una incisión lateral de un tallo, b) inserción de un brote en la corteza de un tallo, c) injerto de un vástago sobre otro.....	13
Figura 3. Tipos de propagación por cultivo de tejidos: A) activación de la ramificación axilar, B) segmentos de nodos, C) tallos adventicios y D) embriogénesis somática	17
Figura 4. Vista Aérea del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB).....	19
Figura 5. Vista frontal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas.	19
Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas <i>S. lycopersicum</i> en caja Petri con 10 mL de agua destilada evaluado a los 4 días.	31
Figura 7. Número de brotes en cultivo in vitro de <i>S. lycopersicum</i> en medio de cultivo MS2 con diferentes concentraciones de citocinina evaluados a los 26 días.....	31
Figura 8. Resultados del Factor A, promedio de explantes (mm) de los materiales genéticos de <i>S. lycopersicum</i> , Micaela, UPSE 78 y UPSE 19 durante el periodo del ensayo.	33
Figura 9. Resultados de la adaptación de los brotes (mm) <i>S. lycopersicum</i> en presencia de dosis de citocininas durante los periodos de evaluaciones (Factor B).	34
Figura 10. Longitud de brotes de <i>S. lycopersicum</i> en medio de cultivo con diferentes concentraciones de citocininas evaluados a los 26 días.	35
Figura 11. Número de hojas de los explantes desarrollados en cultivo in vitro de <i>S. lycopersicum</i> en diferentes dosis de citocininas evaluados a los 26 días.....	37
Figura 12. Porcentaje de oxidación en cultivo in vitro de <i>S. lycopersicum</i> en medio con diferentes concentraciones de citocinina evaluados a los 26 días.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 1 A. Porcentaje de germinación de semillas de los Materiales genéticos *S. lycopersicum* de los 4 días.

Tabla 2 A. Números de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum* en estudio a los 26 días de evaluación.

Tabla 3 A. Promedios de números de brotes de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación.

Tabla 4 A. Longitud de brotes de los materiales genéticos UPSE 78, UPSE 19 Y MICAELA de los días de evaluación 6, 13, 19, y 26 en milímetro (datos transformados a $\text{Log}(x+1)$).

Tabla 5 A. Promedios de longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum* en estudio a los 26 días de evaluación (datos transformados a $\text{Log}(x+1)$).

Tabla 6 A. Medias de Factor A. Primera Evaluación a los 6 días, Variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 7 A. Medias de Factor B. Primera evaluación a los 6 días. Variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 8 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera evaluación a los 6 días, variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 9 A. Análisis de la Varianza de la Primera Evaluación a los 6 días de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos en estudio.

Tabla 10 A. Medias de Factor A. Segunda Evaluación a los 13 días, variable longitud de brotes de los materiales vegetales *S. lycopersicum*.

Tabla 11 A. Medias de Factor B. Segunda Evaluación, variable longitud de brotes de los materiales vegetales *S. lycopersicum*.

Tabla 12 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda evaluación a los 13 días, variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 13 A. Análisis de la Varianza de la Segunda Evaluación a los 13 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 14 A. Medias de Factor A. Tercera Evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de *S. lycopersicum*.

Tabla 15 A. Medias de Factor B. Tercera evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 16 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera evaluación, de la variable longitud de brotes de *S. lycopersicum*.

Tabla 17 A. Análisis de la Varianza de la Tercera Evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos de *S. lycopersicum*.

Tabla 18 A. Medias de Factor A. Cuarta Evaluación, variable longitud de brotes

Tabla 19 A. Medias de Factor B. Cuarta Evaluación, variable longitud de brotes

Tabla 20 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta evaluación, variable longitud de brotes.

Tabla 21 A. Análisis de la Varianza de la Cuarta Evaluación a los 26 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

Tabla 22 A. Promedio de numero de hojas de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación (datos transformados a Raíz $(x+0.5)$).

Tabla 23 A. Promedio de porcentaje de oxidación de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación “Datos transformados a Raíz $(\frac{N. \text{ de explante}}{\text{Total de explantes}} * 100) + 0.5$ ”.

Figura 1 A. Selección de Materiales genéticos *S. lycopersicum* UPSE 78 y UPSE 19.

Figura 2 A. Materiales para la preparación de medios de cultivo Murashige y Skoog.

Figura 3 A. Cámara de flujo laminar estéril, con los equipos de trabajo se utilizaron.

Figura 4 A. Pre germinación de semillas en cajas Petri.

Figura 5 A. Desinfección y siembra en medio de cultivo MS1 de plántulas de *S. lycopersicum* germinadas en caja Petri.

Figura 6 A. Plántulas sembradas en medios MS1 sin dosis de BAP después de la pre germinación.

Figura 7 A. Selección de brotes de *S. lycopersicum* posteriormente al corte meristemático.

Figura 8 A. Corte de explantes de 1 cm y siembra en los medios de cultivo MS2 bajo las diferentes concentraciones de BAP.

Figura 9 A. Establecimiento de explantes en medio de cultivo MS2 con dosis de hormona BAP.

Figura 10 A. Presencia de coloración café en explante (oxidación) del material genético *S. lycopersicum*.

Figura 11 A. Muerte celular en los laterales del explante del material genético en estudio.

Figura 12 A. Producción de brotes meristemáticos de explantes del material genético UPSE 78.

Figura 13 A. Explantes oxidados vivos con brotes meristemáticos de *S. lycopersicum*.

INTRODUCCIÓN

El tomate *Solanum lycopersicum* es una hortaliza de gran importancia económica a nivel mundial debido al consumo diario ya que está presente en la mayoría de las actividades culinarias, tanto así que al pasar los años ha tenido un aumento en las áreas cultivadas; y en las zonas de producción ha incrementado a alrededor de 5 millones de hectáreas, para el 2017 ocupó una extensión alrededor de 5 030 471 hectáreas de tomate en el mundo, con un rendimiento promedio de 59.4 toneladas por hectáreas, siendo el año con mayor producción superando los 180 765 931 millones de toneladas de tomate a nivel mundial según los resultados obtenidos por Axayácatl en 2017, datos publicado en FOASTAT organismo estadístico de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). El continente asiático está ubicado en el primer lugar de área cultivada de tomate, para el 2016 China dedicó una extensión 999 212 hectáreas obteniendo una producción de 56 308 914 millones de toneladas (Hortoinfo, 2017). En función al número de hectáreas cultivadas, está la India con un total de 870 000 hectáreas y una producción de 17.5 millones de toneladas. En el tercer lugar por su alta dedicación a cultivar tomate está Turquía con 300000 hectáreas y 11.35 millones de toneladas de producción (Agriculturers, 2014).

De acuerdo a Jaramillo (2015), el Ecuador tiene una producción de tomate de mesa que suma en los productores de la canasta familiar por su mayor demanda del consumidor, teniendo una producción de 63 955 toneladas. Sin embargo, Varela (2018) menciona en su trabajo, que en el Ecuador existe alrededor de 3 000 hectáreas cultivadas de tomate teniendo 2 000 hectáreas bajo invernadero colocándose en el cuarto lugar de hortalizas con un promedio de 18.4 ton/ha según el INEC en el 2012. Comúnmente las zonas donde se realiza la práctica de este cultivo son en el Valle del Chota en la provincia de Carchi y los cantones de Imbabura, Antonio Ante, Ibarra y Pimampiro como menciona Vinuesa (2007). En el Ecuador se obtiene un promedio de 20 ton/ha el cual se encuentra por debajo del promedio de rendimiento de los países vecinos (Yunda, 2020).

En el 2013 el INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos) mostró la producción de la región costa con un valor de 2 749 toneladas, presentando a la provincia de Santa Elena con la mayor producción, liderando con 1 399 toneladas con una participación de 51%,

seguido de Guayas con una producción de 1 280 toneladas de tomate con una participación del 47%, valores decrecientes a los años anteriores (Barreiro, 2015).

Para incrementar la producción de acuerdo a la demanda del consumo de tomate, es necesario multiplicar el material vegetal de buenas características agronómicas y sobre todo de las plantas que estén adaptadas a las condiciones climáticas específicamente de la zona de Santa Elena, en función de aquello se debe de aplicar métodos para la clonación o propagación *in vitro* para tener las mismas características, principalmente de los meristemas apical para la regeneración y desarrollo de una planta completa, este fenómeno tiene el nombre de totipotencia por la capacidad que tiene cualquier célula vegetal en dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo vegetal (Mendoza, 2016), en donde la planta llega a madurar si es ubicada en condiciones adecuada para su regeneración y multiplicación celular (Santos y Rodriguez, 2014).

Según Castillo (2010), indica que al referirse cultivo *in vitro* de material vegetal, consiste en cultivar plántulas dentro de un frasco de vidrio en ambiente artificial, esta forma de cultivar las plantas tiene dos propiedades fundamentales: asepsia y control de los factores que pueden afectar el crecimiento. Amaro (2018), señala que Harberlandt en 1902 fue uno de los primeros en la práctica de cultivo *in vitro*, técnica que surge como alternativa al cultivo convencional donde tuvo la posibilidad de desarrollar y mantener células vegetales, órganos en medio artificial de composición química líquido o sólido en condiciones controladas cuya finalidad es obtener un material vegetal resistente y libre de enfermedades, virus o plagas.

En todos los procesos de micropropagación, la aclimatación es la etapa final necesaria cuando las plantas son propagadas para ser transferidas en contenedores con sustrato y en un lugar específico como es en un invernadero donde le permitan adaptarse y desarrollar en sus nuevas condiciones ambientales con la finalidad de obtener una nueva variedad sometida a estrés hídrico, luz, temperatura, patógenos, etc., (Valle et al., 2013).

Problema Científico:

¿Cuál será la respuesta morfológica de los materiales vegetales *Solanum lycopersicum* sometidos a bajas concentraciones de citocininas en cultivo *in vitro*?

Objetivos***Objetivo General***

Evaluar la producción de brotes a partir de explantes meristemáticos en bajas concentraciones de citocininas (fitohormonas), obtenidas en micropropagación *in vitro*.

Objetivos Específicos

Analizar las respuestas morfogénicas que generan las bajas concentraciones de citocininas en la producción de brotes meristemáticos de *S. lycopersicum* mediante el proceso de cultivo aséptico.

Determinar la adaptación de tres diferentes genotipos de tomate *S. lycopersicum* en las diferentes concentraciones de citocininas, extraídos a partir de explantes meristemáticos.

Evaluar la eficiencia de los materiales vegetales de tomate *S. lycopersicum* sometida a las diferentes concentraciones de citocininas.

Hipótesis:

En concentraciones bajas de citocininas en cultivo *in vitro* de tomate genera menor respuesta morfológica.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades del tomate

Según Picargon (2012), menciona que los tomates son una especie de familia solanácea, en el que hay dos tipos de clasificación de taxonomía según la aportación de los autores; en el año 1753 introdujo Linneo que se denomina (*Solanum lycopersicum* L.) y por otro lado en el año 1754 Philip Miller da el nombre de (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Sin importar de que autor venga la denominación, en la actualidad ambas se utilizan Lopez (2017). Así mismo argumenta que la especie *Solanum lycopersicum* es originaria de la región Andina, desde la parte sur de Colombia pasando por Ecuador hasta el norte de Chile. Posiblemente desde allí se transfirió a Centro América y México, donde se domesticó.

1.1.1 Taxonomía

En la tabla 1 se muestra la taxonomía del tomate en consecuencia al nuevo orden.

Tabla 1. Taxonomía del cultivo de tomate

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Sonales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Lycopersicum</i>

Fuentes: (Silvestre, 2019), (Molina *et. al.* 2010).

1.1.2 Características botánicas

El cultivo de tomate es una planta que normalmente se lo siembra cada año, en función a su economía y clima favorable, su viabilidad se extenderá durante varios años. Sin embargo, esto dependerá del área donde se cultive, es de ciclo corto y su cosecha se realiza al terminar el ciclo, demostrando una rentabilidad muy buena. No resiste a la escarcha o heladas, es decir, no es un cultivo que sobrevive al frío como manifiesta Gorini (2018). A menudo, el marco de plantación más utilizado en esta variedad es de 1.5 metros entre líneas y de 0.5 metros entre plantas de acuerdo.

Gorini (2018) manifiesta que es importante y recomienda conocer el área radical que es la parte no visible de la planta. En el momento que la semilla germina, va a salir una raíz que

se desarrolla de forma vertical hasta alcanzar una profundidad de 60 cm en el suelo. En el momento de realizar el trasplante, las roturas de la raíz se reemplazan por varias raíces ramificadas y adventicias que se extiende a una profundidad moderada en el suelo. Sin embargo, Marin (2017) plantea que las raíces adventicias no exceden los 30 cm de profundidad.

Tallo. Eje grueso de la planta, mide entre 2 a 4 centímetro de ancho y en la parte superior es delgado, pubescente, anguloso y de color verde. Se forman tallos secundarios del tallo principal con nuevas hojas y se exhiben grupos florales. Los meristemos apicales se encuentran en la parte distal, área de inicio de nuevos primordios foliares, así como también florares (Martin, 2019).

Hojas. La hoja de esta variedad es pinnada y compuesta, con 7 a 9 foliolos peciolados que miden de 4 a 60 mm x 3 a 40 mm, bordes serrados y lobulados, alternos, opuestos y de color verde. Está cubierta de bellos glandulares y dispuestos en posición alterna en el tallo (Monardes, 2009).

Flor. La flor de tomate suele ser perfecta y regular, consta de los sépalos (5 o más), pétalos (5 o más) de color amarillo dispuestos de forma helicoidal. Poseen seis estambres que se alternan con los pétalos que conforman los órganos reproductivos, el ovario tienen dos o más segmentos, se agrupan tipo racimos cimoso entre 4 a 12 flores (Larín et al., 2018).

Fruto. Es una baya bilocular o plurilocular carnosas, subsférica que pueden lograr a pesar 600 g dependiendo la variedad. Está constituido por el pericarpio, tejido placentario y las semillas, cuando está de color verde es porque están inmaduras, y cuando está el fruto maduro son rojos, pero depende de los cultivares, existe una variación de coloración en tomates, pero siempre predominará el rojo por el pigmento carotenoide licopeno (Fornaris, 2007).

1.2 Condiciones edafoclimáticas

Marín (2017), plantea que la temperatura es muy importante para los cultivos, por eso debemos considerar las condiciones del suelo y el clima, ya que la temperatura óptima del cultivar oscila entre 20 y 30 °C durante el día, y por la noche está entre 10 y 17°C.

La temperatura superior a 30 °C reduce la fructificación y la fertilización de los óvulos, afectan el desarrollo de los frutos, disminuyendo el crecimiento y la biomasa de la planta. Las plantas de tomate tienen un mejor desarrollo a temperaturas de 18 °C a 24 °C. Temperaturas diurnas inferiores entre 12 a 15 °C pueden causar problemas en el desarrollo de la planta. Mientras que en la etapa de ovulación temperaturas diurnas superior a 30 °C e inferiores a 12 °C afectan la fecundación (Díaz, 2007).

Humedad Relativa (HR). En el cultivo de tomate la humedad óptima es del 60 al 80%, favoreciendo un normal desarrollo de la polinización y garantiza una buena producción. El exceso o déficit conduce a trastornos fisiológicos y la aparición de enfermedades. Una HR superior a 80 % favorece la presencia de enfermedades aéreas, agrietamiento de la fruta y dificulta la fecundación, debido a que el polen se moja y se produce abortos florales, y una HR menor al 60% dificulta la polinización (Monardes, 2009).

Luminosidad. Si hay una pequeña luminosidad, hace efecto en los procesos de floración, fecundación y desarrollo vegetativo, la interrelación de la temperatura diurna, nocturna y luminosidad es esencial en tiempo críticos del desarrollo vegetativo (Larín et al., 2018).

Altitud. A nivel mundial las áreas donde se adapta esta especie son en clima templado, ubicado entre 1 000 y 2 000 m.s.n.m. Actualmente hay variedades que están adaptados a altitudes más amplias. Para ser comercializados en mercados, su altura está entre 700 y los 2 000 metros sobre el nivel del mar (Lopez, 2017).

1.3 Plagas y enfermedades del tomate

1.3.1 Plagas

Según Martínez (2016), las plagas que influyen en el cultivo de tomate se presentan a temperaturas superiores a 25° C, por presencia de malezas, o en cultivos estrechos y/o cultivos de tomate cercanos de otras especies, además las corrientes de aire pueden atraer plagas voladoras. Las plagas más comunes en el cultivo de tomate en el Ecuador son:

Ácaros (*Tetranychus urticae*): Daño que se manifiesta por un punteado en los bordes de la hoja y se torna de color marrón hasta secarse.

Barrenador (*Agrotis ipsilon*): Las inserciones de larva en el tejido interior de la planta, lo debilitan y se convierten de color amarillo. En la última etapa, el eje se divide por el efecto del peso de los frutos.

Áfidos (*Aphididae*): La planta se cubre con una sustancia de tinte oscuro que produce un hongo.

Minador de la hoja (*Tuta absoluta*): Ataca en la planta por la noche, penetrando en la hoja y alimentándose del parénquima causando cavidades.

Cogollero del tabaco (*Heliothis zea*): Son mariposas que atacan a las flores y al cogollo.

Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*): La edad adulta del insecto la desarrolla en la parte posterior de la hoja, causando un debilitamiento de la planta.

Gusano del fruto (*Spodoptera frugiperda*): En el estado de larvas se alimenta de las hojas, luego pasan por el pedúnculo hacia el fruto y los penetra para destruir su interior.

Trips (*Frankliniella occidentalis*): Son responsables de transferir virus como es, el virus del bronceado (TSWV), y el virus del mosaico del tomate (ToMV).

Ácaro del bronceado del tomate (*Acaloups lycopersici*): Se desarrollan en climas cálidos y baja humedad relativa, inician el daño en la parte de abajo de la planta; las hojas pueden llegar a tener un aspecto bronceado y secarse.

1.3.2 Enfermedades

Las enfermedades que atacan al cultivo del tomate pueden ser causados por hongos, bacterias y virus. Usualmente se deben a altas temperaturas (mayor a 25 °C), y a humedad relativa superior de 80%, la alta densidad de plantas (mayor a 3.7 plantas por metro cuadrado), persistencia de agua libre en tejidos, uso de materiales o equipo contaminado, entre otra. Las enfermedades más importantes causadas por hongos se mencionan a continuación (Jaramillo, 2015).

Tizón tardío (*Phytophthora infestans*): Es la enfermedad más peligrosa de este cultivo, ocurre en climas fríos y húmedos. Puede causar la pérdida total de la cosecha, creando lesiones irregulares, hundidas y de color verdoso, pudiendo atacar a todas las partes de la planta.

Tizón temprano (*Alternaria solani*): Esta enfermedad se desarrolla cuando se tienen períodos de humedad relativa superiores al 70% durante la noche, seguidos de períodos secos durante el día. Se presenta con manchas circulares de color negro y café en las hojas, causan lesiones hundidas y oscuras en la fruta y en el tallo viene a romperse.

Moho gris (*Botrytis cinerea*): Se presenta en humedades relativas superiores al 90%, en cultivos avanzados de desarrollo, que reciben poca radiación solar. Principalmente atacan a las flores, que se secan y se extienden a través de los frutos y el tallo, donde causan manchas grises de consistencia aterciopelada.

Fulvia (*Cladosporium fulvum*): Afecta a las hojas en zonas con humedades superiores al 70%. Causa manchas de color verde en el haz de las hojas, y grises claro en el envés.

Damping off o ahogamiento del tallo (*Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* spp.): Ataca a las semillas, a plántulas emergentes, se presenta por alta humedad y drenaje deficiente del sustrato, por temperaturas del sustrato de 12 a 17 °C, sustratos pesados, baja ventilación, pH mayor a 7, sustancia orgánica en exceso y alta densidad de plantas. Causa problemas de germinación y mortalidad de las plántulas en el semillero.

A este cultivo también atacan enfermedades causadas por bacterias difíciles de controlar lo que se recomienda eliminar las plantas con síntomas de infección bacteriana. Algunas de estas enfermedades son:

Necrosis de la médula (*Pseudomonas corrugata*): Se desarrolla con una humedad relativa de más del 80% y condensación en la superficie de la hoja de 18 a 24 °C. Causa clorosis en hojas jóvenes, al aumentar los daños afecta a toda la mitad superior de la planta que llega a marchitarse.

Mancha bacteriana: (*Xanthomonas campestris*): Se desarrolla a temperaturas de 25 °C a una humedad relativa superior al 80%. Presenta síntomas como puntos oscuros con bordes bien definidos en las hojas.

Según Urbina (2009), en este cultivo las enfermedades causadas por los virus también tienen mucha importancia, ya que causan daños considerables, su control es difícil y en poco tiempo puede llegar a perderse toda la plantación. Estas enfermedades están en presencia de vectores (insectos) como mosca blanca, trips y pulgones, cultivos cercanos de alfalfa, pimiento, pepinos y papas, presencia de malezas y condiciones en general favorecen la proliferación de vectores. Los principales virus que se pueden presentar en cultivos de tomate son, Virus del mosaico del pepino (CMV), Virus de bronceado del tomate (TSWV), Virus del mosaico del tabaco (TMV), y Virus de las hojas amarillas de cuchara del tomate (TYLCV).

Según Velasco *et. al.* (2012), el control de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus se lo hace generalmente con compuestos químicos del tipo preventivo, curativo y/o sistémico. Para las enfermedades causadas por bacterias y virus, es difícil controlarlos y es más común utilizar métodos preventivos, o eliminar plantas contagiadas.

1.4 Reproducción de plantas en general

La reproducción de las plantas, así como cualquier ser vivo tiene eventos reproductivos necesarios para su difusión y evolución que depende de las características de cualquier especie, y está directamente influenciado por el comportamiento de ellos, y las características ambientales; en su reproducción existen dos tipos que son, sexual y asexual.

La reproducción sexual en general es principalmente la unión de dos gametos (femenino y masculino) con diferentes características genéticas, o puede ocurrir desde dos gametos del mismo individuo, ya sea en plantas dioica o monoica, esta categoría tiene dos tipos de fecundación, autógena y alógama. Una reproducción asexual es un mecanismo que se propaga de materiales vegetativos que no es de la unión de dos gametos (Grisales, 2014).

1.4.1 Propagación vegetativa

Es la producción de plantas, que comprende procedimientos simples (estacas), es conocido desde hace mucho tiempo por los campesinos del mundo, hasta en procedimientos tecnológicamente muy avanzados como los cultivo *in vitro*, así como, métodos de multiplicación no precisa de semillas para obtener una nueva planta (AgroSíntesis, 2019).

Los métodos modernos permiten la adquisición de variedades completamente libres de agentes patógenos, incluidos los virus, e incluso la producción de semillas artificiales mediante la tecnología de embriogénesis somática y encapsulación de semillas. Además de la multiplicación o propagación, las técnicas y prácticas de multiplicación de tejidos en cultivo *in vitro*, habilitan los procesos modernos de la conservación de germoplasma, gracias al mantenimiento de los cultivos de desarrollo lento y la crioconservación de tejidos (Yanes et al., 1997).

1.4.2 Tipos de propagación vegetativa

Los métodos de multiplicación se clasifican como naturales, producidas asexual (bulbos, rizomas, tubérculos, estolones, etc.) o artificiales si interviene el hombre (estaca, injerto, acodo, esqueje y cultivo *in vitro*) (AgroSíntesis, 2019; Gonzalez y Arbo, 2016).

Para la propagación clonal se utilizan tejidos vegetales que conservan el potencial de la multiplicación y diferenciación celular para producir nuevos tallos y raíces a partir de cúmulos celulares en diferentes órganos. Este tipo de proliferación tiene esencialmente tres tipos, que son: 1) Micropropagación de tejidos vegetales en cultivo *in vitro*; 2) Propagación a partir de bulbos, rizomas, estolones, tubérculos o segmentos (esquejes) de las plantas que conserven el potencial de enraizar, y 3) Propagación por injertos de segmentos de plantas sobre vástagos receptivas más resistentes (Yanes et al., 1997).

1.4.3 Micropropagación de tejidos vegetales en cultivo in vitro

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, junto con el descubrimiento de las hormonas de crecimiento y la diferenciación de las plantas, citoquininas y auxinas, permitieron el desarrollo de diversas técnicas de cultivo, que están orientadas a la propagación de las plantas, que ahora están usando actualmente en muchos laboratorios de investigación del mundo y también en empresas comerciales de propagación.

Estas técnicas se basan en el hecho de que el tejido vivo de las plantas mantiene el potencial de formar un organismo completo. Las células que mejor conservan este potencial son aquellas que diferencian hacia una función particular, como las que están presentes en las yemas y en otros tejidos primarios de las plantas, por ejemplo; los segmentos de nodos, los extremos de las raíces, el parénquima del tejido de la hoja, las semillas, el cambium y algunas partes florales.

La técnica de cultivo de tejidos comienza con la obtención de segmentos de plantas en crecimiento que se esterilizan y se cultivan en soluciones nutricionales especiales, a menudo gelificadas. Cualquier combinación de hormonas de crecimiento se integra en estos medios para obtener la proliferación celular en el segmento, de esta proliferación puede causar raíces directa y tallos que provienen de uno o más plantas nuevas completas. También es posible aumentar la propagación de células germinales del explante para formar un conjunto de tejido poco diferenciado (callo) o una estructura peculiar sin las paredes celulares (protoplasto), se emplean en diferentes métodos de propagación (Yanes et al., 1997).

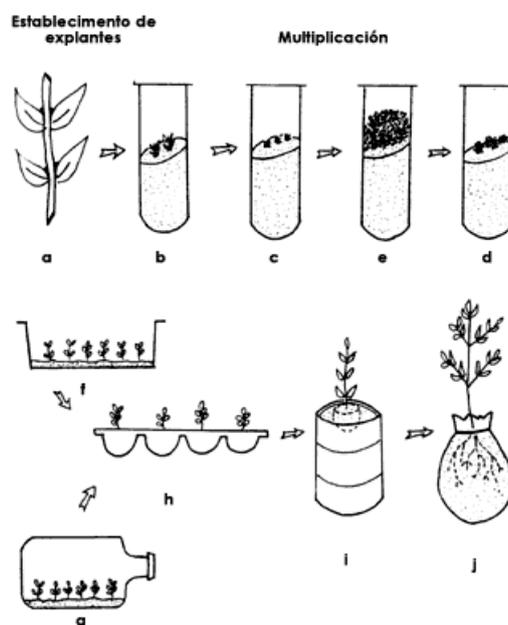


Figura 1. Del explante (a) se obtiene yemas (b) que se desarrollan formando tallo adventicios d, e). Estos tallos se pueden aislar para alcanzar su diferenciación y luego trasplantarse a recipientes con suelo (f-j).

1.4.4 Propagación a partir de estolones, rizomas, bulbos, tubérculos o segmentos (esquejes) de la especie que conserven el potencial de enraizar

Varios tipos de plantas vasculares, en su mayoría especies cultivadas, no producen semillas, incluso si tienen flores, su multiplicación o propagación vegetativa no incluye la fusión de las células germinativas. Esta forma de propagación también se presenta en plantas que normalmente generan semillas, y se considera solo como una reproducción asexual cuando reemplazan en gran parte a la reproducción sexual.

Es un proceso que incluye el enraizamiento y la separación de una parte del lado original de la planta cuando mueren los tejidos vegetales. De esta manera, las células, tejidos u órganos que se separan, se desarrollan directamente en nuevos individuos. Las zonas de abscisión pueden ser exactamente como sucede en la separación de los bulbillos, o la fragmentación de una planta debido al deterioro y la muerte del individuo parental o bien de los tejidos de vinculación, al igual que con los brotes de las raíces. Las estructuras de propagación vegetativa funcionan también como órganos de resistencia y de almacenamiento en temporadas adversas, a veces almacenadas por mucho tiempo (Yanes et al., 1997).

1.4.5 Propagación por injertos de segmentos de plantas sobre vástagos receptivas más resistentes

La técnica de injerto es tomar una pieza de una planta, generalmente leñosa, e introduce al vástago o la rama de otra planta del mismo tipo o especie muy cercana, de modo que la continuidad establezca en las cadenas estructurales de savia bruta y savia elaborada, está entre el tallo receptor y el tronco injertado (Figura 2). De esta manera, el tronco injertado junto con la cepa del receptor forma un tejido curativo y está perfectamente integrado en el crecimiento para reiniciar la producción de ramas, hojas y hasta órganos reproductivos. Esta técnica es muy antigua y es practicado por los s chinos desde tiempos remotos. Tiene grandes ventajas, especialmente para el cultivo de árboles frutales y ornamentales, ya que permite utilizar como base de injerto de plantas establecidas, que son resistentes a las condiciones adversos y enfermedades, que utiliza como destinatarios de injertos de plantas productivas y con frutos de calidad y más producción (Yanes et al., 1997).

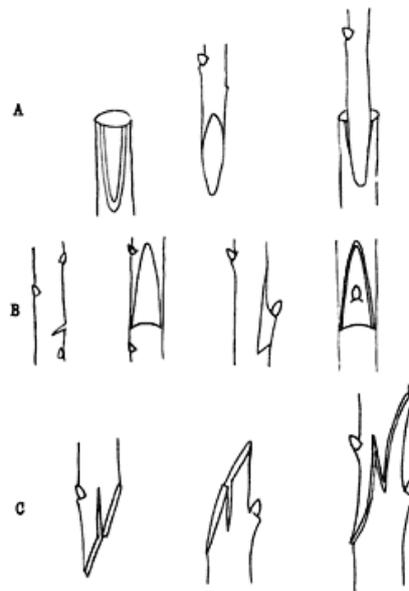


Figura 2. Hay varias técnicas de injerto que permiten la unión de segmentos de dos individuos diferentes: a) injerto de una rama sobre una incisión lateral de un tallo, b) inserción de un brote en la corteza de un tallo, c) injerto de un vástago sobre otro.

1.4.6 Micropropagación de plantas in vitro

Castillo (2004), plantea que la reproducción de la propagación de especies obtenidas *in vitro* son las partes vegetativas de plantas dentro de un recipiente de vidrio en ambiente artificial. Este tipo de crecimiento de plantas tiene dos características básicas: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento. En los últimos años, el estudio detallado de las plantas puede ser posible tanto en nivel celular como molecular, así como en las condiciones de laboratorio para reproducir todos los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de la especie vegetal.

Gonzalez y Arbo (2016), plantean que la micropropagación es una de las aplicaciones más comunes del cultivo *in vitro*, se usan células o pieza de tejidos (explante) de una planta madre, gracias a su totipotencialidad de la célula se obtendrán plantas genéticamente idénticas llamadas clones.

El explante que más se usa para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas de las plantas. Los recipientes de vidrio que contienen las plantas son ubicados en repisas con luz artificial en la cámara de crecimiento, donde la temperatura se regula entre los valores de 21 a 23 °C, además de tener el control de la cantidad de horas de luz. Por otro lado, el

medio de cultivo consiste en una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar. Cada composición del medio de cultivo dependerá de las especies vegetales y de la etapa del proceso de propagación (Castillo, 2004).

Como parte de la propagación o reproducción de plantas obtenidas *in vitro* existen varios factores que afectan al desarrollo, dentro de los factores no biológicos que influyen en el ambiente químico está, el pH y la composición del medio de cultivo, y como parte del ambiente físico esta, la luz, fotoperiodo, temperatura y humedad. Las fases de método de la propagación son, Fase 0: Seleccionar la planta madre y prepararla, Fase 1: Desinfección de las yemas vegetativa y/o desinfección del material genético, Fase 2: Inserción del material vegetal seleccionado *in vitro*, Fase 3: Multiplicación de brotes, Fase 4: Enraizamiento, y Fase 5: Aclimatación.

1.4.7 Protocolos de propagación de tomate *in vitro*

En la tabla 2 tenemos los medios de cultivos que podemos utilizar para la propagación de plantas obtenida *in vitro* con sus diferentes concentraciones (Ramirez et al., 2009).

Tabla 2. Composición de los medios de cultivos utilizados en las diferentes etapas de la regeneración de tomate

M1 (Narváez-Vázquez, 1991)	M2 (Fillati, <i>et al.</i> , 1987)	M3 (Ultzen, <i>et al.</i> , 1995)
	Germinación de semillas	
La mitad de las sales MS ¹ Vit. B5 de Gamborg ² Sacarosa (30 g/l)	La mitad de las sales MS Vit. B5 de Gamborg Sacarosa (30 g/l)	La mitad de las sales MS Vit. B5 de Gamborg Sacarosa (30 g/l)
	Inducción / Regeneración	
Sales MS Vit. B5 de Gamborg Sacarosa (30 g/l) BAP (2.5 mg/l) AIA (1 mg/l)	Sales MS Vit. de Nitsch ³ Sacarosa (30 g/l) Kinetina (4 mg/l)	Sales MS Vit. de Nitsch Sacarosa (10 g/l) Glucosa (10 g/l) Kinetina (4 mg/l) AIA (0.02 mg/l)
	Enraizamiento	
Mitad de las sales MS Vit. B5 de Gamborg Sacarosa (20 g/l) Sin hormonas	Mitad de las sales MS Vit. de Nitsch Sacarosa (20 g/l) Sin hormonas	Mitad de las sales MS Vit. de Nitsch Sacarosa (10 g/l) Glucosa (10 g/l) Sin hormonas

1/ Murashige y Skoog, 1962

2/ Gamborg *et al.*, 1968

3/ Nitsch, 1951

1.4.8 Técnicas para la propagación de tejidos en laboratorios

La bibliografía científica moderna cuenta con un sin número trabajos que detallan las técnicas de cultivo de tejidos y órganos vegetales en medios complejos y bien formulados, colocados en condiciones ambientales altamente controladas. Esto no sucede con las técnicas simples de micropropagación que rara vez se describen en los libros disponibles. Tan pronto como se ha demostrado que una especie de plantas puede ser micropropagado con éxito, los métodos de micropropagación se simplifican y son accesibles para las instalaciones sencillas responsable de la propagación de plantas.

Son cuatro métodos diferentes para la multiplicación de plantas *in vitro*, procesos más utilizados en los laboratorios de micropropagación: 1) Activación de la ramificación axilar, 2) Segmentos de nodos, 3) Tallos adventicios 4) Embriogénesis somáticas. Las técnicas que tienen mejores resultados varían dependiendo del propósito por el cual se propagan y de las especies vegetales (Yanes et al., 1997).

1) Activación de la ramificación axilar: Tal vez sea el procedimiento más utilizado, se emplean meristemos terminales como axilares del vástago para establecer los cultivos (Figura 3A), incluyendo la manipulación del cultivo por cambios en su entorno químico (hormonas) y en el fragmento que se cultiva, el dominio apical se suprime y es inducida la rama axilar. Los subsecuentes cultivos generados a partir de los fragmentos permiten a los explantes de multiplicación alcanzar el número deseado de tallos. Sin embargo, aunque la multiplicación inicial es lenta, varios subcultivos se incrementan rápidamente. Los vástagos de corte seleccionados del cultivo pueden enraizar *in vitro* o directamente en el suelo.

2) Segmentos de nodos: La técnica de los segmentos del nodo tiene como ventaja de que produce una baja variación genética en las muestras, debido que en ningún momento se forma tejido calloso (Figura 3B). Empieza mediante segmentos de vástago con su correspondiente yema axilar. En el cultivo las yemas crecen donde se extienden produciendo nuevos segmentos nodales. En un determinado punto en el tiempo, los segmentos generados de nodos pueden ser llevado a la vitro o en el suelo para dar origen raíces y tallos, cambiando la composición hormonal del medio. Muchas plantas no se pueden practicar con éxito.

3) Tallos adventicios: Pueden ser inducidos a partir de callos creados por explantes de ramas u hojas y continuar cultivando hasta tener un gran número de callos (Figura 3C), con tan solo cambiar el entorno hormonal en el que se desarrolla el callo original o los fragmentos posteriores. Los vástagos extraídos pueden enraizar en el suelo o *in vitro*. De todos los métodos de micropropagación éste es el que produce más variabilidad genética, ya que se usa un estadio calloso intermediario, el cual no se recomienda para la propagación de plantas donde la integridad genética es de mucha importancia. Al formarse el callo, se produce una desdiferenciación completa del tejido vegetal, que a menudo conduce cambios genéticos, lo que induce la variabilidad de la información genética entre las células del callo.

4) Embriogénesis somática: Los embriones somáticos o asexuales pueden originarse desde un proceso de diferenciación indirecta o directa a partir de células, órganos o estados de callos intermedios de una planta (Figura 3D). Muchos embriones somáticos proliferan y producen embriones secundarios desde meristemos somáticos, como yemas axilares, partes de las flores o las semillas. Los embriones adquieren un comportamiento y morfología que se asemejan a los embriones naturales de origen sexual (plantas), que pueden germinar en el suelo. Esta técnica puede convertirse en la forma de proliferación más eficiente porque, teóricamente, se obtendrían millones de plantas a partir desde una pequeña cantidad de material (tejido) en cultivo (Yanes et al., 1997).

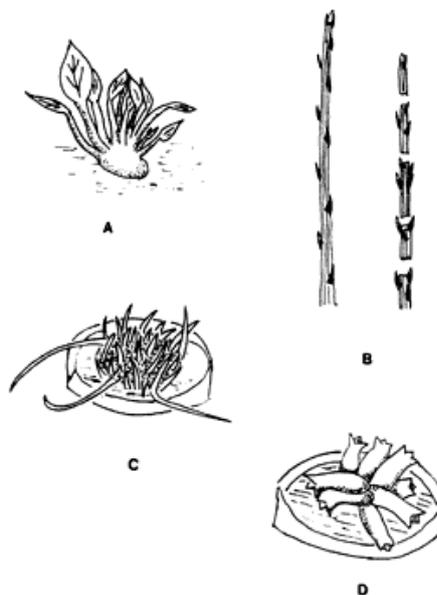


Figura 3. Tipos de propagación por cultivo de tejidos: A) activación de la ramificación axilar, B) segmentos de nodos, C) tallos adventicios y D) embriogénesis somática

1.5 Biotecnología Vegetal

La biotecnología vegetal como tal es un conjunto de técnicas que permite la transferencia selectiva de un gen o también de unos pocos genes deseables de un patrón a otro con una mayor precisión en un ambiente controlado y aséptico, permitiendo que los mejoradores desarrollen con variedades de carácter específico deseables y sin incluir aquellos que la perjudican.

La biotecnología vegetal consiste en la modificación de diversas características genéticas de algunas plantas con la finalidad de incrementar su población, mejorado ciertas características que poseen como defensa propia de la planta de enfermedades, insectos e incluso de malas hierbas, de tal manera estas mejoras en la planta contribuyen para una abundante producción y saludables alimentos, pensando en las futuras generaciones de una población en crecimiento (Cubero, 2000).

1.6 Fitohormona u hormona de crecimiento

Las fitohormonas son compuestos que se producen internamente en la planta, que ejerce su función en muy bajas concentraciones y cuyo efecto principal se produce a nivel celular, que cambia los patrones de los crecimientos vegetativos que permiten su control. Los reguladores vegetales son compuestos sintetizados químicamente u obtenidos de otros organismos y son mucho más potentes que los análogos naturales. Es necesario tener en cuenta aspectos críticos como en el momento de aplicación, dosis, sensibilidad de la variedad, condiciones de la planta, etc., ya que cada planta requiere condiciones específicas de crecimiento que pueden verse influenciadas por la concentración de hormonas en el medio (Alcantara et al., 2019).

Las hormonas vegetales son un grupo de compuestos orgánicos naturales que desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento de las plantas en una amplia gama de procesos de desarrollo, se reconocen 5 grupos de hormonas principales o clásicas, y se dividen en estimuladoras e inhibidoras de crecimiento, entre ellas están; auxinas, giberelinas y citocininas, etileno y ácido abscísico entre los estudios revisados por (Alcantara et al., 2019; Redagrícola, 2017).

Las hormonas vegetales no tienen efectos específicos, de modo que una misma fitohormona actúa sobre muchos procesos, de la misma forma que sobre un proceso específicos pueden actuar varias fitohormonas. Es decir, una misma hormona tiene diferentes efectos según el momento y el órgano en el cual actúa como los efectos de las distintas fitohormonas se sobreponen (Redagráfica, 2017).

1.6.1 Citocininas

Son fitohormonas específicas derivadas de la adenina, que tuvieron su primera aparición entre los años 1940 y 1950, cuando Caplin y Steward (1948) empezaron a estudiar el efecto que podía tener el extracto de levadura y el jugo de tomate en el crecimiento vegetal (Alcantara et al., 2019).

Las citocininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogénico vegetal en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal (Yong et al., 2009). Su efecto en el sistema vegetal suele ir acompañado casi siempre de la fitohormona auxina debido a su alta complementariedad en la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, una relación de una concentración similar auxina-citoquininas induce a la proliferación de células no diferenciadas (callos vegetales o meristemos) (Alcantara et al., 2019).

1.6.2 Kinetina

La kinetina (6-furfuril-aminopurina) es una fitohormona de citocinina de tipo adenina utilizada para medios de cultivo de plantas en los medios Murashige y Skoog en combinación con las auxinas, se lo utiliza para inducir la formación de callos y la regeneración de tejidos a partir de explantes o callos vegetales (Sakakibara, 2006).

Cruz et al., (2010), indica que la kinetina es una hormona reguladora de crecimiento utilizada en cultivos de tejido vegetal, son compuestos responsables de la expresión genética; como en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales, son caracterizadas por influenciar en respuestas morfológicas de manera pleiotrópica.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB) en el Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Península de Santa Elena (UPSE) sus coordenadas geográficas son, Latitud -2.232380, Longitud -80.874934. La UPSE está ubicada en la calle principal vía La Libertad – Santa Elena, a 10 msnm, aproximadamente.

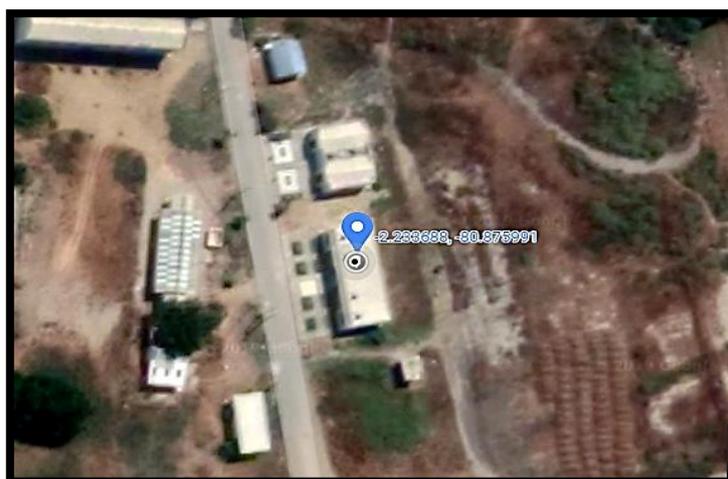


Figura 4. Vista Aérea del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB).



Figura 5. Vista frontal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas.

En la provincia de Santa Elena de acuerdo a su climatología, se presenta con dos estaciones marcando la época lluviosa en los meses de noviembre a abril, con precipitaciones aproximadas de 7.97 mm/año, con una temperatura máxima de 28 °C, y la época seca va de

mayo a octubre, meses secos que se presentan acompañados de la corriente fría de Humboldt, con una humedad relativa en promedio de 80% y una temperatura mínima de 15 °C. En general presenta una temperatura ambiental de 24.5 °C, y una velocidad del viento de 3.6 km/h (WeatherSpark, 2021).

2.2 Material genético

2.2.1 Líneas promisorias de tomate tolerantes al estrés hídrico UPSE 78 y UPSE 19

Las nuevas líneas promisorias de tomate fueron desarrolladas durante el periodo 2013-2019 sometidas al estrés hídrico, provienen de los híbridos Daniela y Acerado que lograron germinar en altas concentraciones de agua de mar; con el Pedigrí: CIAP-UPSE-T-DANIELA+ H₂O MAR-S-I-78M y CIAP-UPSE-T-ACERADO+ H₂O MAR-S-I-19M y experimentalmente fueron Denominadas UPSE-78 y UPSE-19 respectivamente como detalla en la tabla 3 y tabla 4.

Tabla 3. Descripción agronómica de la línea UPSE 78

Características	Datos
Días de floración	40 días DDT
Altura de planta	1.14 -1-35 m
Número de racimos florales	5 a 7
Número de frutos por racimo	5 a 8
Peso promedio del fruto	108 -110g
Rendimiento (Ton/ha)	54 a 100
Grados Brix	4.19
Dureza de la pulpa	5.14
Estrés hídrico	Tolerante
<i>Resistencia a Prodiplosis longifila y otras plagas que afectan al cultivo</i>	Moderada

Tabla 4. Descripción agronómica de la línea UPSE 19

Características	Datos
Días de floración	45 días DDT
Altura de planta	1.38 -1.45 m
Número de racimos florales	4 a 6
Número de frutos por racimo	3 a 5
Peso promedio del fruto	134 -160 g
Rendimiento (Ton/ha)	32 a 90
Grados Brix	3.54
Dureza de la pulpa	5.26
Estrés hídrico	Tolerante
<i>Resistencia a Prodiplosis longifila y otras plagas que afectan al cultivo</i>	Moderada

2.2.2 Híbrido Micaela Ha 1903

El híbrido Micaela es una planta con follaje de buena ventilación y un crecimiento indeterminado, tal así que también se adapta en el clima frío, se puede cultivar en la Sierra como en la Costa ya que es una variedad muy reproductiva con una fruta grande, alta dureza con una extensa vida como manifiesta Rivera (2010). En la tabla 5 se detallan las características.

Tabla 5. Descripción agronómica del Híbrido Micaela

Características	Datos
Número de racimos florales	8 a 10
Número de frutos por racimo	5 a 8
Peso promedio del fruto	190 -250g
Rendimiento (Ton/ha)	200 a 220
Estrés hídrico	Tolerante
<i>Resistencia a <i>Prodioplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo</i>	Moderada

2.3 Materiales, equipos e insumos

➤ Materiales

Papel aluminio	Cinta aislante blanca
Papel filtro	Plástico stretch film
Papel toalla	Plástico adherente
Frascos de vidrio	Pinza bayoneta de Jansen
Agitador magnético	Mechero con alcohol
Cajas Petri	Espátula mango de madera
Hoja de Bisturí N°3	Gasa
Mango de bisturí N°3	Probetas 250 mL, 50 mL
Vasos de precipitación 250 mL, 100 mL, 50 mL	Matraz Erlenmeyer 260 mL, 500 mL, 1000 mL
Puntas de pipeta cito test de 10µl a 1000µl	

➤ Equipos

Estufa	Micropipeta de 10µl a 1000µl
Autoclave	Estereoscopio
Cámara de crecimiento	Peachímetro digital
Cámara de flujo laminar	Balanza analítica
Agitador magnético con calefactora	Medidor de Temperatura y Humedad Relativa

➤ **Insumos de laboratorio**

Alcohol	Hormona citocinina (kinetina)
Sacarosa	Hipoclorito de sodio (NaClO)
Agua destilada (AD)	Vitamina inositol
Agar bacteriológico	Vitamina tiamina HCL
Sales de Macro y	
Micronutrientes MS	Antibióticos: Fluconazol y
Jabón líquido	Gentamicina (160 mg)

2.4 Tratamientos y Delineamiento experimental

La presente investigación se estableció de 3 materiales genéticos (UPSE 19, UPSE 78 e Híbrido Micaela HA 1903) y 3 tipos de concentraciones de citocininas y uno sin la fitohormona que fue el testigo absoluto como detalla en la tabla 6 y en la tabla 7 detalla los tratamientos.

Tabla 6. Detalle de materiales genéticos y concentraciones de hormonas

Material Vegetal	Concentraciones Citocinina
UPSE-78	Medio 1: MC1 (0.0 mg/l citocinina)
UPSE-19	Medio 2: MC2 (0.2 mg/l citocinina)
Micaela	Medio 3: MC3 (0.3 mg/l citocinina)
	Medio 4: MC4 (0.4 mg/l citocinina)

Tabla 7. Número de tratamientos

T1: UPSE78 MC1	T4: UPSE78 MC4	T7: UPSE19 MC3	T10: Micaela MC2
T2: UPSE78 MC2	T5: UPSE19 MC1	T8: UPSE19 MC4	T11: Micaela MC3
T3: UPSE78 MC3	T6: UPSE19 MC2	T9: Micaela MC1	T12: Micaela MC4

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza, por el programa estadístico InfoStat. Cuando los resultados fueron significativos, se realizó un test de Duncan para comparación de medias con un nivel de significancia $p < 0.05$. En la tabla 8 se detalla el Análisis de la varianza.

Tabla 8. ANDEVA

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos (t-1)	11
Replicas (r-1)	2
Factor A (a – 1)	2
Factor B (b – 1)	3
Int. A*B	6
Error Experimental (t -1)*(r-1)	22
Total	35

Elaborado por: Edwin Alejandro T.

Los tratamientos estuvieron dispuestos bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 3x4, el cual se consideró tres tipos de materiales vegetales y cuatro tipos de concentraciones con tres repeticiones en donde cada repetición se incluyó el testigo absoluto, con un total de 36 unidades experimentales.

Conversión logarítmica y raíz cuadrada

Se hizo una conversión logarítmica a los datos del experimento debido a que presentaba mucha variación entre ellos al momento de tabular, incrementando el Coeficiente de Variación, aplicando la formula $\text{Log}(x-1)$ para tener un buen análisis en los resultados finales, cuales fueron transformados a logaritmo y a raíz cuadrada ($\text{Raíz}(x*100+0.5)$).

2.4.1 Delineamiento experimental

a. Diseño experimental	DCA con arreglo factorial 3 x 2
b. Tratamiento	12
c. Repeticiones	3
d. Total de unidades experimentales	36
e. Número de semillas por unidad experimental	5
f. Número de frascos por tratamiento	9
g. Total de semillas por tratamiento	12
h. Total de semillas del experimento	36

2.5 Manejo del experimento

2.5.1 Protocolo de desinfección

La esterilización de la cámara de flujo laminar consiste en encender la luz ultravioleta por 24 horas para eliminar cualquier patógeno, previo al uso de la cámara. Es recomendable

desinfectar la cámara de crecimiento, ya que es el lugar donde se manipulan las plántulas y explantes propagados para su desarrollo durante el tiempo de estudio. Se recomienda limpiar y desinfecta todos los equipos e instrumentos antes de ser usados tales como, la balanza analítica, agitadores magnéticos, calefactora, pinzas, etc. para evitar contaminación en los procesos de micropropagación.

2.5.2 Lavado de los materiales de laboratorio

Para la estilización de los materiales utilizados en la micropropagación de tomate, consistió en el lavado con desinfectante, posteriormente se desinfecto con una solución de cloro al 30% sumergido durante 30 minutos, y tres enjuagues consecutivos con agua pura por 15 minutos. Una vez de a ver realizado el lavado, se roció con alcohol todos los materiales donde se cubrió con papel aluminio, en el caso de la vidriería se ubica los recipientes boca abajo rociando completamente con alcohol y antes de ser cubierta la parte superior del recipiente con papel aluminio se le rosea el interior del frasco, para su almacenamiento. Luego los materiales antes de ser utilizados son esterilizados en la estufa. La temperatura de esterilización en la estufa fue de 128 °C por un tiempo aproximado de 2 horas.

2.5.3 Preparación de medio Murashige & Skoog (MS)

El medio Murashige & Skoog (1962) es el más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales. Para la preparación de medio de cultivo MS, se elaboró previamente la solución madre de vitaminas (tabla 9).

Tabla 9. Concentración de vitaminas en medio de Murashige & Skoog

Nombre	Formula química	Concentración en mg/l
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100.00
Tiamina – HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺	0.01

Para que los explantes de tomate *Solanum lycopersicum* tengan un buen desarrollo, requiere de sales nutricionales Macro y micronutrientes que contiene el medio Murashige & Skoog como detalla la tabla 10.

Tabla 10. Composición de sales del medio Murashige & Skoog (MS)

Componentes	Concentración (mg/L)
Nitrato de amonio	1650
Ácido Bórico	6.2
Anhídrido clorhídrico de calcio	332.2

Clorato cobaltico. 6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico. 5H ₂ O	0.025
Na ₂ -EDTA	3726
Sulfato ferroso. 7H ₂ O	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso. H ₂ O	16.9
Ácido molibdeno (sales sodio) 2 H ₂ O	0.25
Yoduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato monobásico de potasio	170
Sulfato de zinc. 7H ₂ O	8.6
Gramos de polvo 1L	4.3

Para la elaboración de un litro de medio Murashige & Skoog, se consideró las sales de macro y micronutrientes, vitaminas, sacarosa y agar, en concentraciones como indica la tabla 11.

Tabla 11. Materiales para preparar 1 L de medio Murashige & Skoog

Contenido	Concentración
Sales de macro y micronutrientes	5 g/L
Agar	7 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitamina B5 (Solución madre)	10 mL/L

2.5.4 Metodología para la preparación del medio de cultivo MS

Para la elaboración del medio de cultivo se consideró en medir el volumen total (1 000 mL) de agua destilada con una probeta esterilizada, se vertió el 50% (500 mL) del agua destilada en un vaso de precipitación para la incorporación de los insumos; el 50% restante de agua se añadió al término de la preparación del medio.

Las vitaminas se agregan con una micropipeta, posteriormente la sacarosa y sales, donde cada ingrediente con un agitador magnético se disuelve por separado. Tan pronto como se revuelvan los componentes mencionados anteriormente, se mide el pH del medio, que debe estar entre 5.6 a 5.8. En caso de tener el medio ácido, anexar hidróxido de sodio; si el medio esta alcalino se debe añadir ácido clorhídrico, dichos componentes regulan la acidez y alcalinidad respectivamente en la solución. Luego de medir el pH, se coloca el agar en el matraz Erlenmeyer, posteriormente el 50% de agua restante, finalmente el medio se calienta durante 15 minutos dejando el agitador magnético en el matraz para una mejor disolución.

El medio de cultivo MS se coloca en el autoclave para la esterilización a una temperatura de 121 °C a 15 PSI de presión, aproximadamente por 45 minutos como menciona Tortora et al. (2007). En frascos de vidrio, se vertieron 25 mL del medio de cultivo MS, que se cubrieron adecuadamente con papel aluminio, el medio se solidifica posteriormente y se procede a etiquetar para almacenar en condiciones estériles.

2.5.5 Desinfección de semillas

Para obtener explantes de tomate, se procederá a germinar semillas en cajas Petri. Las semillas se lavan con desinfectante líquido para eliminar la testa, posteriormente se realizaron varios enjuagues con agua esterilizada para eliminar residuos del desinfectante, se coloca las semillas en bolsas de gaza estéril, y con ayuda de las pinzas sumerge en una solución de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% durante 20 minutos, luego se realizan tres enjuagues consecutivos de 5 minutos en agua destilada.

2.5.6 Pre germinación de semillas

Una vez desinfectada las semillas, se colocó 15 semillas en cada caja Petri cuya base era de papel filtro esterilizado que fue humedecido con 10 ml de agua destilada, posteriormente se selló con parafilm cada caja petri, etiquetando las cajas por tratamientos, cubriendo los tratamientos con papel aluminio, procediendo a colocar en las cámaras de crecimiento manteniendo 72 horas de oscuridad.

2.5.7 Preparación del medio de cultivo para semillas germinadas (MS1)

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron varios componentes, para que las semillas germinadas normalmente sigan desarrollándose, las medidas para la elaboración en un litro de agua con medio de Murashige & Skoog (MS) se detalla en la tabla 12.

Tabla 12. Componentes del Medio de cultivo (MS1)

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

*Solución madre

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 500 mL de agua destilada estéril, posteriormente agregar las sales, sacarosa y vitaminas, se usó un agitador magnético para homogenizar la disolución, el pH debe estar en un rango de 5.6 a 5.8; en el caso de que la solución esté con pH ácido se aplica hidróxido de sodio, cuando la solución es alcalina se regula con ácido clorhídrico. A continuación, se agregó el agar y posteriormente los 500 mL restantes de agua destilada, luego se ubicó el matraz en un termo agitador por 15 minutos hasta alcanzar un tono amarillo translucido, retirarlo antes de llegar al punto de ebullición. Y se traslada el medio de cultivo al autoclave, para esterilizarlo a una temperatura de 120 °C a 15 PSI, por 45 min, finalmente se distribuye 15 mL de medio de cultivo MS en los frascos de vidrio y posteriormente fueron etiquetados.

2.5.8 Siembra de semillas pregerminadas

Después que las semillas hayan tenido 72 horas de oscuridad y desarrollaran la radícula en las cajas Petri, se procede a la siembra en el medio de cultivo. La cámara de flujo laminar debió estar completamente limpia antes de colocar los materiales esterilizados en dicha cámara, para ello se limpió con alcohol, y se procedió a colocar las pinzas, papel filtro, plástico transparente adherente, mechero con alcohol, vaso de precipitación con alcohol al 70%, cinta aislante, esfero y frascos de vidrio, todas estériles y desinfectadas. Se sembró las semillas pregerminadas con ayuda de pinzas previamente flameadas, las semillas se alojan en el medio MS, luego se cubre la entrada con papel aluminio, posteriormente se sella con plástico adherente para prevenir futuras contaminaciones. Se almacenan los frascos en la cámara de crecimiento, manteniendo una temperatura de 22 a 27 °C con fotoperiodos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz.

2.5.9 Preparación de medio para siembra de explantes (MS2)

El segundo medio de cultivo MS2 para los explantes, se preparo usando varios insumos para que los brotes desarrollen sin dificultad, se aplicó fitohormona citocinina. Para la preparación de un litro de medio MS, se utilizan las proporciones detalladas en la tabla 13, teniendo en cuenta que el pH debe mantenerse entre 5.6 a 5.8.

Tabla 13. Materiales de medio de cultivo Murashige & Skoog con hormona (MS2)

Agar	6 g/L
Sales MS	2.5 g/L
Sacarosa	30 g/L
Vitaminas B5*	(10 mL)
Inositol	(100 mg/L)
TH-Cl	(1 mg/L)
Fitohormonas	
Citocinina (BAP)	0.20 mg/L

*Solución madre

Para su preparación, se realizó el mismo procedimiento que en el primer medio de cultivo (MS1) con una diferencia que después de colocar las vitaminas se añadió las dosis de concentraciones de fitohormonas BAP.

2.5.10 Siembra de meristemos apicales

Transcurridos 15 días después de la siembra se comenzó a elegir explantes de los materiales genéticos para que se desarrollen en el medio de cultivo MS2, para realizar la extracción de meristemos apicales primero se debe de llevar los materiales necesarios a la cámara de flujo laminar para realizar la obtención de explantes; entre los materiales requeridos son pinzas, papel filtro estéril, mechero con alcohol, recipiente con alcohol, plástico adherente, cinta aislante, frascos de vidrio y las plántulas propiamente dichas.

Una vez dentro de la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se procedió a cortar los hipocótilo y los cotiledones para tener un buen manejo al momento de sembrar, con ayuda de las pinzas se extrajo explantes de aproximadamente un centímetro, luego se procedió a sembrar 5 explantes por cada frasco en cada medio de cultivo Murashige Skoog con fitohormona citocininas en función de las concentraciones de los tratamientos, posteriormente se selló herméticamente los frascos de vidrio con papel aluminio y plástico adherente, finalmente se etiquetó cada tratamiento con su respectiva nomenclatura, este proceso se hizo por cada material genético por separado.

2.6 Parámetros evaluados

Porcentaje de germinación: Se determinó a los 4 días después de la desinfección y ponerlas en días de oscuridad utilizando agua destilada 10 mL en caja Petri, mediante la

identificación de hipocótilo con ayuda del estereoscopio con un total de 60 unidades por material.

$$\%germinación = \frac{\text{Total de semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} * 100$$

Número de brotes: Se consideró el periodo de 26 días posterior a la siembra de los explantes en el medio MS2.

Longitud de brotes: Para la longitud de los brotes se consideró evaluar periódicamente mediante evaluación a los 6, 13, 19 y 26 días, haciendo un registro de la altura durante el periodo de establecimiento.

Número de hojas: Para la evaluación del número de hojas en los brotes, se consideró a los 26 días, periodo de crecimiento transcurrido de los brotes.

$$\text{Prom de \# de hojas} = \frac{\text{Total de \# de hojas}}{\text{Total de explantes}}$$

Porcentaje de oxidación: Tomando referencia los días establecidos de la longitud de brotes, se determinó la evaluación mediante la observación a partir de los 13, 19 y 26 días transcurrido del experimento.

$$\% oxidacion = \frac{\text{N}^\circ \text{ explantes oxidados}}{\text{Total de explantes}} * 100$$

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de germinación

De acuerdo a la variable para determinar el porcentaje germinación se consideró en realizar una pre germinación de los materiales vegetales en estudio (tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de germinación de cada material genético *S. lycopersicum* durante 4 días en oscuridad.

Genotipos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
UPSE 78	13%	53%	85%	100%
UPSE 19	8%	43%	78%	98%
MICAELA	16%	58%	88%	100%

Como se evidencia en la tabla 14, al realizar este método de emergencia, se obtuvo una presencia mínima de hipocótilo en las semillas a las 24 horas de ser sometida a horas de oscuridad con los 10 mL de AD, siendo el Híbrido Micaela (testigo) con un 16% de germinación en el primer día, seguido UPSE 78 con un 13%, de emergencia, mientras que UPSE-19 obtuvo un 8% de germinación siendo el material genético con menor porcentaje de germinación; finalmente al cuarto día los materiales UPSE 78 e Híbrido Micaela (testigo) lograron el 100% en su totalidad en comparación al material UPSE 19 que obtuvo un 98% de germinación. La pre germinación tuvo una buena respuesta morfológica a debido a la ausencia de luz de acuerdo con el trabajo de Tomalá (2015) mostrando que la ausencia de luz favorece el desarrollo radicular y del hipocótilo donde presentó un alto desarrollo.

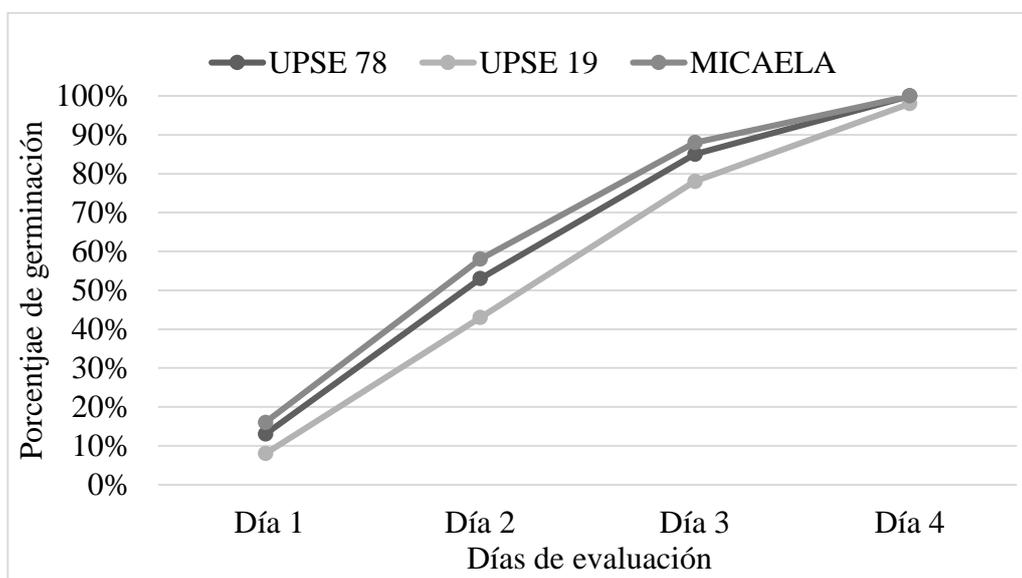


Figura 6. Porcentaje de germinación de semillas *S. lycopersicum* en caja Petri con 10 mL de agua destilada evaluado a los 4 días.

De acuerdo a los resultados, se plantea que los tres genotipos de tomates obtuvieron buena respuesta de germinación mediante el método de la pre-germinación, dos de los tres materiales presentaron mayor porcentaje UPSE 78 al 100% y Micaela 100% con un máximo porcentaje de germinación, mientras que UPSE 19 con una mínima diferencia con un valor del 98% de germinación durante el periodo de evaluación. Algo similar ocurrió en el estudio realizado por Albores en 2010 donde plantea que en el testigo fue el mejor que le resultado en la germinación de *S. lycopersicum* seguido del segundo tratamiento y luego el primer tratamiento. Sin embargo, en el presente estudio se obtiene una pequeña diferencia en los resultados al 4 día, donde el tratamiento 2 (UPSE 78) y el tratamiento 1 (testigo) se destacaron muy bien cómo se evidencia en la figura 6.

3.2 Número de brotes

Con respecto a la evaluación del número de brotes, se determinó el último día de evaluación que corresponde a los 26 días, como detalla en la figura 7.

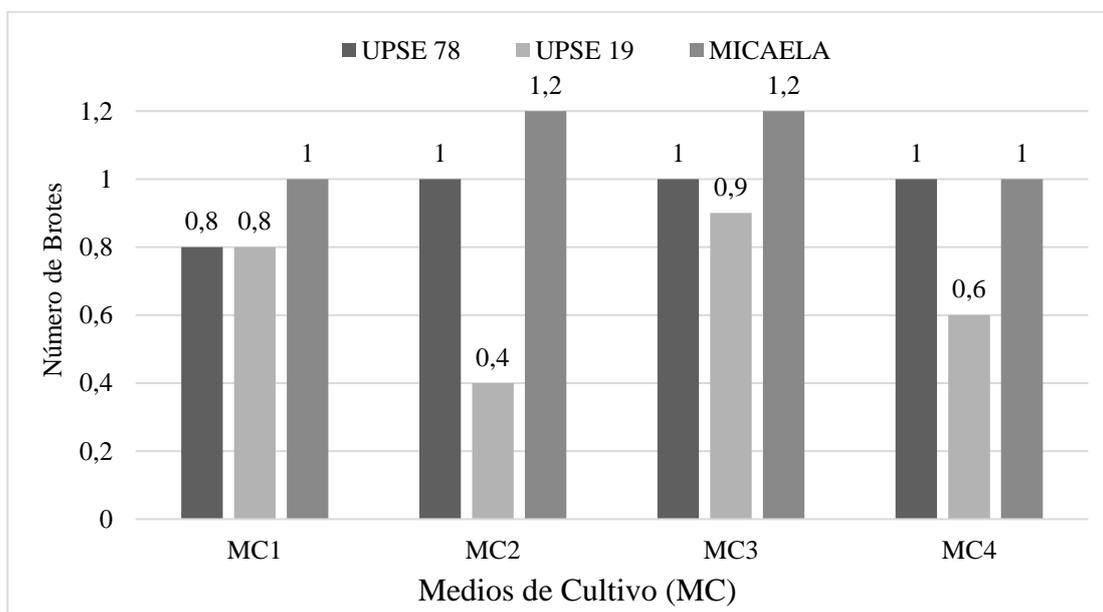


Figura 7. Número de brotes en cultivo *in vitro* de *S. lycopersicum* en medio de cultivo MS2 con diferentes concentraciones de citocinina evaluados a los 26 días.

En la figura 7 refleja que los MC2 y MC3 el material genético Micaela presentan un promedio máximo de 1.2 brotes, seguido de UPSE 78 con un promedio de 1 brotes en los tratamientos MC2 al MC4, y en el tratamiento MC3 la variedad UPSE 19 obtuvo mayor promedio de 0.9 brotes por planta. Los valores inferiores se obtuvieron en el MC2 con un promedio de brotes por planta de 0.4 del material UPSE 19. Mientras que en el MC1

(testigo) ausencia de hormona, el material Micaela obtuvo un máximo promedio de 1 brotes. Sin embargo, para los materiales UPSE-78 Y UPSE-19 obtuvieron promedios de 0.8 brotes por planta.

Los resultados anteriores indican que, en concentración de 0.3 mg/L de citocininas hay mayor desarrollo de brotes que en concentraciones 0.2 mg/L o 0.4 mg/L de citocininas, lo que indica que concentraciones de 0.3 mg/L de citocininas (MC3) hay mayor número de brotes en los tres materiales estudiados. Estos resultados compara con los de Balón (2019), manifiesta que los tratamientos con menos concentración de citocininas exógena le resultó con mayor respuesta morfológica e incluso el testigo obtuvo mejor respuesta, probablemente los tejidos vegetales de mayor edad requieren menor cantidad de dicha hormona, este resultado también se asimila con la experiencia de Zhao et al. (2008), donde mencionan que es posible de que haya menor formación de brotes utilizando bajas concentraciones de citocininas.

Sin embargo, Valderrama-Alfaro et al. (2011) plantea que los tratamientos con menores a 1 mg/L de concentraciones de citocininas o auxinas no indujeron formación de brotes en sus tratamientos, algo similar sucedió con el presente experimento el cual las concentraciones fueron menores a 1 mg/L, utilizando solo citocininas para los diferentes tipos materiales genéticos. Otra explicación, para la formación de brotes y de buena calidad en los tratamientos es utilizar la combinación de auxina (IAA)/citocininas (BAP) siendo más efectiva como demuestra Valderrama-Alfaro et al. (2011), el cual obtuvo mayor porcentaje de brotes con el tratamiento (0.1 mg/l IAA + 1 mg/l BAP). Al igual que Unda et al. (2007), demostraron sus resultados similares al utilizar la combinación de las dos hormonas en su trabajo de investigación.

3.3 Longitud de brotes

En la tabla 15 se detalla el Análisis de la varianza mediante el ANDEVA de las evaluaciones realizadas a los 6, 13, 19 y 26 días, periodo del cultivo *in vitro*. Dicho análisis se utilizó la Prueba de Duncan al 0.05 para determinar las diferencias significativas, donde existe diferencia significativa al 1% a los 6 día, tanto en el Factor A, Factor B y en el valor de las interacciones de los dos factores. Sin embargo, Día 13 podemos encontrar en el Factor A hay una diferencia altamente significativa al 1%, mientras que en el valor de F

del Factor B es significativa, en la interacción de los dos factores anteriormente mencionados no hay significancia. Con respecto a los 19 días y 26, existe diferencia significativa al 5% en los Factores A, mientras que los valores del Factor B son altamente significativos al 1%, por lo tanto, los valores de F en las interacciones de los Factores no existen significancia.

Tabla 15. ANDEVA ($p < 0.05$) realizada a la variable de longitud de brotes (mm) de *S. lycopersicum* los 6, 13, 19 y 26 días de estudio.

F.V.	gl	Día 6	Día 13	Día 19	Día 26	F. Valor	
		F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	0,05	0,01
FACTOR A ¹	2	15.68**	10.27**	7.47*	4.52*	2.93	3.99
FACTOR B ²	3	8.53**	7.66*	10.97**	13.65**	3.08	4.17
FACTOR A*FACTOR B	6	7.86**	2.62NS	2.53NS	2,57NS	3.29	4.42
C.V.		13.98	15.26	13.87	14.02		

1 Material vegetal

2 Concentraciones de citocininas

* Significativo

** Altamente significativo

NS No significativo

Elaborado por: Edwin Alejandro

De acuerdo a la variable de estudio se evaluó periódicamente la longitud de brote a los 6 días después de la siembra de los explantes hasta el día 26 que se determinó los valores de los materiales vegetales en medios de cultivo con bajas concentraciones de citocinina, teniendo un total de 12 tratamientos, como se observa en la figura 8.

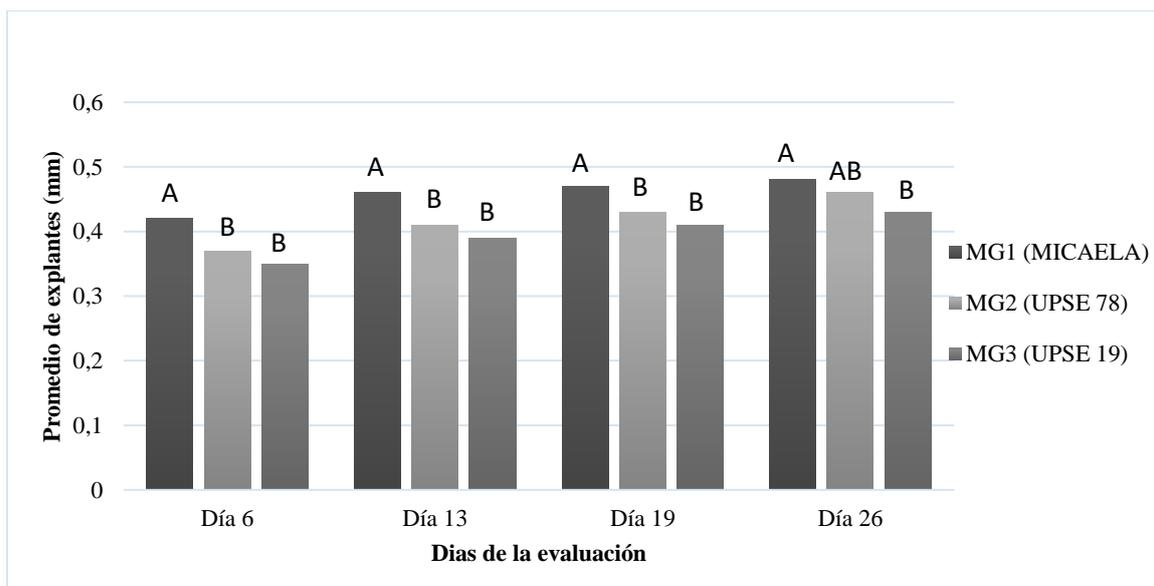


Figura 8. Resultados del Factor A, promedio de explantes (mm) de los materiales genéticos de *S. lycopersicum*, Micaela, UPSE 78 y UPSE 19 durante el periodo del ensayo.

La figura 8 ilustra los promedios obtenidos del análisis estadístico del Factor A, donde se llegó a la conclusión que el Material Genético (Micaela) estadísticamente son iguales, con valores 0.42 para el día 6, con un máximo valor para el día 26 de un promedio de 0.48. Sin embargo, para el segundo material genético (UPSE 78) se determinó que el MG2 fue no significativo durante el periodo de evaluaciones (6,13,19 y 26 días) al ser estadísticamente iguales, obteniendo la mayor respuesta morfológica en el día 26 con un valor 0.46. Con respecto al tercer material genético (UPSE 19), tiene como resultado que fueron estadísticamente iguales en los días de evaluaciones (6, 13, 19 y 26 días) con promedios en el día 6 de 0.35 mientras que en el día 26 con promedio de 0.43 teniendo mayor respuesta morfológica.

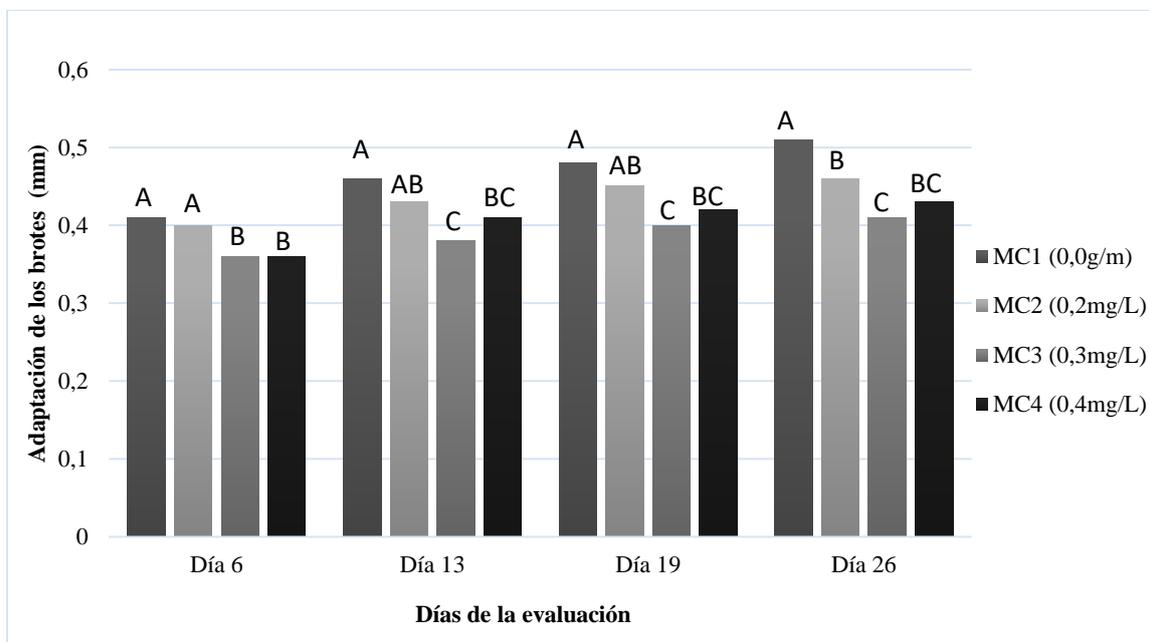


Figura 9. Resultados de la adaptación de los brotes (mm) *S. lycopersicum* en presencia de dosis de citocininas durante los periodos de evaluaciones (Factor B).

La figura 9 ilustra los resultados de los promedios que generó el programa InfoStat de los análisis estadísticos del Factor B, de la adaptación de brotes, donde se determinó que el día 6 de evaluación consta de 2 grupos estadísticos, conformados por las concentración MC1 y MC2, con valores 0.40 a 0.41 obteniendo mayor respuesta en la MC1 con un valor 0.41, en el segundo grupo constituye de las concentraciones MC3 y MC4 cuyo resultados fueron estadísticamente iguales con un valor de 0.36, siendo los medios con menor adaptación de brotes en las unidades experimentales.

Para el día 13, resultaron 4 grupos estadísticos, que constituye por las concentraciones MC1 con valor de 0.46, MC2 de 0.43, la MC3 con valor de 0.38 y la MC4 con valor de 0.41, obteniendo mayor longitud en los brotes en el MC1 (testigo), mientras que en la MC3 (0.3 mg/L) se obtuvo un promedio inferior. Mientras que al día 19, al igual que al día 13, presentaron 4 grupos estadísticos, con valores de 0.4 a 0.48, obteniendo la mayor adaptación en el testigo MC1 con valor de 0.48 de longitud, mientras que con la concentración fue el MC2 con un valor de 0.45, siendo el MC3 con valor de 0.4 indicando que fue el que menos presentó adaptación y longitud de los brotes meristemáticos.

Para el día 26 último día de evaluación se formaron 4 grupos estadísticamente, conformados por la MC1 (testigo) con un valor de 0,51, mientras que, para el MC2 con un valor de 0,46, para la MC3 con el valor de 0,41 y para el ultimo MC4 con un valor de 0,43, obteniendo la mayor adaptación de brotes en la MC2 (0.2 mg/L) y en la MC3 con dosis de (0.3 mg/L) donde presento menor longitud en los brotes. De acuerdo a la variable se evaluó periódicamente la longitud de brotes a los 6, 13, 19 y 26 días, mostrando los promedios y últimos resultados recogidos del experimento como muestra la figura 10.

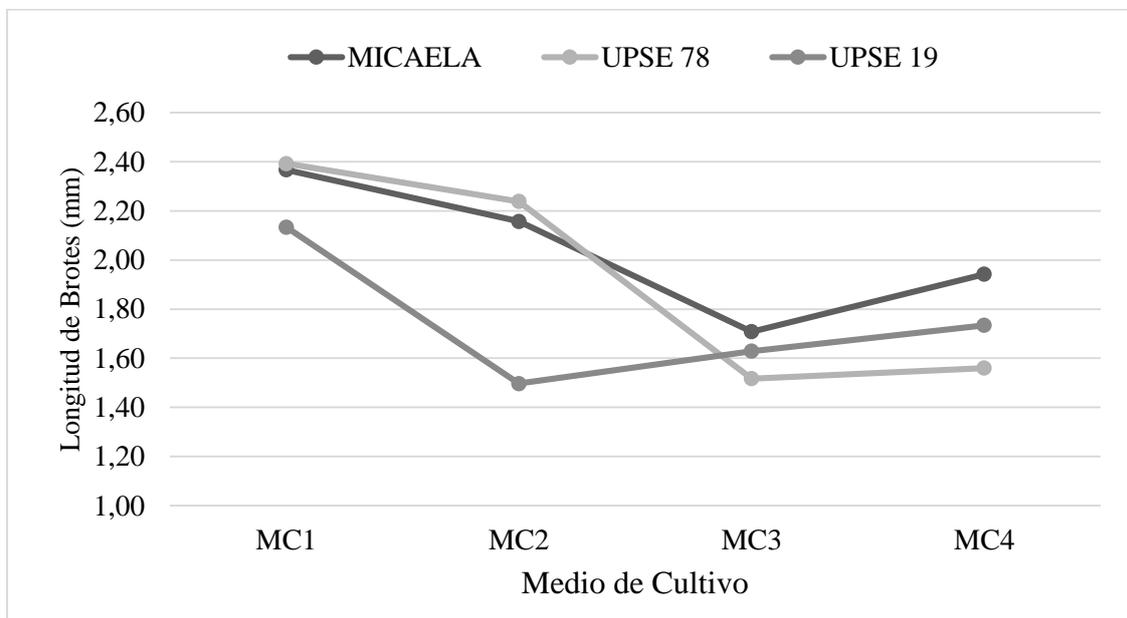


Figura 10. Longitud de brotes de *S. lycopersicum* en medio de cultivo con diferentes concentraciones de citocininas evaluados a los 26 días.

En la figura 10 se observa que en el MC1 (Testigo) el material UPSE-78 obtuvo un promedio máximo de 2.39 mm longitud, mientras que el material Micaela se obtuvo 2.37

mm y UPSE 19 con un total de 2.13 mm longitud de brotes por planta. En el MC2 el material genético UPSE 78 con un mayor promedio de 2.24 mm, seguido de Micaela con 2.16 mm. Para el material genético UPSE 19 tuvo éxito en el MC4 con un promedio de 1.73 mm de longitud en los brotes, teniendo consecuencias en el MC2 con un promedio de longitud de 1.50 mm del material UPSE 19, no obstante, para el material UPSE 78 en el MC3 resulto valor inferior de 1.52 mm.

En base a los resultados anteriores indican que en concentraciones 0.2 mg/l citocininas los materiales UPSE 78 Y Micaela hay una mayor longitud que en 0.4 mg/l de citocininas (que en las otras concentraciones restantes), indica que a menos concentraciones de citocininas mayor longitud para estos materiales. Para el material UPSE 19 tuvo una respuesta representativa con la mayor longitud en la concentración 0.4 mg/l de citocininas nos indica que este material genético responde a mayor concentración.

Cabe recalcar que el comportamiento en presencia de hormonas depende de los materiales genéticos, corroborando los resultados de George et al. (1993), plantea que los resultados entre especies, dependiente del genotipo, al igual que algunas respuestas dependientes son causadas por la interacción entre el vegetal (planta) y medio de cultivo o la hormona utilizada. Así como también se corrobora con el trabajo de Botero-Giraldo et al. (2011), el cual da a conocer que se logró regeneración de pequeños brotes.

Sin embargo, los explantes de los tres materiales genéticos desarrollados en cultivo *in vitro* sin concentraciones de citocinina mostraron buena capacidad de longitud de brotes que en presencia de hormonas. Otra explicación el cual los explantes que estuvieron sometido bajo dosis de citocininas presentaron mayor oxidación directamente en la parte lateral donde inhibió el desarrollo longitudinal de los brotes estando de acuerdo con Ogita (2005), de acuerdo a su experiencia de trabajo en estudio, menciona que la presencia de oxidación en el experimento para el desarrollo en los explantes es inhibido, perdiendo la capacidad de proliferar.

3.4 Número de hojas

Para la variable de número de hojas se determinó al día 26, ya que en los diversos tratamientos hubo una baja velocidad en el desarrollo de las hojas de los explantes en estudios de acuerdo al seguimiento realizado, tal y como detalla en la figura 11.

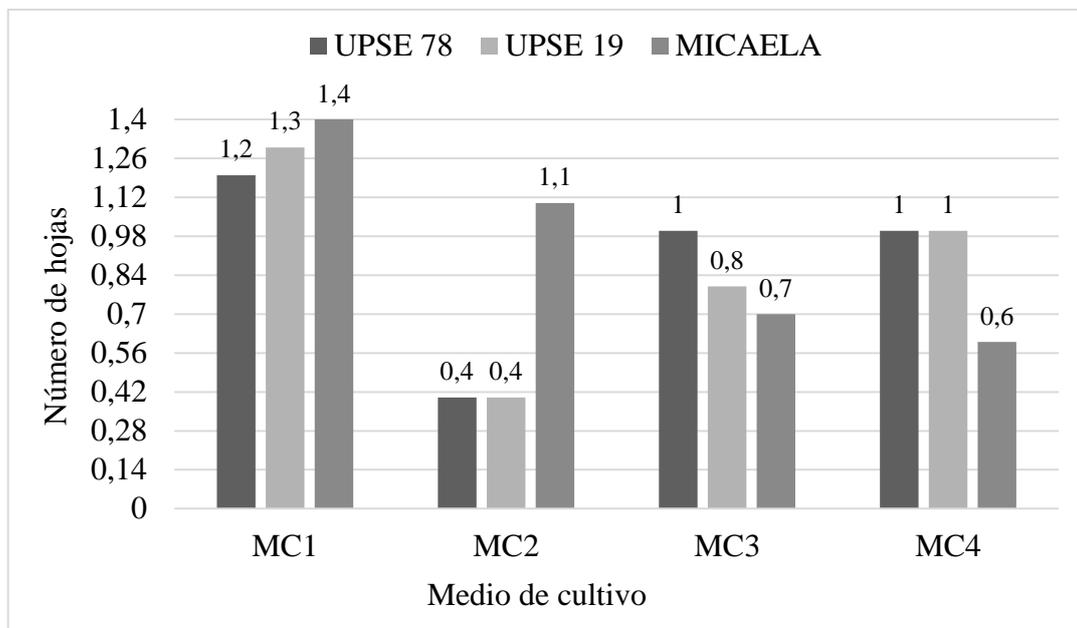


Figura 11. Número de hojas de los explantes desarrollados en cultivo *in vitro* de *S. lycopersicum* en diferentes dosis de citocininas evaluados a los 26 días.

En la figura 11 ilustra los resultados, que en MC1 (Testigo) el material Micaela obtuvo un promedio máximo de 1.4 hojas, mientras que el material UPSE 19 se obtuvo 1.3 y UPSE 78 resultaron 1.2 hojas por planta. En la MC2 el material Micaela presenta un máximo de 1.1 seguido UPSE 78 con 1 en la MC3 y MC4, mientras que el material UPSE 19 obtuvo una mayor respuesta en la MC4 con 1 promedio de número de hojas por planta. Los valores inferiores se obtuvieron en el MC2 con un promedio de hojas por planta de 0.4 en los materiales UPSE 78 Y UPSE 19 y en la MC4 el genotipo Micaela con 0.6.

En base a lo anteriormente expuesto se puede mencionar que los materiales genéticos mejorados UPSE 78 Y UPSE 19 presentaron mayor número de hojas en concentración de 0.4 mg/l de citocinina a diferencia de Micaela que desarrollo mayor número de hojas en concentraciones de 0.2 mg/l de citocinina. Sin embargo, se obtuvo mayores números de hojas de los tres materiales genéticos en medios de cultivos sin dosis, que en presencia de

hormonas. Resultados similares con los de Cárdenas et al. (2016), plantea que presentaron menor número de hojas al utilizar bajas concentraciones de hormona de citocinina.

3.5 Porcentaje de oxidación

De acuerdo al porcentaje de oxidación se determinó la evaluación a los 26 días, como detalla en la figura 12.

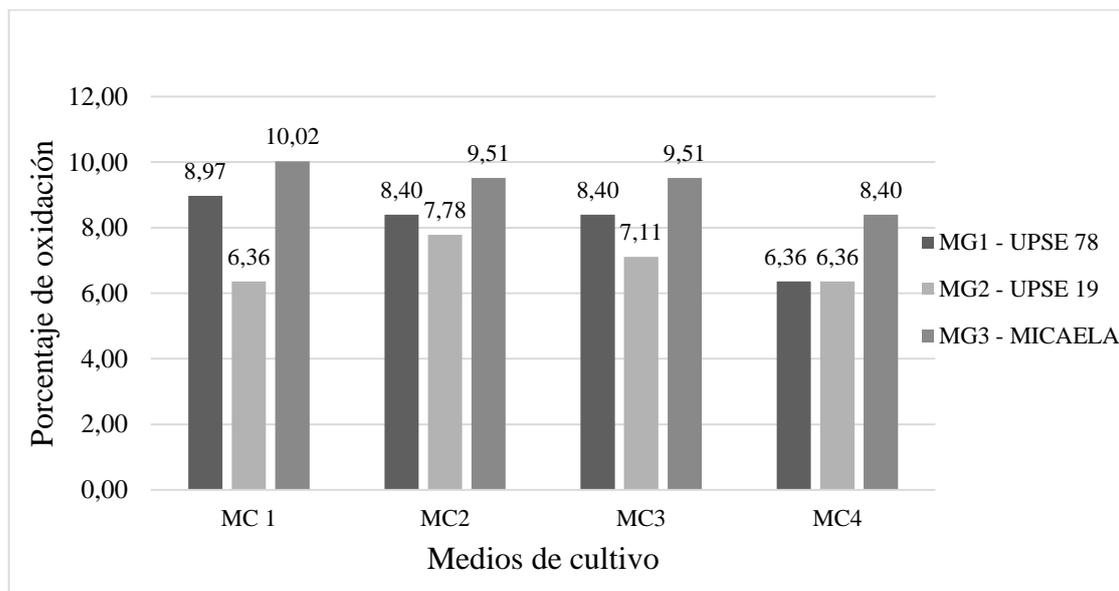


Figura 12. Porcentaje de oxidación en cultivo *in vitro* de *S. lycopersicum* en medio con diferentes concentraciones de citocinina evaluados a los 26 días.

La figura 12 ilustra la tendencia del porcentaje de oxidación, donde en el MC1 (Testigo) el material Micaela obtuvo un promedio máximo de 10.02% oxidaciones, mientras que el material UPSE 78 se obtuvo 8.97% y UPSE 19 resultaron 6.36% oxidación en explantes. Mientras que en presencia de dosis de citocininas en el MC2 el material Micaela presenta un máximo de 9.51%, seguido de UPSE 78 con un 8.40% y para la UPSE 19 con un 7.78% de oxidación en los explantes por tratamientos. Los valores inferiores se obtuvieron en el MC4 con un promedio de oxidación por planta de 6.36% en los materiales UPSE estudiados, seguido del material Micaela con promedio de 8.40% de oxidación.

En base a los resultados anteriores, indica que en concentraciones 0.2 mg/l de citocininas hay mayor desarrollo de oxidación que en concentraciones de 0.4 mg/l de citocininas lo que indica que en menos concentraciones de citocininas mayor oxidación. Sin embargo, los explantes desarrollados en cultivo *in vitro* sin concentraciones de citocininas, como los

materiales UPSE 78 Y Micaela presentaron un mayor desarrollo de oxidación que en presencia de hormonas.

Se planteo que en los tratamientos con presencia de oxidación hubo un crecimiento lento de brotes meristemáticos en los explantes con apariencia oscura perdiendo la capacidad de proliferar más de lo previsto, el cual puede ser causado por exudados liberados, corroborando con los resultados del trabajo de Azofeifa (2009), donde menciona que en explantes de tomate cultivados *in vitro* se ha reportado la presencia de vainillina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído, el cual no todos los exudados liberados en el medio de cultivo son tóxicos o inhibitorios, pero en la mayoría de los casos el crecimiento de los explantes es inhibido, no obstante perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar, trayendo como consecuencia la oxidación total (muerte) del explante (Ogita, 2005).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Las concentraciones de citocininas en la producción de brotes meristemáticos de *S. lycopersicum* generaron mayores respuestas morfogénicas en los tratamientos testigos de los materiales genéticos UPSE 78 y Micaela prestando un promedio de 2.39 mm en longitud del brote en ambos, así mismo, el material genético Micaela presentó 1.4 hojas por planta. Mientras que, los tratamientos con concentraciones de 0.3 mg/L presentaron menor desarrollo morfogénico en todos los materiales genéticos obteniendo un máximo de 1,71 mm en longitud del brote, además, la menor producción de hojas por planta se obtuvo en concentraciones de 0.2 mg/L en los materiales genéticos UPSE 19 y UPSE 78 con 0.4 hojas por planta. En relación a la concentración de 0.4 mg/L las respuestas morfogénicas fueron mayores que las concentraciones de 0.3 mg/L. Esto indica que, a concentraciones de 0.2 y 0.3 mg/L de citocininas no hay una buena respuesta morfogénica, respondiendo mejor a la ausencia de ella o en combinación con auxinas como lo indica (Valderrama et al., 2011).

En el caso de la interacción de los factores A (material genético) y B (concentraciones de citocininas), el material genético Micaela en concentración de citocininas de 0.2 y 0.3 mg/L obtuvo al mayor producción de brotes con un promedio de 1.2 en ambos casos; el material genético UPSE 78 presentó menor desarrollo en el tratamiento testigo y en el caso de los tratamientos que incluían citocininas todos lograron un promedio de 1 brote por planta; en el caso del material genético UPSE 19, la menor producción de brotes se obtuvo en la concentración de 0.2 mg/L con 0.4 brotes y en la concentración de 0.3 mg/L con un promedio de 0.6 brotes. Esto indica que, el material que mejor adaptación a las concentraciones de citocininas presentó fue el híbrido Micaela, justamente por sus características genéticas, mientras que el material que peor se adaptó fue UPSE 19 que es una línea promisorio que soporta estrés hídrico, es necesario mencionar inclusive que los cultivos *in vitro* se desarrollan en condiciones de humedad elevadas.

Respecto a la producción de brotes en cultivos *in vitro* de tomate se concluye que el material genético Micaela requiere de concentraciones de citocininas de 0,2 y 0,3 mg/L para aumentar la producción de brotes, pero en ausencia de citocininas presenta mayor

diferenciación morfogénica de los explantes, esto debido a que principalmente las citocininas participan en la división celular. En relación a ello, se puede concluir que concentraciones de 0,4 mg/L o superiores generan mayor diferenciación celular y mayor producción de brotes dependiendo el material genético utilizado, pero si se busca la diferenciación de los tejidos para la formación de una planta completa es necesario la ausencia de la hormona o el uso de ella en combinación con auxinas.

Recomendaciones

Utilizar combinaciones de hormonas Auxina/Citocina, a partir de 1 mg/L a 4 mg/L variando sus dosis en ambos reguladores de crecimiento.

Tener una buena manipulación de instrumentos de trabajo (pinzas) hacia los explantes ya que esto conlleva al estrés del mismo y oscurecimiento del tejido.

Seguir realizando investigación sobre cultivo *in vitro* de las nuevas variedades de tomates UPSE 78 y UPSE 19 bajo la influencia de reguladores de crecimientos.

Tener presente en los próximos trabajos, aumentar el número de repeticiones en los tratamientos, para obtener un coeficiente de variación con mayor confiabilidad.

Una buena asepsia en el laboratorio la contaminación va ser mínima en los medios de cultivo, sin embargo, se debe de dejar en reposo tres días antes de la siembra para asegurarse de la existencia de bacterias o agentes patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriculturers, 2014. *El tomate ocupa en el mundo casi cinco millones de hectareas*. [En línea] Available at: <http://agriculturers.com/el-tomate-ocupa-en-el-mundo-casi-cinco-millones-de-hectareas/> [Último acceso: 28 Junio 2021].
- AgroSíntesis, 2019. *Métodos de Propagación Vegetativa*. [En línea] Available at: <https://www.agrosintesis.com/metodos-de-propagacion-vegetativa/> [Último acceso: 28 Junio 2021].
- Albores, V. E., 2010. *Germinación de semillas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) Var. Rio grande con dos niveles de lombricomposta bajo condiciones de laboratorio*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.: Tesis.
- Alcantara, J. S., Jovanna, A. G., David, A. C. J. & Melida, S. M. R., 2019. Main hormonal regulators and their interactions in plant growth. *SciELO*, p. 117.
- Amaro, M. R., 2018. *CULTIVO IN VITRO: ALTERNATIVA AL CULTIVO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES*, Madrid, España: FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
- Axayacatl, O., 2017. *Estadísticas mundiales de tomate*, s.l.: BLOG AGRICULTURA.
- Azofeifa, Á., 2009. *Problemas de Oxidación y Oscurecimiento de Explantes Cultivados In Vitro*. Montes de Oca, San Jose, Costa Rica: Agronomía Mesoamericana.
- Balón, R. E. G., 2019. *Repsuesta Morfológica en explantes de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) bajo la influencia de diferentes concentraciones de citocininas*. La Libertad, Ecuador: Tesis.
- Barreiro, E. G., 2015. *Fluctuacion de precios en el producto agricola tomate riñon en el mercado mayorista de montebello de la ciudad de guayaquil en el periodo 2010-2013*. Guayaquil: Tesis de Grado.
- Benavides, P., 2015. *Capacidad germinativa del genotipo de tomate Floradade (Lycopersicon esculentum Mill) en condiciones de estres salino en diferentes fotoperiodos.*, La Libertad : Tesis, Universidad Estatal Peninsula de Santa Elena.
- Botero-Giraldo, C., Restrepo-Osorio, C. & Urrea-Trujillo, A., 2011. *Respuesta de Tres Genotipos de Tomate al Cultivo In Vitro y Aislamiento de Protoplastos*. Anrtioquia, Medellin, Colombia : Actual Biol 33.

- Cárdenas, C., Pacheco, J. & Vanzela, A., 2016. In vitro Propagation of *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae). *Ciencia en Desarrollo*, 7(2).
- Castillo, A., 2004. *Propagacion de plantas por cultivo in vitro: una biotecnologia que nos acompaña hace mucho tiempo*. Uruguay: academia.edu.
- Castillo, A., 2010. *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnologia que nos acompaña hace mucho tiempo*, Uruguay: Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.
- Cruz, M., Melgarejo, L. & y Romero, M., 2010. *Experimentos en Fisiología Vegetal*, Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia
- Cubero, J. I., 2000. *Historia biotecnología vegetal*, Córdoba: ERTSIAM, Departamento de Genética.
- Díaz, C., 2007. *Caracterización Agro cadena de Tomate..* Grecia, Costa Rica: Dirección Regional Central Occidental. Ministerio de Agricultura y Ganadería .
- Fornaris, G., 2007. *Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA*. Puerto Rico: Estación Experimental Agrícola .
- George, E. F., 1996. *Plant propagation by tissue culture: In practice*. Part 2. ed. England: Exegetics Limited.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G.-J., 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology*. 2nd Edition ed. England: Exegetics Limited .
- Gonzalez, A. M. & Arbo, M. M., 2016. *Morfología de Plantas Vasculares*. [En línea] Available at: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema22/multiplicacion-vegetativa.htm> [Último acceso: 28 Junio 2021].
- Gorini, F., 2018 . *Guía completa del cultivo del tomate Para conocer las variedades*. USA: Editorial de Vecchi, S. A. 2018.
- Grisales, 2014. *Reproducción de las plantas, tipos (sexual y asexual)*. [En línea] Available at: <https://naturaleza.paradis-sphynx.com/plantas/reproduccion-de-las-plantas.htm>
- Hortoinfo, 2017. *Récord histórico en la producción mundial de tomate, superando los 177.000 millones de kilos*, s.l.: Edican Media S. L..
- Infoagro, 2014. *EL cultivo de tomate (Parte I)*. [En línea] Available at: [http://www.infoagro.com/documentos/el cultivo del tomate parte i .asp](http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate_parte_i.asp)

- Jaramillo, J. F., 2015. *Evaluación agronomica dle cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum) bajo tres diferentes coberturas plasticas*. Quito: Tesis de grado.
- Larín, M. A., Díaz, L. A. & Serrano, R. F. d., 2018. *Cultivo de Tomate (Lycopersicon esculentum)*. Primera ed. Municipio de ciudad Arce, EL Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova".
- Lopez, L. M., 2017. *Manual tecnico del cultivo de Tomate (Solanum lycopersicum)*. Primera ed. San Jose, Costa Rica: Instituto de Investigación e Innovación de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Marin, L. M. L., 2017. *Manual tecnico del cultivo de Tomate (Solanum lycopersicum)*. San Jose, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria.
- Martinez, E. J., 2016. *Plagas de cultivos*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria de Agronomía. Departamento de Protección Agrícola y Forestal.
- Martin, J., 2019. *EcuRed. Tomate*. [En línea] Available at: <https://www.ecured.cu/Tomate>
- Mendoza, J. E. T., 2016. *Totipotencia vegetal*, s.l.: Scribd.
- Monardes, H., 2009. *Manual de cultivo de tomare (Lycopersicon esculentum Mill.)*. [En línea] Available at: http://www.hortyfresco.uchile.cl/docs/manuales_innova/Manual_cultivo_tomate.pdf [Último acceso: 28 Junio 2021].
- Ogita, S., 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plan Biotechnology*, 2(22), pp. 119-125.
- Picargon, 2012. *El cultivo de tomate. Generalidades*, s.l.: Scribd.
- Ramirez, H., Lenitini, Z. & Cabrera, F. A. V., 2009. *Evaluación y selección de un protocolo para la regeneración in vitro de la variedad de tomate Unapal-Arreboles*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Redagícola, 2017. *Fitohormonas: reguladores de crecimiento y bioestimulantes*. [En línea] Available at: <https://www.redagricola.com/cl/fitohormonas-reguladores-de-crecimiento-y-bioestimulantes/> [Último acceso: 20 Abril 2020].
- Rivera, H., 2010. *AgroVerde Soluciones para el Agro*. [En línea] Available at: <https://www.agroverde.com.ec/semillas-de-alta-genetica/micaela-ha-1903.html>

- Sakakibara, H., 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation.. *Annual Review of Plant Biology* , 57(431-449)
- Santos, J. M. P. & Rodriguez, L. A., 2014 . *Morfogenesis Vegetal in vitro* , Monteía, Colombia : Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología .
- Silvestre, H., 2019. *Taxonomía de Lycopersicon esculentum*. [En línea] Available at: <http://www.hondurassilvestre.com/search/taxa/taxa.aspx?tsn=529044>
- Tomalá, J. G., 2015. *Capacidad Germinativa Del Genotipo de Tomate Riñon (Lycopersicon esculentum Mill) al Estres Salino En Diferentes Fotoperiodos*, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Torres, A., 2017. *Manual de cultivo del Tomate bajo invernadero*. [En línea] Available at: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6708/NR40982.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Último acceso: 28 Junio 2021].
- Tortora, G., Funke, B. & Case, C., 2007. *Introducción a la microbiología*. Novena ed. Buenos Aires: Médica Panamericana S. A..
- Unda, F., kaynyak, P. & Riseman, A., 2007. Organogenesis plant regeneration from leaf explants of Exacum Styer Group. *Plant Cell Tiss Organ Culture*, Issue 89, pp. 105-111.
- Urbina, C., 2009. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades. En: V. Escalona, y otros edits. *Manueal de cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Chile: InnovaChileCorfo, pp. 36-40.
- Valderrama, S., Chico-Ruiz, J., Quispe-Chavez, J. & Sanchez-Marín, R., 2011. Regeneración in vitro de plantas Solanum pimpinellifolium L. a partir de explantes foliares. *Biotecnología Vegetal*, 11(1), pp. 19-23.
- Valle, J. R. E. d. y otros, 2013 . Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de Agave americana var. oaxacencis. *Sistema de Información CientíficaRed de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 45(2, 2013), pp. 341 - 348.
- Varela, A. V., 2018. *Estudio de la producción y comercialización del tomate riñon (Lycopersicum Esculentum) en el cantón Pimampiro, de la provincia de Imbabura*.. Ibarra: Trabajo de grado.

- Vinueza, M. Á., 2007. *Producción y comercialización de tomate riñon en la provincia de Imbabura*. Quito: Trabajo de Titulación .
- WeatherSpark, 2021. *Weather Spark*. [En línea] Available at: <https://es.weatherspark.com/y/18289/Clima-promedio-en-Santa-Elena-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o> [Último acceso: 10 Septiembre 2021].
- Yanes, C. V. y otros, 1997. II PROPAGACIÓN VEGETATIVA . En: D. F. Bazzaz, ed. *LA REPRODUCCION DE LAS PLANTAS: SEMILLAS Y MERISTEMOS*. Mexico: La ciencia Para Todos.
- Yong, J. W., Ge, L., NG, Y. F. & Tan, S. N., 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water. *Molecules*, 14(12), pp. 14 (12): 5144-5164.
- Yunda, C. E., 2020. *Caracterización y Evaluación de sustentabilidad de 18 familias productoras de tomtae riñón (Solanum Lycopersicum) del barrio Rumipamba la Universidad Cantón Salcedo Provincia de Cotopaxi 2020*. Latacunga - Ecuador: Trabajo de grado.
- Zhao, X. Y., Ying Hua Su, Z. J. C. & Zhang, X. S., 2008. Cell Fate Switch during In Vitro Plant Organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), pp. 816-824.

ANEXOS

Tabla 1 A. Porcentaje de germinación de semillas de los Materiales genéticos *S. lycopersicum* de los 4 días.

Material Genético	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Semillas emergidas	Semillas no emergidas						
UPSE 78	8	52	32	28	51	9	60	0
UPSE 19	5	55	26	34	47	13	59	1
MICAELA	10	50	35	25	53	7	60	0

Tabla 2 A. Números de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum* en estudio a los 26 días de evaluación.

Rep.	Genotipos	MC1	Brote	MC2	Brote	MC3	Brote	MC4	Brote
1	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
2	UPSE 78	1	0	2	1	3	1	4	1
3	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
4	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
5	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
6	UPSE 78	1	0	2	1	3	1	4	1
7	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
8	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
9	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
10	UPSE 78	1	1	2	1	3	1	4	1
1	UPSE 19	1	1	2	0	3	1	4	0
2	UPSE 19	1	1	2	0	3	1	4	0
3	UPSE 19	1	1	2	1	3	0	4	0
4	UPSE 19	1	0	2	1	3	1	4	1
5	UPSE 19	1	1	2	1	3	1	4	0
6	UPSE 19	1	1	2	0	3	1	4	1
7	UPSE 19	1	1	2	0	3	1	4	1
8	UPSE 19	1	0	2	0	3	1	4	1
9	UPSE 19	1	1	2	1	3	1	4	1
10	UPSE 19	1	1	2	0	3	1	4	1
1	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
2	MICAELA	1	1	2	2	3	1	4	1
3	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
4	MICAELA	1	1	2	2	3	2	4	1
5	MICAELA	1	1	2	1	3	2	4	1
6	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
7	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
8	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
9	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1
10	MICAELA	1	1	2	1	3	1	4	1

Tabla 3 A. Promedios de números de brotes de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación.

Medio de cultivo	UPSE 78	UPSE 19	MICAELA
MC1	0.8	0.8	1
MC2	1	0.4	1.2
MC3	1	0.9	1.2
MC4	1	0.6	1

Tabla 4 A. Longitud de brotes de los materiales genéticos UPSE 78, UPSE 19 Y MICAELA de los días de evaluación 6, 13, 19, y 26 en milímetro (datos transformados a Log (x+1)).

Rep.	Genotipos	Día 6		Día 13		Día 19		Día 26	
		Med. Cultivo	Long (mm)						
1	UPSE 78	1	1.67	1	1.91	1	2.01	1	2.11
2	UPSE 78	1	1.97	1	2.21	1	2.31	1	2.36
3	UPSE 78	1	2.05	1	2.25	1	2.38	1	3.25
4	UPSE 78	1	1.96	1	2.01	1	2.27	1	3.22
5	UPSE 78	1	1.98	1	2.11	1	2.23	1	2.28
6	UPSE 78	1	1.28	1	1.61	1	1.89	1	1.97
7	UPSE 78	1	1.55	1	1.67	1	1.86	1	1.95
8	UPSE 78	1	1.21	1	1.47	1	1.81	1	1.87
9	UPSE 78	1	1.79	1	1.93	1	1.98	1	2.05
10	UPSE 78	1	2.01	1	2.29	1	2.33	1	2.86
1	UPSE 19	1	1.63	1	2.11	1	2.21	1	2.32
2	UPSE 19	1	1.74	1	2.13	1	2.15	1	2.15
3	UPSE 19	1	0.97	1	1.11	1	1.39	1	1.49
4	UPSE 19	1	0.98	1	1.33	1	1.41	1	1.69
5	UPSE 19	1	1.57	1	1.75	1	1.94	1	2.59
6	UPSE 19	1	1.62	1	2.31	1	2.58	1	3.27
7	UPSE 19	1	1.59	1	1.97	1	2.06	1	2.25
8	UPSE 19	1	0.97	1	1.15	1	1.51	1	1.76
9	UPSE 19	1	0.98	1	1.75	1	1.76	1	2.05
10	UPSE 19	1	0.98	1	1.21	1	1.41	1	1.77
1	MICAELA	1	1.89	1	2.01	1	2.05	1	2.11
2	MICAELA	1	1.51	1	1.63	1	1.75	1	1.91
3	MICAELA	1	1.32	1	1.47	1	1.84	1	2.14
4	MICAELA	1	2.11	1	2.67	1	2.85	1	3.05
5	MICAELA	1	2.13	1	2.64	1	2.75	1	3.01
6	MICAELA	1	2.13	1	2.69	1	2.69	1	2.75
7	MICAELA	1	1.95	1	2.65	1	2.65	1	2.74
8	MICAELA	1	1.89	1	2.56	1	2.56	1	2.66
9	MICAELA	1	1.49	1	1.62	1	1.63	1	1.68
10	MICAELA	1	1.21	1	1.38	1	1.49	1	1.62

1	UPSE 78	2	2.36	2	2.61	2	2.61	2	2.67
2	UPSE 78	2	2.37	2	2.8	2	3.01	2	3.32
3	UPSE 78	2	2.17	2	2.24	2	2.52	2	2.71
4	UPSE 78	2	2.01	2	2.11	2	2.18	2	2.28
5	UPSE 78	2	2.37	2	2.81	2	2.81	2	2.84
6	UPSE 78	2	1.01	2	1.11	2	1.41	2	1.58
7	UPSE 78	2	1.26	2	1.34	2	1.67	2	2.11
8	UPSE 78	2	1.31	2	1.37	2	1.41	2	1.56
9	UPSE 78	2	1.41	2	1.51	2	1.64	2	1.72
10	UPSE 78	2	1.28	2	1.37	2	1.45	2	1.59
1	UPSE 19	2	0.93	2	1.17	2	1.35	2	1.45
2	UPSE 19	2	0.91	2	1.15	2	1.41	2	1.49
3	UPSE 19	2	1.32	2	1.56	2	1.79	2	1.84
4	UPSE 19	2	1.28	2	1.44	2	1.52	2	1.66
5	UPSE 19	2	0.91	2	1.15	2	1.31	2	1.38
6	UPSE 19	2	1.27	2	1.45	2	1.59	2	1.72
7	UPSE 19	2	1.19	2	1.32	2	1.45	2	1.54
8	UPSE 19	2	0.93	2	1.16	2	1.34	2	1.42
9	UPSE 19	2	0.93	2	1.17	2	1.29	2	1.46
10	UPSE 19	2	0.96	2	1.15	2	1.27	2	1.01
1	MICAELA	2	2.28	2	2.58	2	2.58	2	2.62
2	MICAELA	2	2.11	2	2.26	2	2.29	2	2.35
3	MICAELA	2	1.97	2	2.17	2	2.21	2	2.25
4	MICAELA	2	2.21	2	2.92	2	2.95	2	2.95
5	MICAELA	2	2.19	2	2.58	2	2.58	2	2.63
6	MICAELA	2	1.97	2	2.19	2	2.22	2	2.22
7	MICAELA	2	1.57	2	1.71	2	1.75	2	1.81
8	MICAELA	2	1.53	2	1.64	2	1.65	2	1.65
9	MICAELA	2	1.34	2	1.48	2	1.52	2	1.55
10	MICAELA	2	1.27	2	1.38	2	1.49	2	1.54
1	UPSE 78	3	1.01	3	1.15	3	1.22	3	1.37
2	UPSE 78	3	1.08	3	1.18	3	1.29	3	1.37
3	UPSE 78	3	1.03	3	1.15	3	1.23	3	1.28
4	UPSE 78	3	1.46	3	1.55	3	1.74	3	1.91
5	UPSE 78	3	1.01	3	1.14	3	1.19	3	1.29
6	UPSE 78	3	1.43	3	1.63	3	1.89	3	2.11
7	UPSE 78	3	1.11	3	1.18	3	1.31	3	1.47
8	UPSE 78	3	1.14	3	1.19	3	1.25	3	1.34
9	UPSE 78	3	1.01	3	1.14	3	1.24	3	1.32
10	UPSE 78	3	1.04	3	1.21	3	1.28	3	1.71
1	UPSE 19	3	1.19	3	1.29	3	1.31	3	1.31
2	UPSE 19	3	1.17	3	1.24	3	1.29	3	1.38
3	UPSE 19	3	1.01	3	1.16	3	1.27	3	1.32
4	UPSE 19	3	1.17	3	1.19	3	1.25	3	1.31

5	UPSE 19	3	1.15	3	1.21	3	1.31	3	1.38
6	UPSE 19	3	1.49	3	1.56	3	1.57	3	1.57
7	UPSE 19	3	1.75	3	1.91	3	2.02	3	2.41
8	UPSE 19	3	1.59	3	1.71	3	1.83	3	1.96
9	UPSE 19	3	1.77	3	1.97	3	2.12	3	2.32
10	UPSE 19	3	1.08	3	1.21	3	1.28	3	1.33
1	MICAELA	3	1	3	1.19	3	1.24	3	1.32
2	MICAELA	3	1.01	3	1.28	3	1.29	3	1.36
3	MICAELA	3	1.27	3	1.35	3	1.42	3	1.45
4	MICAELA	3	1.21	3	1.29	3	1.33	3	1.37
5	MICAELA	3	1.81	3	2.03	3	2.11	3	2.15
6	MICAELA	3	1.18	3	1.22	3	1.25	3	1.31
7	MICAELA	3	1.21	3	1.38	3	1.42	3	1.51
8	MICAELA	3	1.55	3	1.87	3	1.92	3	1.97
9	MICAELA	3	1.82	3	2.22	3	2.28	3	2.33
10	MICAELA	3	1.81	3	2.21	3	2.24	3	2.31
1	UPSE 78	4	0.91	4	1.29	4	1.31	4	1.42
2	UPSE 78	4	0.94	4	1.31	4	1.34	4	1.41
3	UPSE 78	4	0.91	4	1.21	4	1.29	4	1.32
4	UPSE 78	4	0.96	4	1.18	4	1.25	4	1.37
5	UPSE 78	4	0.95	4	1.25	4	1.32	4	1.31
6	UPSE 78	4	0.93	4	1.24	4	1.3	4	1.39
7	UPSE 78	4	1.21	4	2.21	4	2.26	4	2.32
8	UPSE 78	4	1.21	4	2.11	4	2.15	4	2.21
9	UPSE 78	4	0.95	4	1.28	4	1.36	4	1.43
10	UPSE 78	4	0.96	4	1.25	4	1.34	4	1.42
1	UPSE 19	4	1.32	4	1.51	4	1.61	4	1.61
2	UPSE 19	4	1.21	4	1.3	4	1.38	4	1.53
3	UPSE 19	4	1.41	4	1.72	4	1.72	4	1.72
4	UPSE 19	4	1.11	4	1.31	4	1.39	4	1.54
5	UPSE 19	4	1.21	4	1.33	4	1.41	4	1.57
6	UPSE 19	4	1.51	4	1.75	4	1.75	4	1.75
7	UPSE 19	4	1.42	4	1.91	4	2.39	4	2.58
8	UPSE 19	4	1.51	4	1.82	4	1.85	4	1.85
9	UPSE 19	4	1.32	4	1.54	4	1.62	4	1.71
10	UPSE 19	4	1.31	4	1.43	4	1.46	4	1.48
1	MICAELA	4	1.27	4	1.47	4	1.52	4	1.58
2	MICAELA	4	1.21	4	1.31	4	1.38	4	1.47
3	MICAELA	4	1.45	4	1.67	4	1.71	4	1.75
4	MICAELA	4	1.24	4	1.32	4	1.35	4	1.43
5	MICAELA	4	1.68	4	1.82	4	1.91	4	1.95
6	MICAELA	4	1.73	4	1.94	4	2.01	4	2.09
7	MICAELA	4	1.24	4	1.33	4	1.39	4	1.49
8	MICAELA	4	1.91	4	2.52	4	2.61	4	2.67

9	MICAELA	4	1.9	4	2.54	4	2.62	4	2.71
10	MICAELA	4	1.87	4	2.15	4	2.21	4	2.28

Tabla 5 A. Promedios de longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum* en estudio a los 26 días de evaluación (datos transformados a Log (x+1)).

Medios de cultivo	UPSE 78	UPSE 19	MICAELA
MC1	2.39	2.13	2.37
MC2	2.24	1.50	2.16
MC3	1.52	1.63	1.71
MC4	1.56	1.73	1.94

Tabla 6 A. Medias de Factor A. Primera Evaluación a los 6 días, Variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

FACTOR A	Medias	n	E.E.
MICAELA	0.42	40	0.1 A
UPSE 78	0.37	40	0.1 B
UPSE 19	0.35	40	0.1 B

Tabla 7 A. Medias de Factor B. Primera evaluación a los 6 días. Variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

FACTOR B	Medias	n	E.E.
1	0.41	30	0.01 A
2	0.4	30	0.01 A
4	0.36	30	0.01 B
3	0.36	30	0.01 B

Tabla 8 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera evaluación a los 6 días, variable longitud de brotes (mm) de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.
1	2	0.45	10	0.02 A
1	1	0.44	10	0.02 A
2	1	0.44	10	0.02 A
2	2	0.43	10	0.02 A
1	4	0.4	10	0.02 A B
1	3	0.37	10	0.02 B C
3	4	0.37	10	0.02 B C
3	3	0.37	10	0.02 B C
3	1	0.36	10	0.02 B C D
2	3	0.33	10	0.02 C D E
3	2	0.31	10	0.02 D E
2	4	0.3	10	0.02 E

Tabla 9 A. Análisis de la Varianza de la Primera Evaluación a los 6 días de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos en estudio.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.29	11	0.03	9.46	<0.0001
FACTOR A	0.09	2	0.04	15.68	<0.0001
FACTOR B	0.7	3	0.02	8.53	<0.0001
FACTOR A*FACTOR B	0.13	6	0.02	7.86	<0.0001
Error	0.31	108	2. SE-03		
Total	0.6	119			

Tabla 10 A. Medias de Factor A. Segunda Evaluación a los 13 días, variable longitud de brotes de los materiales vegetales *S. lycopersicum*.

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0.46	40	0.01	A
2	0.41	40	0.01	B
3	0.39	40	0.01	B

Tabla 11 A. Medias de Factor B. Segunda Evaluación, variable longitud de brotes de los materiales vegetales *S. lycopersicum*.

FACTOR B	Medias	n	E.E.		
1	0.46	30	0.01	A	
2	0.43	30	0.01	A	B
4	0.41	30	0.01		B C
3	0.38	30	0.01		C

Tabla 12 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda evaluación a los 13 días, variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.				
1	1	0.49	10	0.02	A			
1	2	0.48	10	0.02	A	B		
2	1	0.47	10	0.02	A	B	C	
2	2	0.46	10	0.02	A	B	C	
1	4	0.44	10	0.02	A	B	C	D
3	1	0.42	10	0.02		B	C	D
1	3	0.41	10	0.02			C	D E
3	4	0.41	10	0.02			C	D E
3	3	0.39	10	0.02				D E
2	4	0.38	10	0.02				D E
3	2	0.36	10	0.02				E
2	3	0.35	10	0.02				E

Tabla 13 A. Análisis de la Varianza de la Segunda Evaluación a los 13 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.24	11	0.02	5.38	<0.0001
FACTOR A	0.08	2	0.04	10.27	0.0001
FACTOR B	0.09	3	0.03	7.66	0.0001
FACTOR A*FACTOR B	0.06	6	0.01	2.62	0.0207
Error	0.45	108	4.1E-03		
Total	0.69	119			

Tabla 14 A. Medias de Factor A. Tercera Evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de *S. lycopersicum*.

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0.47	40	0.01	A
2	0.43	40	0.01	B
3	0.41	40	0.01	B

Tabla 15 A. Medias de Factor B. Tercera evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
1	0.48	30	0.01	A		
2	0.45	30	0.01	A	B	
4	0.42	30	0.01		B	C
3	0.4	30	0.01			C

Tabla 16 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera evaluación, de la variable longitud de brotes de *S. lycopersicum*.

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.				
1	1	0.5	10	0.02	A			
2	1	0.49	10	0.02	A			
1	2	0.49	10	0.02	A			
2	2	0.48	10	0.02	A	B		
1	4	0.45	10	0.02	A	B	C	
3	1	0.45	10	0.02	A	B	C	
3	4	0.42	10	0.02		B	C	D
1	3	0.42	10	0.02			C	D
3	3	0.4	10	0.02			C	D
2	4	0.39	10	0.02			C	D
3	2	0.39	10	0.02				D
2	3	0.37	10	0.02				D

Tabla 17 A. Análisis de la Varianza de la Tercera Evaluación a los 19 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos de *S. lycopersicum*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.23	11	0.02	5.73	<0.0001
FACTOR A	0.06	2	0.03	7.47	<0.0001
FACTOR B	0.12	3	0.04	10.97	0.0009
FACTOR A*FACTOR B	0.06	6	0.01	2.53	0.0249
Error	0.4	108	3.7E-03		
Total	0.63	119			

Tabla 18 A. Medias de Factor A. Cuarta Evaluación, variable longitud de brotes

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0.48	40	0.01	A
2	0.46	40	0.01	A B
3	0.43	40	0.01	B

Tabla 19 A. Medias de Factor B. Cuarta Evaluación, variable longitud de brotes

FACTOR B	Medias	n	E.E.	
1	0.51	30	0.01	A
2	0.46	30	0.01	A B
4	0.43	30	0.01	B C
3	0.41	30	0.01	C

Tabla 20 A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta evaluación, variable longitud de brotes.

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
2	1	0.53	10	0.02	A
1	1	0.52	10	0.02	A
2	2	0.5	10	0.02	A
1	2	0.49	10	0.02	A B
3	1	0.49	10	0.02	A B
1	4	0.46	10	0.02	A B C
3	4	0.43	10	0.02	B C D
1	3	0.43	10	0.02	C D
3	3	0.41	10	0.02	C D
2	4	0.4	10	0.02	C D
2	3	0.4	10	0.02	D
3	2	0.4	10	0.02	D

Tabla 21 A. Análisis de la Varianza de la Cuarta Evaluación a los 26 días, de la variable longitud de brotes de los materiales genéticos *S. lycopersicum*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.27	11	0.02	5.95	<0.0001
FACTOR A	0.04	2	0.02	4.52	<0.0001
FACTOR B	0.17	3	0.06	13.65	0.013
FACTOR A*FACTOR B	0.06	6	0.01	2.57	0.023
Error	0.44	108	4.1E-03		
Total	0.71	119			

Tabla 22 A. Promedio de numero de hojas de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación (datos transformados a Raíz (x+0.5)).

Medios de cultivo	UPSE 78	UPSE 19	MICAELA
MC1	1.2	1.3	1.4
MC2	0.4	0.4	1.1
MC3	1	0.8	0.7

Tabla 23 A. Promedio de porcentaje de oxidación de los materiales genéticos en estudio a los 26 días de evaluación “Datos transformados a Raíz (((N. de explante / Total de explantes) *100) +0.5)”.

Medios de Cultivo	UPSE 78	UPSE 19	MICAELA
MC 1	8.97	6.36	10.02
MC2	8.40	7.78	9.51
MC3	8.40	7.11	9.51
MC4	6.36	6.36	8.40

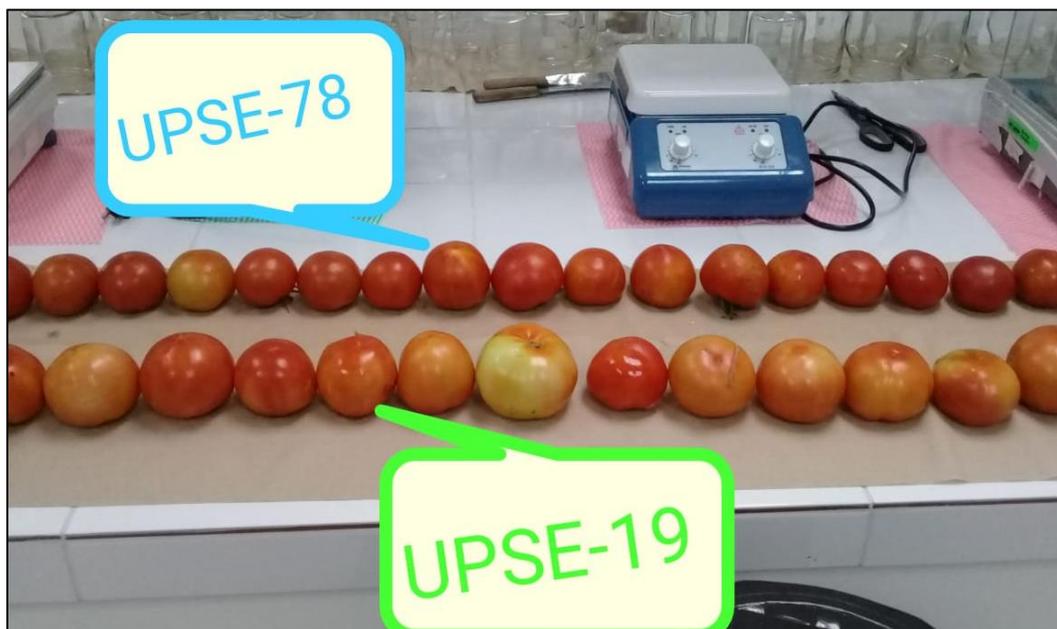


Figura 1 A. Selección de Materiales genéticos *S. lycopersicum* UPSE 78 y UPSE 19.

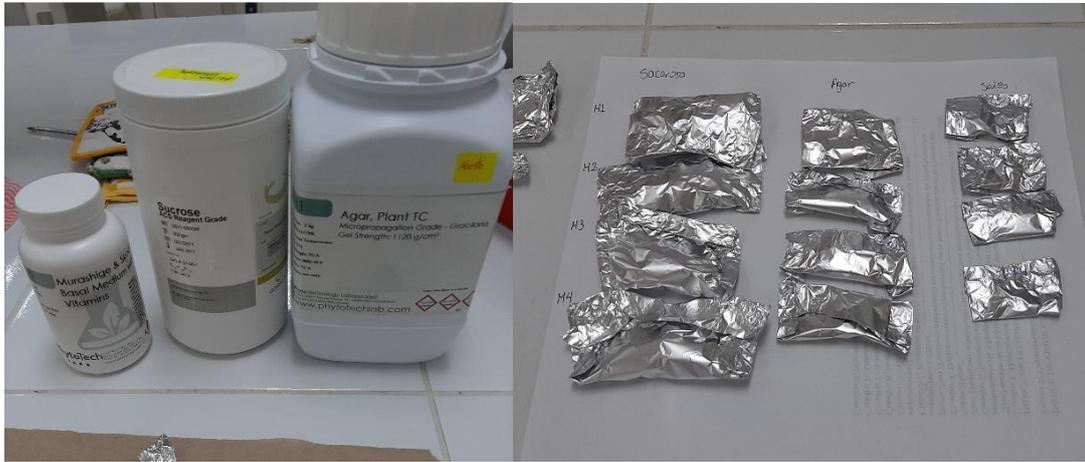


Figura 2 A. Materiales para la preparación de medios de cultivo Murashige y Skoog.



Figura 3 A. Cámara de flujo laminar estéril, con los equipos de trabajo se utilizaron.



Figura 4 A. Pre germinación de semillas en cajas Petri.



Figura 5 A. Desinfección y siembra en medio de cultivo MS1 de plántulas de *S. lycopersicum* germinadas en caja Petri.



Figura 6 A. Plántulas sembradas en medios MS1 sin dosis de BAP después de la pre germinación.



Figura 7 A. Selección de brotes de *S. lycopersicum* posteriormente al corte meristemático.



Figura 8 A. Corte de explantes de 1 cm y siembra en los medios de cultivo MS2 bajo las diferentes concentraciones de BAP.

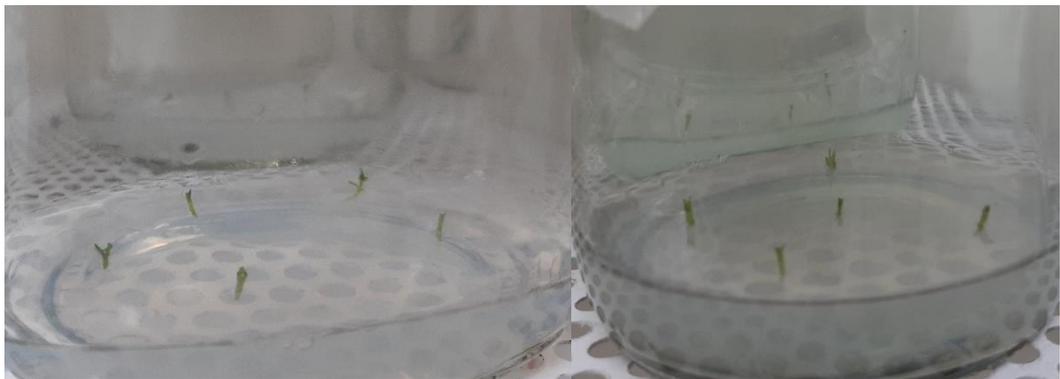


Figura 9 A. Establecimiento de explantes en medio de cultivo MS2 con dosis de hormona BAP.



Figura 10 A. Presencia de coloración café en explante (oxidación) del material genético *S. lycopersicum*.

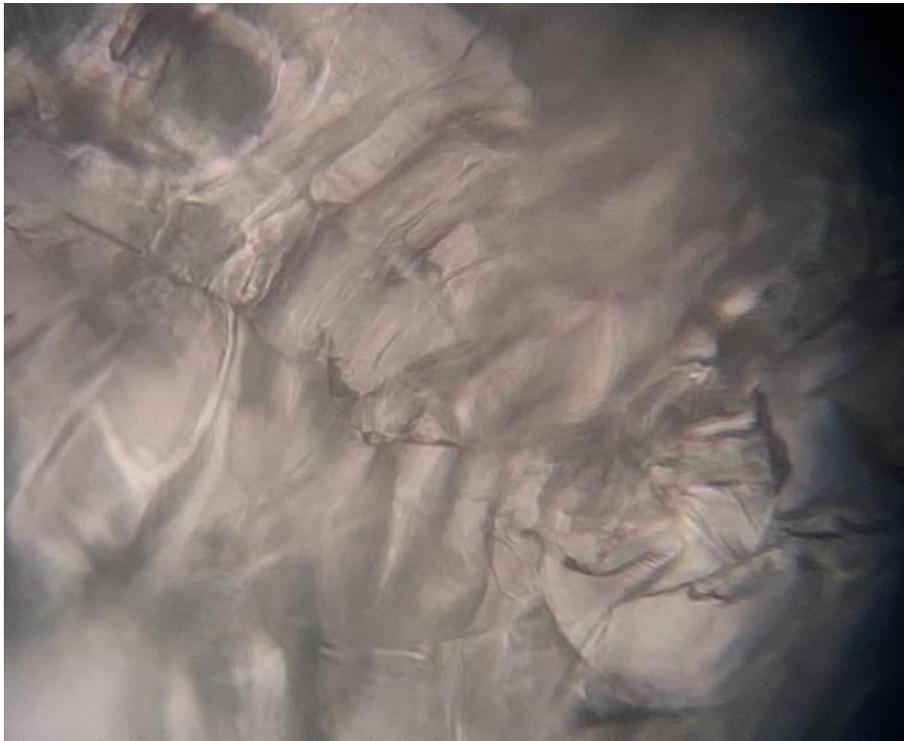


Figura 11 A. Muerte celular en los laterales del explante del material genético en estudio.



Figura 12 A. Producción de brotes meristemáticos de explantes del material genético UPSE 78.

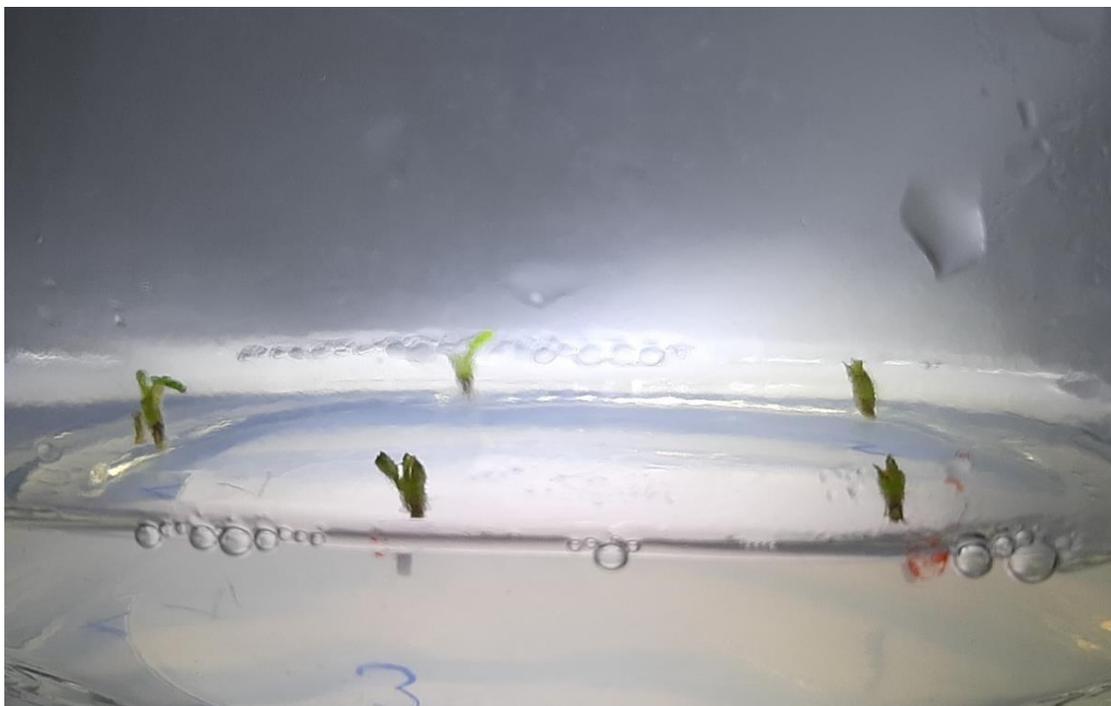


Figura 13 A. Explantes oxidados vivos con brotes meristemáticos de *S. lycopersicum*.