



Universidad Estatal Península de Santa Elena
Facultad de Ciencias Agrarias
Carrera Agropecuaria

**“RESPUESTA MORFOLÓGICA EN EXPLANTES DE
TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) BAJO LA
INFLUENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE CITOCININAS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: Renata Estefanía García Balón

La Libertad, 2019



Universidad Estatal Península de Santa Elena

Facultad de Ciencias Agrarias

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

**“RESPUESTA MORFOLÓGICA EN EXPLANTES DE TOMATE (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) BAJO LA INFLUENCIA DE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE CITOCININAS”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Autor: García Balón Renata Estefanía

Tutora: Ing. Lourdes Ortega M. MSc.

La Libertad, 2019

TRIBUNAL DE GRADO



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



Ing. Clotilde Andrade Varela MSc.
**DOCENTE REPRESENTANTE
DIRECTOR (E) DE CARRERA
INGENIERÍA AGROPECUARIA**



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



Ing. Lourdes Ortega Maldonado, MSc.
PROFESOR TUTOR



Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt.
SECRETARIO GENERAL

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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, por brindarme cada día una oportunidad más para seguir adelante, por guiarme hacia el camino correcto y enseñarme que de cada ocasión vivida se puede aprender algo más.

A mis padres, Nora Balón Pilligua y Luis Villao Palma, y hermano, que día tras día me dieron palabras de aliento, y se esforzaron junto a mí, siendo mis vibras positivas ante mi negatividad. A ellos, eternamente agradecida por la educación que me inculcaron, por los valores que aprendí, por ser mis pilares en esta travesía. A mi abuelito, que fue parte importante para que realice mis estudios profesionales y por darme risas, abrazos que jamás olvidaré.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, especialmente a la Facultad de Ciencias Agrarias, a sus docentes por otorgarme los conocimientos necesarios, experiencias para forjar mi perfil profesional.

A la Ing. Lourdes Ortega, como tutora de la investigación que impartió sus conocimientos haciendo posible las metas planteadas. A la Ing. Clotilde Andrade por haberme instruido en los análisis de resultados del presente estudio.

A compañeros de clases, amigos, especialmente a Jonathan Santana, por el apoyo brindado, por sus consejos, y fuerza de voluntad, muchas gracias.

DEDICATORIA

Este logro importante en mi vida va dedicado a mi madre y padre, por estar presente en una etapa más de mi vida, por no dejar que me dé por vencida, por tantos momentos compartidos durante estos años. A Dios por concederme el honor de tenerlos en mi vida, por mantenernos unidos y realizar cada pequeño objetivo de vida que nos hemos propuesto.

Renata García Balón

RESUMEN

La micropropagación en hortalizas, específicamente en tomate significa un avance para el sector agrícola en la provincia, razón por la que se planteó como objetivo evaluar el efecto de las concentraciones de citocininas en el cultivo *in vitro* de tomate. Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5x3, evaluando tres materiales genéticos, Variedad Cherry, Variedad Floradade e Híbrido Micaela, con 4 concentraciones de citocinina, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L y Testigo, respectivamente y sus medias fueron analizadas mediante la F valorada de acuerdo al diseño. La mejor respuesta morfológica se presentó en la Variedad Cherry seguida del Híbrido Micaela, dadas sus características genéticas alcanzaron mayores respuestas, no obstante la Variedad Floradade sólo obtuvo una óptima respuesta en el testigo. Se obtuvo la mejor respuesta morfológica en las concentraciones más bajas, 0.5 mg/L y 1 mg/L, incluyendo la dosis 0 mg/L (Testigo), estableciendo la relación a menor concentración de citocinina mayor es la respuesta de los meristemas apicales.

Palabras claves: *Lycopersicon esculentum*, meristemas apicales, 6-bencilaminopurina, morfología, genotipos.

ABSTRACT

The micropropagation in vegetables, specifically in tomato, means an advance for the agricultural sector in the province, reason for which the objective was to evaluate the effect of the concentrations of cytokinins in the *in vitro* culture of tomato. A completely randomized design with a 5x3 factorial arrangement was applied, evaluating three genetic materials, Cherry Variety, Floradade Variety and Hybrid Micaela, with 4 concentrations of cytokinin, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5mg/ L, 2 mg/L and Control, respectively and their means were analyzed by the F valued according to the design. The best morphological response was presented in the Cherry Variety followed by the Hybrid Micaela, given their genetic characteristics reached higher responses; however the Floradade Variety only obtained an optimal response in the control. The best morphological response was obtained at the lowest concentrations, 0.5 mg/L and 1 mg/L, including the 0 mg/L dose (Control), establishing the ratio at the lowest concentration of cytokinin higher is the response of the apical meristems.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, apical meristems, 6-benzylaminopurine, morphology, genotypes.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
Problema Científico.....	2
Objetivos.....	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1. Importancia del cultivo de tomate.....	4
1.1.1. Descripción morfológica.....	5
1.2. Crecimiento vegetativo	5
1.2.1. Tejido meristemático	6
1.3. Biotecnología Vegetal.....	6
1.4. Micropropagación o Cultivo <i>in vitro</i> de meristemas	7
1.4.1. Condiciones generales para el medio de cultivo	7
1.5. Respuesta morfogénica en cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	8
1.6. Etapas de la micropropagación	8
1.6.1. Etapa preparativa	9
1.6.2. Establecimiento del cultivo	9
1.6.3. Multiplicación.....	10
1.6.4. Enraizamiento y aclimatización.....	10
1.7. Métodos de Micropropagación	10
1.7.1. Embriogénesis Somática de Células.....	10
1.7.2. Organogénesis somática	12
1.8. Reguladores de crecimiento.....	12
1.8.1. Auxinas.....	12
1.8.2. Giberelinas.....	13
1.8.3. Citoquininas.....	13
1.9. Antecedentes del Cultivo <i>in vitro</i> de Tomate	14
1.9.1. Mejora genética de tomate	14
1.10. Factores que influyen en los procesos de cultivo <i>in vitro</i>	14
1.10.1. Agentes contaminantes.....	14
1.10.1.1. El medio de cultivo.....	15
1.10.1.2. El explante	15

1.10.1.3.	El área de trabajo	15
1.10.1.4.	El operador	16
1.10.2.	Oxidación fenólica.....	16
1.10.3.	Hiperhidratación	16
1.11.	Características agronómicas de materiales vegetales en estudio	17
1.11.1.	Variedad Cherry	17
1.11.2.	Variedad Floradade.....	17
1.11.3.	Híbrido Micaela HA 1903	17
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		18
2.1.	UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DEL EXPERIMENTO.....	18
2.1.1.	MATERIALES Y EQUIPOS	18
2.2.1.	Equipos	18
2.2.2.	Materiales	18
2.2.3.	Insumos.....	19
2.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS	20
2.3.1.	Tratamientos	20
2.3.2.	Diseño experimental	21
2.3.3.	Análisis estadístico	21
2.3.4.	Delineamiento Experimental	21
2.3.5.	Conversión logarítmica de datos	22
2.4.	MANEJO DEL EXPERIMENTO	22
2.4.1.	Limpieza de equipos	22
2.4.2.	Lavado y esterilización de los materiales de laboratorio.....	22
2.4.3.	Preparación de Medio Básico Murashige & Skoog.....	22
2.4.4.	Desinfección de semillas	24
2.4.5.	Siembra de material vegetal	24
2.4.6.	Preparación de Medio Murashige & Skoog con hormonas Citocininas.....	25
2.4.7.	Obtención de explantes.....	26
2.5.	Variables de estudio.....	26
2.5.1.	Velocidad de germinación de materiales vegetales.....	26
2.5.2.	Germinación	26
2.5.3.	Porcentaje de contaminación.....	26
2.5.4.	Respuesta Morfológica.....	26

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1. Velocidad de germinación	28
3.2. Porcentaje de germinación.....	28
3.3. Contaminación de explantes	31
3.4. Respuesta Morfológica	34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Condiciones climatológicas promedio de la provincia de Santa Elena.....	18
Tabla 2.- Detalle de materiales genéticos y medios de cultivos	20
Tabla 3.- Número total de tratamientos	20
Tabla 4.- Análisis estadístico.....	21
Tabla 5.- Concentración de vitaminas en medio Murashige & Skoog.....	23
Tabla 6.- Composición de sales del medio Murashige & Skoog (SIGMA M5524)	23
Tabla 7.- Especificaciones para la elaboración de un litro de Medio Murashige & Skoog	23
Tabla 8.- Concentración de citocininas en medios de cultivos Murashige & Skoog	25
Tabla 9.- Tratamientos definidos para el establecimiento de cultivo <i>in vitro</i>	25
Tabla 10.- Respuesta morfológica en el meristema apical de cultivos <i>in vitro</i> de tomate ..	27
Tabla 11.- Velocidad de germinación a los días 3, 6 y 9 de evaluación.....	28
Tabla 12.- Porcentaje de Germinación de Materiales vegetales.....	28
Tabla 13.- Altura de Material Genético evaluados en diferentes fechas	30
Tabla 14.- ANDEVA realizado a la variable de estudio Contaminación.....	31
Tabla 15.- ANDEVA de la variable Cambios morfológicos de los días evaluados	35
Tabla 16.- Medias de la Interacción del Factor A * Factor B, por la prueba de Duncan a los 30 días de evaluación.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de etapas de una célula.....	5
Figura 2.- Estructura de meristemo apical y axilar.....	6
Figura 3.- Grados de oxidación fenólica en cultivo <i>in vitro</i>	16
Figura 4.- Respuestas obtenidas en el establecimiento de Cultivo <i>in vitro</i> de tomate. A) Explante sin cambios morfológicos; B) Crecimiento longitudinal del explante; C) Desarrollo de hojas a partir del meristema apical; D) Presencia de yemas adventicias a los 12 días después de su establecimiento, y E) Presencia de raíces al cabo de 24 días de siembra en medio de cultivo.....	27
Figura 5.- Germinación de Materiales vegetales al día 1, 3, 6, 9, 12 y 15 después de la siembra.....	29
Figura 6.- Resultados del Efecto de las Concentraciones de hormona citocinina (Factor B) en los diferentes días de las evaluaciones en la Variable Contaminación.....	31
Figura 7.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona) en la Primera Evaluación, 11 días de la Variable Contaminación.....	33
Figura 8.- Número de unidades experimentales contaminadas.....	33
Figura 9.- Agente contaminante. Género <i>Aspergillus</i> , observado en lente de 40x.....	34
Figura 10.- Resultados del Factor A (Materiales vegetales) en los diferentes días de las evaluaciones en la Variable Respuesta morfológica.....	35
Figura 11.- Resultados del Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en las diferentes Evaluaciones de la Variable Respuesta morfológica.....	36
Figura 12.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Segunda Evaluación, 12 días de la Variable Respuesta morfológica.....	38
Figura 13.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Tercera Evaluación, 18 días de la Variable Respuesta morfológica.....	38
Figura 14.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Quinta Evaluación, 30 días de la Variable Respuesta morfológica.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 1A. Velocidad de germinación de semillas de Materiales genéticos a los 3, 6, 9 días

Tabla 2A. Matriz de germinación de materiales genéticos

Tabla 3A. Registro de Unidades experimentales, Variable Contaminación

Tabla 4A. Escala de Contaminación

Tabla 5A. Número de unidades experimentales descartadas por evaluación

Tabla 6A. Medias de Factor A, Primera evaluación, Variable contaminación

Tabla 7A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable contaminación

Tabla 8A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera Evaluación, Variable contaminación

Tabla 9A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable contaminación

Tabla 10A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, Variable contaminación

Tabla 11A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable contaminación

Tabla 12A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda Evaluación, Variable contaminación

Tabla 13A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable contaminación

Tabla 14A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, Variable contaminación

Tabla 15A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable contaminación

Tabla 16A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera Evaluación, Variable contaminación

Tabla 17A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable contaminación

Tabla 18A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, Variable contaminación

Tabla 19A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable contaminación

Tabla 20A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable contaminación

Tabla 21A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable contaminación

Tabla 22A. Medias de Factor A, Quinta evaluación, Variable contaminación

Tabla 23A. Medias de Factor B, Quinta evaluación, Variable contaminación

Tabla 24A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Quinta Evaluación, Variable contaminación

Tabla 25A. Análisis de varianza, Quinta evaluación, Variable contaminación

Tabla 26A. Registro de cambios morfológicos presentes en las unidades experimentales

Tabla 27A. Medias de Factor A, Primera evaluación, 6 días, Variable Respuesta morfológica

Tabla 28A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 29A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 30A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 31A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, 12 días, Variable Respuesta morfológica

Tabla 32A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 33A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 34A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 35A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, 18 días, Variable Respuesta morfológica

Tabla 36A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 37A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 38A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 39A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, 24 días, Variable Respuesta morfológica

Tabla 40A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 41A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 42A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 43A. Medias de Factor A, Quinta evaluación, 30 días, Variable Respuesta morfológica

Tabla 44A. Medias de Factor B, Quinta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 45A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Quinta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 46A. Análisis de varianza, Quinta evaluación, Variable Respuesta morfológica

Tabla 47A. Medias de Factor B, en Evaluaciones con significancia, Variable contaminación

Figura 1A. Respuesta morfológica de las Unidades Experimentales en base a las dosis establecidas en la Primera evaluación

Figura 2A. Respuesta morfológica de los materiales en estudio a los 12 días de evaluación

Figura 3A. Respuesta morfológica (Datos transformados a $\text{Log}(x+1)$) del Cultivo *in vitro* de acuerdo a las dosis en estudio

Figura 4A. Resultados de la Interacción Factor A * Factor B en la Segunda evaluación, 12 días de la variable Respuesta morfológica

Figura 5A. Respuesta morfológica (Transformadas a $\text{Log}(x+1)$) de los materiales genéticos en estudio en la Tercera evaluación

Figura 6A. Cambios morfológicos en base a las dosis de estudio, Tercera evaluación

Figura 7A. Limpieza de Cámara de Flujo laminar previo al establecimiento de cultivo

Figura 8A. Preparación de medio de cultivo

Figura 9A. Germinación del material genético Micaela, a los 6 días de evaluación

Figura 10A. Unidad experimental, variedad Cherry en fase B, elongación de explante

Figura 11A. Unidad experimental, variedad Cherry en fase D, presencia de yemas adventicias

Figura 12A. Unidad experimental, Testigo, Híbrido Micaela en fase D, presencia de yemas adventicias

Figura 13A. Unidad experimental, Testigo, Variedad Cherry en fase D, presencia de yemas adventicias

Figura 14A. Unidad experimental, Testigo, Variedad Floradade en fase D, presencia de yemas adventicias

Figura 15A. Contaminación fúngica de Unidad experimental, Híbrido Micaela

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las hortalizas de mayor importancia a nivel nacional e internacional, debido a su amplio consumo, área cosechada y al valor económico de la producción. Durante los últimos años, esta hortaliza ha incrementado su producción anual principalmente por el aumento en el rendimiento y en menor proporción por el incremento de la superficie cultivada. Además, esta especie tiene cada vez mayor relevancia nutricional por ser fuente de sustancias antioxidantes y su gran importancia en la dieta familiar (Pullido, 2000).

El cultivo de tomate, a nivel de producción mundial aporta con el 40 % de la producción mundial de hortalizas, mientras que el 60% restante está liderado por otras hortalizas como sandía, lechuga y cebolla; en el comercio mundial el tomate ocupa 1.9 %, seguido por el pimiento 9.6 %, legumbres secas con 9.3 %, ajo y cebollas el 7.9 %, papa 7.6 % y vegetales congelados 6.2 % (Ferrato & Mondido 2008).

Datos otorgados por Barreiro (2015) a través del SNI manifiesta que en los años 2010 a 2013 a nivel nacional se produjeron entre 2000 a 3500 hectáreas de tomate, a su vez la FAO en el 2012, afirman que a nivel nacional se produjo 63.955 toneladas. Tanto en la provincia del Guayas como en Santa Elena, se ha desarrollado el cultivo de tomate, convirtiéndose en la principal fuente de ingresos económicos de muchos agricultores. Según datos de ESPAC en 2013, la provincia de Santa Elena produce 1.399 toneladas métricas anuales, sin embargo existen problemas que afectan a la producción.

Para la propagación y mejoramiento de especies vegetales, entre ellas el tomate, se han aplicado técnicas como la biotecnología, cuya finalidad es producir plantas que preserven una o más características fenotípicas y genotípicas para el beneficio de la agricultura. Enfocando la biotecnología en el área agrícola, se obtienen alimentos de alta calidad, favoreciendo al ser humano, y se conservan semillas con resistencia a enfermedades, y adaptadas a las condiciones climáticas de los diversos sectores del Ecuador.

Mediante la propagación *in vitro* de las plantas, se aplica el concepto de conservación de especies, y la posibilidad de crear nuevos materiales genéticos, además es de suma

importancia a nivel económico, significando una vía de inversión muy justificable en función del producto obtenido.

Las variedades comerciales cultivadas en la provincia, en su mayoría son importadas, provocando que ocasionalmente el tomate no se adapte a las condiciones semidesérticas de la provincia (Benavides, 2015).

La presencia de plagas y enfermedades en la agricultura Santaelenense conforma otra de las adversidades que debe enfrentar el agricultor; como se explicó anteriormente el material distribuido en el sector no está basado en las condiciones climáticas de la provincia, dificultando la producción del cultivo.

La aplicación de técnicas como la micropropagación conlleva a la producción de plantas tolerantes a estreses y/o enfermedades, facilitando al productor el material idóneo para un buen rendimiento.

El presente estudio forma parte del proyecto “Estudio y selección de híbridos y variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivares introducidos en la Península de Santa Elena” financiado por la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Problema Científico

El material vegetal distribuido en la provincia de Santa Elena no se rige bajo las condiciones climáticas de la zona, mediante esta técnica *in vitro* se inicia un proceso de propagación para futuros genotipos pertenecientes a las características edafoclimáticas de la provincia, estableciendo la siguiente interrogante:

¿Cuál será la respuesta morfológica que presenten los explantes en el cultivo *in vitro* de tomate sometido a diferentes concentraciones de hormona?

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de citocininas en el cultivo *in vitro* de tomate.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de citocinina que induzca la mejor respuesta morfológica de los explantes.
- Identificar a los genotipos *in vitro* de tomate que presenten mejor desarrollo vegetativo.
- Definir protocolos de propagación *in vitro* para plántulas de tomate.

Hipótesis

Ho: Altas concentraciones de citocinina en el medio de cultivo generan mayor respuesta morfológica en cultivos *in vitro* de tomate.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Importancia del cultivo de tomate

De acuerdo con Srinivasan (2010), el tomate es una especie proveniente de América, concretamente de las regiones montañosas de Perú, Ecuador y Chile, se ha adaptado a climas tropicales de alta humedad. El fruto de esta especie se caracteriza por ser muy apetecible gracias a su contenido en antioxidantes, vitaminas, licopeno, fósforo, calcio y potasio, importantes en la alimentación del ser humano.

Según la clasificación taxonómica el tomate (*Lycopersicon esculentum*), pertenece a la familia Solanáceas, del género Solanum, en la actualidad es un cultivo de gran importancia económica y ampliamente usado para la investigación por las ciencias fisiológicas, bioquímica y de genética molecular (Cuesta, 2007).

Fernqvist (2014), expresa que el tomate es una de las hortalizas con mayor comercialización a nivel mundial. Esta especie es sembrada de distintas formas como en invernaderos, túneles de plásticos o directamente al campo. Una de las principales maneras de consumirlo es en ensaladas o mediante alimentos procesados.

Según Ramírez (2013), en el año 2002 la producción nacional fue de 87 457 000 kg con un rendimiento de 21 264 kg/ha, destacando la provincias más productivas como Guayas, con un rendimiento de 26 855 kg/ha, Manabí con 16 700 kg/ha de rendimiento, Carchi con un rendimiento de 17 698 kg/ha, entre otras. Gran parte de la producción de esta especie se realiza a campo abierto.

De acuerdo con Marín (2017), esta especie necesita una temperatura entre 18 °C y 24 °C para un correcto desarrollo, la fructificación se ve afectada por la influencia de altas temperaturas. La humedad relativa ideal varía de 60% a 80%, favoreciendo a la polinización. Posee una capacidad de adaptación a climas templados con altitudes entre 1000 y 2000 m.s.m.

Esta hortaliza tiene muchos beneficios en el ámbito de salud para las personas, convirtiéndose en uno de los cultivos más estudiados por la biotecnología y la ingeniería genética. Mundialmente hay alrededor de 10000 variedades de tomate, siendo algunas

variedades propagadas de forma *in vitro* y siendo escogidas en base a parámetros comerciales como calidad, cualidades morfológicas únicas que presentan (Gersberg *et al*, 2015).

1.1.1. Descripción morfológica

Es una planta caracterizada por su apariencia arbustiva, posee raíz principal con raíces secundarias, y presencia de pelos absorbentes. El tallo de esta herbácea tiene un grosor que varía entre 2 a 4 centímetros de diámetro, desarrollando hojas, ramificaciones y posteriormente las inflorescencias.

El área foliar del tomate está constituido por 6 a 7 folíolos de forma lobular y cubiertos por tricomas. Las inflorescencias son compuestas por 3 a 10 flores, donde la primera flor tiene lugar en el meristema apical, seguido del resto de flores ubicadas debajo de la primera.

1.2. Crecimiento vegetativo

Según Courtis (2014), el incremento respecto a volumen y tamaño de las células es conocido como crecimiento, anexo a esto las células hijas gracias a la expansión celular son capaces de obtener el tamaño de la célula madre. El crecimiento vegetativo está conformado por división celular o también denominada mitosis, la expansión de las células hijas, y la posterior diferenciación celular donde ocurre la especialización de las células, que provocan efectos irreversibles (Figura 1).



Figura 1.- Esquema de etapas de una célula

La expansión celular es influenciada por factores como el tipo de célula inmiscuida, la edad fisiológica, los efectos provocados por fitohormonas, así como también las condiciones de horas luz y la disposición de agua (Courtis, 2014).

Existen dos procesos distintos que incluyen el aumento de células vegetales, éstos son la división celular y la elongación. La división celular da como resultado el aumento del número de células mientras que en la elongación celular se obtiene incremento tamaño celular.

1.2.1. Tejido meristemático

Courtis (2014), explica que desde la división celular, la planta entra en un continuo estado de producción de células nuevas, conforme el embrión crece el proceso de multiplicación celular se ubica en los meristemas. Los meristemas son agrupaciones de células con dimensiones iguales, se caracterizan por su autoregeneración, con paredes finas, núcleos indefinidamente grandes, ausencia de vacuolas o relativamente pequeñas.

Los meristemas pueden ser clasificados de acuerdo a la posición en la planta, siendo éstos apicales y axilares. Los meristemas apicales se distinguen de los axilares por encontrarse en los ápices de los tallos y raíces mientras que los axilares están ubicados en los lados del órgano en la que estén situados (Figura 2).

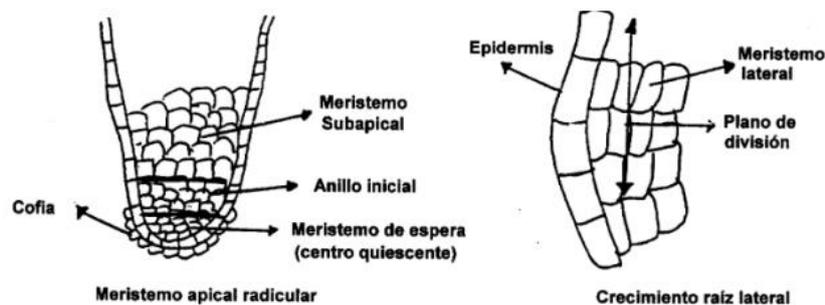


Figura 2.- Estructura de meristemo apical y axilar

1.3. Biotecnología Vegetal

Biotecnología es la técnica que tiene como objetivo dar origen o modificar un producto con fines prácticos a partir de organismos o parte del mismo, estos pueden ser virus, bacterias, plantas y animales, aportando con descubrimientos científicos en áreas como medicina, agricultura, etc. (Cedres & Sharry, 2016).

Otro de los objetivos de la Biotecnología es la resolución de problemas respecto a la producción agrícola, como Fito mejoramiento, resistencia a plagas, enfermedades, factores climáticos, aumentando los rendimientos de los cultivos, además crear materiales genéticos libre de patógenos a bajo costo, otorgando al área agrícola más

diversidad vegetal. Además mediante esta técnica es posible acelerar los proyectos pertenecientes al mejoramiento vegetal, favoreciendo incluso en la dieta alimenticia del sector pecuario.

Una de las biotécnicas ampliamente usada en el mundo vegetal, es el Cultivo de tejidos o también denominado Cultivo *in vitro* de plantas, cuya finalidad es la regeneración de plantas mediante la obtención de explantes, como meristemas apicales, hojas, frutos, entre otros, sembrados en medios de cultivos, proporcionando los nutrientes y condiciones óptimas para su desarrollo. Esta técnica de cultivo se realiza en base a dos fundamentos esenciales, la asepsia y el control de factores que influyen en el desarrollo.

1.4. Micropropagación o Cultivo *in vitro* de meristemas

La micropropagación es una técnica que consiste en la utilización de tejidos, partes de la planta que se denominan *explantes*, las mismas que en condiciones asépticas y controladas de laboratorio, darán paso a la propagación de plantas. Las células han sido objeto de estudio y poseen la capacidad de dar origen a un organismo o nueva planta, por su capacidad de Totipotencialidad. Las células que son más óptimas y conservan dicha capacidad son aquellas que están menos diferenciadas en una función específica, pueden ser meristemáticas o también células adultas que mantienen el núcleo (González A. , 2016).

Para obtener nuevo material genético se debe realizar el cultivo de meristemas, tejidos vivos, en condiciones apropiadas de fitohormonas, de este modo se origina una nueva planta que conserva las características genotípicas de la planta madre.

1.4.1. Condiciones generales para el medio de cultivo

Para el correcto desarrollo de los explantes es necesario regirse a condiciones esenciales que aseguren la obtención de resultados. Casado et al., (2012) manifiesta que la disposición de los nutrientes en el medio en concentraciones ideales constituye una de las principales condiciones básicas siendo asimilables para el organismo o parte del organismo que se propaga. La consistencia apropiada se obtiene por acción del agar, que actúa como solidificante, convirtiéndose en uno de los medios más usados. La disponibilidad de oxígeno significa un factor esencial para el desarrollo del meristemo, caso contrario provocará la muerte del explante.

El pH incide directamente en la disponibilidad de los nutrientes proporcionados por el medio a la planta, debido a esto es necesario ajustar el pH del medio, debe estar en un rango entre 5,6 a 5,8, para ajustarlo se requiere el uso de ClH o NaOH 1N (Villareal, 2015).

1.5. Respuesta morfogénica en cultivo *in vitro* de plantas

La aplicación de alternativas biotecnológicas significa la obtención de resultados variados como micropropagación, hibridaciones, variaciones genéticas, entre otros, razón por el que se requieren de explantes para su respectiva regeneración. Existen dos vías de regeneración que implican el efecto de las fitohormonas, siendo éstas la organogénesis que da como resultado la formación de brotes y la embriogénesis somática (Sánchez, 2017).

La respuesta morfológica depende del tipo de explante, debe ser procedente de una planta madre o donadora de excelentes condiciones botánicas y morfológicas, que implique óptimos resultados en la micropropagación. Otro factor esencial es el balance existente entre los componentes del medio de cultivo, éstos deben tener las concentraciones precisas de modo que una carencia o exceso de compuestos no afecte a la respuesta del cultivo *in vitro*.

El factor ambiental incluso en condiciones controladas influye abiertamente en los cambios morfológicos del explante, es necesario emplear las horas luz adecuada, temperatura, humedad relativa desde la fase de explante y por consecuente en la obtención de brotes, regeneración y adaptación.

1.6. Etapas de la micropropagación

Según Olmos *et al*, (2010) la técnica de micropropagación comprende las siguientes etapas nombradas a continuación:

1. Etapa preparativa
2. Establecimiento del cultivo
3. Multiplicación y elongación de brotes
4. Enraizamiento *in vitro*
5. Aclimatación del material obtenido *in vitro*

Para el establecimiento del cultivo es necesario seleccionar y hacer la preparación del material vegetativo, teniendo en cuenta factores determinantes como la edad ontogenética, la edad fisiológica del meristemo, el tamaño de explante es de vital importancia y el área en que se encuentra la planta madre.

Se establece el tipo de meristemo o yema que se utilizará para la micropropagación *in vitro*, cuando ya esté seleccionada la planta madre con las características fenotípicas y sobre todo genotípicamente.

1.6.1. Etapa preparativa

Se clasifica el material de acuerdo a la fase fisiológica y se opta por escoger el más adecuado para la propagación.

Existen factores determinantes sobre la calidad del meristemo como el órgano que se extraerá, la edad, generalmente de los órganos jóvenes se obtienen mejores respuestas, el tamaño y la condición sanitaria en la que se encuentra la planta madre (Olmos *et al*, 2010).

1.6.2. Establecimiento del cultivo

Lo esencial de esta etapa, requiere que se defina los cultivos viables, de buena producción y calidad, mediante pasos como el aislamiento y la esterilización. Partes de la planta como yemas axilares y apicales, son considerados para esta técnica gracias a la capacidad regenerativa que poseen.

A los pocos días de establecer el cultivo *in vitro*, es necesario observar la presencia de agentes contaminantes, aquellos tubos que presenten contaminación se descartan y, las unidades libres de agentes patógenos se deben evaluar periódicamente (Lucas, 2009).

La esterilización de los explantes es necesaria, empezando por la desinfección con solución de lejía al 50% durante un tiempo determinado seguido de soluciones de agua destilada estéril, eliminando así cualquier tipo de patógeno que afecte a la micropropagación.

1.6.3. Multiplicación

Mantener la producción de brotes y/o aumentarlos, es uno de los objetivos fundamentales de la segunda etapa. En el transcurso de este periodo se ejecutan dos modos de regeneración, la embriogénesis, y la organogénesis.

1.6.4. Enraizamiento y aclimatización

Durante esta etapa se obtiene el crecimiento de raíces adventicias, inducidas por los diversos reguladores de crecimiento, en modo *in vitro*. Para el desarrollo adecuado de los explantes se los ubica en medios de cultivos dependiendo de las necesidades y del tipo de explante, cabe recalcar que el uso de medios de agar significa el desarrollo de callos en la parte basal del explante.

El enraizamiento *ex vitro* da paso a que la planta desarrolle su sistema radicular y a la vez se vaya adaptando, minimizando el crecimiento de callos. Las instalaciones y condiciones permiten el desarrollo de la nueva planta de forma progresiva.

1.7. Métodos de Micropropagación

Existen diversas formas de propagación para obtener una producción mayor de una determinada especie, pueden ser por brotes, yemas axilares, embriones somáticos, etc., los mismos que tienen el mismo objetivo de maximizar la especie.

1.7.1. Embriogénesis Somática de Células

Se conoce como embriogénesis somática a la obtención de un embrión partiendo de una célula, o grupo de ellas sin participación alguna de gametos sexuales. Esta técnica aumentará con la presencia de protocolos debidamente establecidos obteniendo producciones de embriones somáticos *in vitro*, provenientes de procesos de desdiferenciación (Rodríguez *et al*, 2015).

La producción de embriones somáticos está preestablecida genéticamente, por dicha razón existe variación en la respuesta de los cultivos *in vitro* dependiendo de la especie (Viñas & Jiménez, 2011).

Fases de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática está constituida por cinco fases esenciales para su desarrollo, nombradas a continuación, formación de los embriones somáticos, desarrollo de los embriones somáticos, proliferación de los embriones somáticos, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones somáticos en plantas.

a. Formación de los embriones somáticos

Se induce la formación de células embriogénicas mediante el uso de la auxina, provocando una división celular, originando callos en crecimiento desordenado. Sin embargo cuando las células somáticas manifiestan su capacidad embriogénica y son cultivadas en medio de cultivo adecuado, éstas se diferencian y dan paso a la siguiente fase (Rodríguez, 2013).

b. Desarrollo de los embriones somáticos

En esta fase las hormonas impiden el desarrollo de los agregados embriogénicos a embriones somáticos.

c. Proliferación de los embriones somáticos

En este tipo de técnica es posible la proliferación indefinida de diversas plantas mediante la propagación masiva y transferencia genética. Esta capacidad es posible gracias a la acción de la auxina (Rodríguez, 2013).

d. Maduración de los embriones somáticos

El mismo autor manifiesta que la maduración se refiere al crecimiento de la célula y por ende el desarrollo del embrión, adquiriendo sustancias de reserva esencial para su proceso de madurez. Como se planteó anteriormente el medio de cultivo es un paso vital para el óptimo crecimiento de los embriones, razón por la cual los carbohidratos, nitrógeno son otorgados mediante las concentraciones ideales al embrión.

e. Germinación y conversión de los embriones somáticos

La germinación es la etapa donde el embrión desarrolla hipocótilo con sistemas de raíces, mismas que nutrirán el embrión durante su etapa de crecimiento. La regeneración

a partir de los embriones en la mayoría de las especies es baja, por las estructuras defectuosas presentes en el desarrollo del embrión somático.

1.7.2. Organogénesis somática

Se entiende como organogénesis somática a la formación de un primordio partiendo de un meristema y posteriormente su crecimiento en brotes, los mismos que son sometidos a enraizamiento. Estos brotes pueden originarse de forma directa a partir del explante también conocido como organogénesis directa o de manera indirecta en base a callos (Ramírez, 2012).

La manipulación del medio de cultivo y las condiciones ambientales provocan que las células manifiesten sus capacidades de desarrollo o también totipotencialidad, además de los siguientes factores (Villareal, 2015).

a. Características de la planta madre y el explante

- Genotipo
- Edad
- Sanidad
- Condición fisiológica

b. Medio de cultivo

- Elección del medio de cultivo
- pH
- Fuentes de N
- Reguladores de crecimiento

1.8. Reguladores de crecimiento

El crecimiento y desarrollo de las plantas se debe en gran parte a la influencia de factores externos o internos, siendo un ejemplo claro las hormonas.

1.8.1. Auxinas

Fue la primera hormona vegetal en ser descubierta, desempeña diversas funciones vitales en el desarrollo de las plantas e influye en la mayoría de los ciclos vitales, destacando su papel como reguladora de velocidad de la elongación celular a concentraciones altas de auxina, promueve el crecimiento de raíces adyacentes y

adventicias, retrasa la caída de las hojas, flores y/o frutos (Taiz & Zeiger, 2006). Los niveles ideales de auxinas representan una base fundamental para el correcto crecimiento fisiológico de la planta.

Darquea, (2013) manifiesta que las Auxinas o Ácido 3 indol acético, son producidas por los meristemos apicales, se caracterizan por emigrar de los brotes a las raíces; esta hormona interviene en diversos procesos como la elongación celular, forma raíces adventicias, es un estimulante en el desarrollo de los frutos, división celular, floración, maduración de los frutos, además actúa como un inhibidor en la caída de los frutos y el crecimiento de las yemas laterales del tallo.

Entre los grupos más importantes de auxina tenemos el Ácido indol-acético (AIA), Ácido naftil-acético (ANA), Ácido indol-butírico (AIB), 2,4-D y 2,4,5-T (García, 2011).

1.8.2. Giberelinas

García, (2011) manifiesta que la giberelina actúa como una hormona de crecimiento y se origina en las partes florales, foliolos nuevos, en las raíces y tallos, específicamente en los ápices. Una de las funciones de esta hormona coincide con las auxinas, como es el crecimiento en los tallos, intervienen en la latencia de las semillas, favoreciendo en la germinación de las mismas, induce la brotación de las yemas.

De acuerdo con Taiz & Zeiger, (2006) las giberelinas corresponden a una gran gama de compuestos, a diferencia de las auxinas éstas tienen mayor relevancia por su constitución química que por la función biológica en la planta. Esta hormona tiene una amplia variedad de efectos fisiológicos desde el control respecto a la germinación de la semilla, debilitando el endospermo que cubre al embrión, la transición de estadio joven a la etapa de madurez, conformada por la inducción floral, establecimiento de sexo, además es promotor del crecimiento en los entrenudos en plantas herbáceas.

1.8.3. Citoquininas

Según Jordán & Casaretto, (2006) las citocininas son hormonas derivadas de la base adenina más una cadena lateral unida al grupo Amino 6, diferenciándose por su origen, ya sean naturales, generadas por las plantas, por ejemplo la zeatina, trans-zeatina, y artificiales, originadas por el hombre, como BAP, Kinetina o Tidiazurón (TDZ).

Las citoquininas se sintetizan en la parte de la raíz, desempeñan funciones desde la regulación de la división celular, hasta la formación de órganos y brotes. Esta hormona comparte funciones con la Giberelinas, ya que ayuda a la germinación de las semillas (Darquea, 2013).

Taiz & Zeiger, (2006) manifiestan que las citoquininas están presentes como moléculas libres e influyen abiertamente en algunas etapas fisiológicas y de desarrollo como la senescencia de hojas, a traslocación de nutrientes, la formación de meristemas apicales, quienes conforman el principal sitio de síntesis de esta hormona; al mismo tiempo recalcan la importancia de la relación auxina/citoquinina, ya que el exceso de concentraciones promueve la presencia de raíces y las bajas concentraciones ocasionan callos.

1.9. Antecedentes del Cultivo *in vitro* de Tomate

En las investigaciones realizadas se ha usado medio MS para el cultivo de tejidos. La formación de callos se aplica también reguladores de crecimiento, con el fin de desarrollar el explante. La relación citoquinina : auxina parece ser más importante para el control de la formación del brote de tomate que de la hormona específica utilizada.

1.9.1. Mejora genética de tomate

El redescubrimiento de las Leyes de Mendel representó un gran avance biotecnológico, dando paso a la aplicación de diversas ciencias implicadas con la tecnología del ADN, permitiendo la modificación de especies para el beneficio de la población. Dentro de las modificaciones realizadas a esta hortaliza, se encuentra la resistencia a plagas y enfermedades, el mejoramiento del fruto respecto a su calidad, aumento de la capacidad nutritiva (Maestu, 2018).

1.10. Factores que influyen en los procesos de cultivo *in vitro*

1.10.1. Agentes contaminantes

De acuerdo con Hernández & González, (2010) las principales fuentes de contaminación son los hongos, bacterias, provocando grandes pérdidas en el cultivo *in vitro* establecido. Las bacterias son uno de los patógenos más frecuentes en causar contaminaciones, ya que no son fáciles de erradicar, resistentes a la esterilización

superficial, éstas pueden localizarse en los materiales para el cultivo *in vitro*, en los explantes, tanto interna como externamente.

La presencia de hongos en los cultivos *in vitro*, se ha convertido en una causa común de contaminación, siendo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Fusarium*, los más frecuentes en los experimentos, ocasionando la pérdida de semillas, explantes, plantas, etc.

1.10.1.1. El medio de cultivo

Una de las principales causas de contaminación es la presencia de microorganismos como anteriormente se ha mencionado, no obstante estas especies son resistentes incluso a temperaturas mayores comprendidas entre 100 a 120 °C, recomendando que una vez servido el medio debe almacenarse durante unos días para verificar la presencia o no de agentes contaminantes (Morales, 2016).

1.10.1.2. El explante

Según Morales (2016), el explante al provenir de una planta madre, puede llevar consigo microorganismos que es posible erradicar con soluciones de desinfección, sin embargo cuando éstos están localizados internamente son difíciles de eliminar, siendo inhibidos con componentes fúngicos o bactericidas.

1.10.1.3. El área de trabajo

Otra de las formas de propagación de los contaminantes en biotecnología, incluye el área de trabajo, debido a que existen partículas, esporas de organismos patógenos que se localizan en las corrientes de aire, éstas son impulsadas por los acondicionadores de aire, accediendo a los cultivos *in vitro*.

Una vía de control para la contaminación a nivel del área de trabajo, es la erradicación de los materiales vegetales en mal estado, aplicar desinfecciones adecuadas con productos de alta efectividad. El establecimiento de los cultivos *in vitro* deben realizarse en cámara de flujo laminar, con materiales e instrumentos correctamente esterilizados (Pincay, 2017).

1.10.1.4. El operador

La falta de asepsia por parte del operador se convierte en una de las causas de contaminación en el cultivo *in vitro*. Dentro de las condiciones asépticas del operador están el uso de mandil o bata, mascarillas, cofia, guantes, y lavado de manos con jabón previo al trabajo con el cultivo, rosearse las manos con alcohol.

1.10.2. Oxidación fenólica

Según Hernández & González, (2010) es común hablar de oscurecimiento de tejidos, cuando se establece un cultivo *in vitro*, esto tiene lugar debido a la acción de las enzimas como tirosinasas y polifenoloxidasas que son liberadas cuando existen heridas en el tejido (Figura 3). Dichas enzimas son oxidadas a quinonas, impidiendo el correcto crecimiento del explante.



Figura 3.- Grados de oxidación fenólica en cultivo *in vitro*

Azofelia (2009) citado por Sigarroa & García,(2011) explica que una de las causas de oxidación en micropropagación es producto de los desinfectantes aplicados durante la esterilización de los explantes, las incisiones al momento de la extracción del meristemo también ocasiona esta afección al cultivo *in vitro*.

1.10.3. Hiperhidratación

El exceso de agua en los explantes de cultivo *in vitro*, baja intensidad luminosa causa Hiperhidratación, generando un sin número de efectos respecto a las características morfológicas, disminución del sistema vascular en el tejido, etc. El potencial osmótico y la cantidad de agar que se ubique en el medio de cultivo causan generalmente este fenómeno perjudicial para los explantes (López *et al*, 2016).

La hiperhidratación en procesos como germinación *in vitro* genera debilidad en las hojas con apariencia cristalina, este órgano es el más afectado al dar lugar a un mesófilo desordenado con amplios espacios celulares. Aquellas plantas que sufren este fenómeno perecen al no realizar correctamente procesos vitales como la fotosíntesis y la respiración.

1.11. Características agronómicas de materiales vegetales en estudio

1.11.1. Variedad Cherry

Los tomates cherry se diferencia principalmente por el tamaño de sus frutos, de 1 a 3 cm de diámetro, excelente textura y buena apariencia. Se caracteriza por tener un tallo cuyo diámetro oscila entre 2 a 4 cm, cubierto de pelos glandulares, sus hojas compuestas son pecioladas, de forma lobular y dentada, su sistema radical está conformado por raíz principal y secundarias (Garzón, 2011).

1.11.2. Variedad Floradade

Benavides (2015) manifiesta que se caracteriza por tener frutos de buen tamaño, de forma redonda y pulpa roja, con peso de 300 gramos aproximadamente. La variedad Floradade crece en suelos con alto contenido de tierra fértil y buen abono, además es resistente a enfermedades como *Fusarium*, *Verticillium* y posee buena adaptación a diferentes tipos de climas.

1.11.3. Híbrido Micaela HA 1903

Montenegro (2012) plantea que el híbrido Micaela HA 1903 tiene crecimiento indeterminado, se caracteriza por ser una planta muy productiva, vigorosa, con follaje de buena abertura. Su fruta es de mayor tamaño con duración muy prolongada y racimo uniforme, tienen un peso que fluctúa entre 190 a 250 gramos, forma redondeada profunda. Es resistente a Virus del Mosaico del Tabaco, Nemátodos, *Fusarium* razas 1 y 2.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL LUGAR DEL EXPERIMENTO

El proyecto de investigación se dio en las instalaciones del Laboratorio de Protección Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIB) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena. La Universidad está situada en el cantón La Libertad, provincia de Santa Elena, ubicación geográfica de 2°13'55,83" latitud sur y 80°52'33.30" de longitud oeste. La zona de estudio posee una altitud aproximada de 10 metros sobre nivel del mar; clima cálido seco, con vegetación de desierto tropical. En la Tabla 1 se indica las condiciones climatológicas promedio que se da en la provincia de Santa Elena.

Tabla 1.- Condiciones climatológicas promedio de la provincia de Santa Elena

Climatología	Requerimientos
Temperatura promedio	24°C
Temperatura mínima	15,6 °C época seca
Temperatura máxima	39,5 °C época lluviosa
Precipitación anual promedio	200 milímetros
Humedad relativa	81,6%

2.1.1. MATERIALES Y EQUIPOS

2.2.1. Equipos

- Autoclave
- Estufa
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de crecimiento
- Balanza analítica
- Agitador magnético con calefacción
- Micropipeta 1000-100µl, 100 - 10µl
- Peachímetro digital

2.2.2. Materiales

- Matraz Erlenmeyer 250 ml, 500 ml, 1000 ml
- Vasos de precipitación 250ml, 100 ml, 50 ml

- Probeta 250 ml, 50 ml
- Tubos de ensayo vidrio tapa rosca
- Tubos falcon 15 ml
- Puntas de pipeta cito test 1000-100 μ l, 100 - 10 μ l
- Espátula mango de madera
- Pinza bayoneta de Jansen
- Mango de bisturí #4, #3
- Bisturí #15, #22
- Varilla agitadora magnética
- Gradilla Autoclavable
- Gasa
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Film plástico
- Papel toalla
- Algodón
- Cloro
- Alcohol
- Agua destilada
- Mechero de alcohol
- Cinta aislante blanca
- Cinta Parafilm

2.2.3. Insumos

- Bacto agar
- Sacarosa
- Sales de Macro y Micronutrientes de SIGMA M5524
- Vitamina Inositol
- Vitamina Tiamina HCL
- Hormona Citocinina 6-bencilaminopurina (BAP)

2.2.4. Material en estudio

2.2.4.1. Semillas Variedad Cherry

Esta variedad se caracteriza por ser de tipo mata, con ramificaciones, con hojas alternas y compuestas, tanto el tallo como las hojas poseen vellosidades. La planta está conformada por una raíz muy ramificada, sus frutos son carnosos conteniendo las semillas (González, 2007).

2.2.4.2. Semillas Variedad Floradade

La variedad Floradade, se caracteriza por frutos de óptimo tamaño, de forma redondeada con un peso que varía entre 260 a 300 gramos. Además posee una resistencia a enfermedades como *Fusarium* (Benavides, 2015).

2.2.4.3. Semillas Híbrido Micaela HA 1903

El tomate Micaela HA 1903 presenta un alto vigor híbrido, cuyos frutos son de gran tamaño y de textura buena, firmes, peso promedio entre 120 a 180 g. Presenta una alta toleración a nemátodos (Donoso *et al*, 2010, citados por Amaguaña, 2015).

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS

2.3.1. Tratamientos

El experimento tuvo un diseño DCA, con arreglo factorial 5x3, se consideró 4 concentraciones de hormona citocinina y 1 sin este compuesto que será el testigo absoluto (0,0, 0,5, 1, 1,5 y 2 miligramos por litro de solución), y 3 materiales vegetales (variedad Cherry, variedad Floradade e Híbrido Micaela HA 1903) como se indica en la tabla 2.

Tabla 2.- Detalle de materiales genéticos y medios de cultivos

Material vegetal	Concentración Citocinina
MV1 (Variedad Cherry)	Medio 1: M1 (0,5 mg/l citocininas)
MV2 (Variedad Floradade)	Medio 2: M2 (1,0 mg/l citocininas)
MV3 (Híbrido Micaela HA 1903)	Medio 3: M3 (1,5 mg/l citocininas)
	Medio 4: M4 (2,0 mg/l citocininas)
	Medio 5: M5 (0,0 mg/l citocininas)

Tabla 3.- Número total de tratamientos

T1: MV1M1	T5: MV2M1	T9: MV3M1	T13: MV1M0
T2: MV1M2	T6: MV2M2	T10: MV3M2	T14: MV2M0
T3: MV1M3	T7: MV2M3	T11: MV3M3	T15: MV3M0
T4: MV1M4	T8: MV2M4	T12: MV3M4	

2.3.2. Diseño experimental

El ensayo estuvo conformado de 5 concentraciones y 3 materiales vegetales, con 5 repeticiones por cada tratamiento donde está incluido el testigo absoluto. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones. En total 75 unidades experimentales.

2.3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat, aplicando la prueba de Duncan $p > 0,05$.

Tabla 4.- Análisis estadístico

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total (T-1)	74
Tratamientos (t-1)	14
Réplicas (r-1)	4
Error Experimental (t-1) (r-1)	56
Factor A	4
Factor B	2
AXB	8

Se obtiene un total de 15 tratamientos, con un Grado de libertad de 14 y un Error experimental de 56, como se menciona en la tabla 4. En total se considera 5 tubos por tratamiento, equivaliendo a las réplicas, teniendo un total de 75 unidades experimentales.

2.3.4. Delineamiento Experimental

a. Diseño experimental	DCA con arreglo factorial 5 x 3
b. Tratamientos	15
c. Repeticiones	5
d. Total de unidades experimentales	75
e. Número de semillas por unidad experimental	1
f. Número de tubos de ensayo por tratamiento	5
g. Total de semillas por tratamiento	5
h. Total de semillas del experimento	75

2.3.5. Conversión logarítmica de datos

Al momento de tabular los datos presentaban mucha variación entre ellos, ocasionando el incremento del Coeficiente de Variación; razón por la cual los datos obtenidos en la presente investigación fueron transformados a logaritmo, aplicando la fórmula **Log** $(x+1)$, para un mejor análisis de los resultados.

2.4. MANEJO DEL EXPERIMENTO

2.4.1. Limpieza de equipos

Los equipos usados en el laboratorio como cámara de flujo laminar, cámara de crecimiento, estufa, autoclave, balanza analítica, entre otros, se desinfectaron previamente para evitar contaminaciones en los procesos de propagación.

La limpieza de la cámara de flujo laminar se realizó 15 a 20 minutos antes de empezar la propagación del material vegetal. Es recomendable desinfectar la cámara tanto antes como después de usarla. La esterilización de la cámara de crecimiento es importante debido a que es el lugar donde se destina las semillas y explantes propagados y que posee las condiciones ideales para su desarrollo.

2.4.2. Lavado y esterilización de los materiales de laboratorio

Los materiales usados en la propagación de tomate fueron lavados y esterilizados correctamente. La esterilización consistió en el lavado de materiales con una solución de cloro al 30% sumergido durante 30 minutos, y tres enjuagues sucesivos con agua pura por 15 minutos.

Una vez lavado los materiales, se roció con alcohol y se procedió a cubrir con papel aluminio, como los materiales de acero inoxidable; en el caso de la vidriería, se cubrió la parte superior del recipiente con papel aluminio. Luego los materiales fueron llevados a la estufa. La temperatura de esterilización en la estufa es de 80°C por un tiempo aproximado de 2 horas.

2.4.3. Preparación de Medio Básico Murashige & Skoog

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 5).

Tabla 5.- Concentración de vitaminas en medio Murashige & Skoog

Nombre	Fórmula 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

Los requerimientos nutricionales para el buen desarrollo de los explantes de tomate está basado en la disponibilidad de sales de macronutrientes y micronutrientes que contiene el medio Murashige & Skoog que se detalla en la tabla 6. Para este requerimiento se utilizó sales básicas mixtas de SIGMA M5524 que incluyen las sales de macro y micronutrientes.

Tabla 6.- Composición de sales del medio Murashige & Skoog (SIGMA M5524)

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 molíbdico (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 preparación de un litro de medio Murashige & Skoog, se consideró las sales de macro y micronutrientes, las vitaminas, agar y sacarosa, en concentraciones como indica la tabla 7.

Tabla 7.- Especificaciones para la elaboración de un litro de Medio Murashige & Skoog

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

Metodología para la preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo consistió en medir el volumen total de agua destilada con una probeta esterilizada, verter el 50% del agua 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 agregaron con una micropipeta, posteriormente se ubicó sacarosa y sales, y se disolvió con un agitador de vidrio. Una vez disueltos los componentes mencionados, se midió el pH del medio, que debe oscilar entre 5,6 a 5,8. En caso de tener un medio ácido, aplicar hidróxido de sodio; si el medio es alcalino se debe añadir ácido clorhídrico, dichos componentes regulan la acidez y alcalinidad respectivamente en la solución.

Una vez medido el pH, se ubicó en el matraz Erlenmeyer el agar, y el 50 % de agua restante, finalmente el medio fue sometido a calor mediante el termoplato durante 15 minutos, para una mejor disolución el agitador magnético fue indispensable. Posteriormente se colocó el medio de cultivo MS en la autoclave para su esterilización a una temperatura de 121° C, 15 PSI, por aproximadamente 45 minutos (Tortora *et al*, 2007). En tubos de ensayo de vidrio se vertieron 5 ml del medio de cultivo MS, tapándolos adecuadamente. Transcurrido un tiempo prudente, el medio se solidificó y se procedió a etiquetar para almacenar en condiciones estériles.

2.4.4. Desinfección de semillas

Para la obtención de explantes de tomate se puso a germinar semillas en medio de cultivo MS. Las semillas fueron lavadas con desinfectante líquido y posteriormente se realizaron varios enjuagues con agua esterilizada para eliminar residuos del desinfectante, luego se sumergió las semillas en una solución lejía al 5% durante 20 minutos y se realizó enjuagues sucesivos de 5 minutos.

2.4.5. Siembra de material vegetal

Después de la desinfección de semillas, se sembró en tubos con medio MS y ubicándolas en la cámara de crecimiento con condiciones de temperatura 28 ± 1 °C, 80-100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2/\text{s}$.

2.4.6. Preparación de Medio Murashige & Skoog con hormonas Citocininas

Para conformar los tratamientos, se preparó el Medio Murashige y Skoog con el mismo procedimiento antes descrito, y se adicionaron 4 dosis de hormonas citoquininas como se detalla en la Tabla 8 y se midió el pH hasta 5.5 – 5.8.

Tabla 8.- Concentración de citocininas en medios de cultivos Murashige & Skoog

Medios de cultivo MS
Medio 1: M1 (0,5 mg/l citocininas)
Medio 2: M2 (1,0 mg/l citocininas)
Medio 3: M3 (1,5 mg/l citocininas)
Medio 4: M4 (2,0 mg/l citocininas)

Posteriormente se ubicó la solución en un matraz y añadir el agar, para una mejor disolución se usó el agitador magnético, y se llevó el medio al termoplato, el medio debe alcanzar un tono amarillo traslúcido, sin llegar a punto de ebullición.

Una vez preparado el medio se procedió a esterilizar con la autoclave, a temperatura de 120°C, 15 PSI durante 45 minutos aproximadamente, finalmente se distribuyó aproximadamente 15 ml de medio en tubos de ensayo con capacidad para 30 ml los cuales fueron etiquetados. En la Tabla 9, se detalla los tratamientos establecidos con sus respectivas dosis.

Tabla 9.- Tratamientos definidos para el establecimiento de cultivo *in vitro*

Tratamiento	Nomenclatura	Material vegetal	Citocinina	Concentración
1	MV1M1	Cherry	Bencilaminopurina	0,5 mg/L
2	MV1M2	Cherry	Bencilaminopurina	1 mg/L
3	MV1M3	Cherry	Bencilaminopurina	1,5 mg/L
4	MV1M4	Cherry	Bencilaminopurina	2 mg/L
5	MV2M1	Floradade	Bencilaminopurina	0,5 mg/L
6	MV2M2	Floradade	Bencilaminopurina	1 mg/L
7	MV2M3	Floradade	Bencilaminopurina	1,5 mg/L
8	MV2M4	Floradade	Bencilaminopurina	2 mg/L
9	MV3M1	Micaela HA 1903	Bencilaminopurina	0,5 mg/L
10	MV3M2	Micaela HA 1903	Bencilaminopurina	1 mg/L
11	MV3M3	Micaela HA 1903	Bencilaminopurina	1,5 mg/L
12	MV3M4	Micaela HA 1903	Bencilaminopurina	2 mg/L
13	MV1M0	Cherry	Sin citocinina	0 mg/L
14	MV2M0	Floradade	Sin citocinina	0 mg/L
15	MV3M0	Micaela HA 1903	Sin citocinina	0 mg/L

2.4.7. Obtención de explantes

Se sembraron en los tubos de ensayo explantes obtenidos a partir de plantas de tomate de 25 días de germinación. Para obtener un buen explante, se seleccionó el meristema apical, eliminando las primeras hojas que se encuentran alrededor del meristema, obteniendo un explante de aproximadamente 1 centímetro. Una vez obtenido el explante se sembró en los tubos de ensayo con medio de cultivo Murashige & Skoog y hormona citocinina en sus diferentes concentraciones. Posteriormente se sellaron los tubos de ensayos y fueron etiquetados.

2.5. Variables de estudio

2.5.1. Velocidad de germinación de materiales vegetales

Se evaluó la velocidad de germinación de los materiales vegetales a los 3, 6 y 9 días, considerando como emergencia la presencia de radícula. Se calculó la Velocidad de germinación en base a lo propuesto por Maguire en 1962, con la siguiente fórmula:

$$VG = \frac{N^{\circ} \text{ Plántulas emergidas}}{\text{Día primer conteo}} + \dots + \frac{N^{\circ} \text{ Plántulas emergidas}}{\text{Días conteo final}}$$

2.5.2. Germinación

Se consideró evaluar periódicamente, observando el número de semillas germinadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días, registrando la altura que alcanza en el transcurso del periodo de crecimiento.

2.5.3. Porcentaje de contaminación

A los 5, 11, 15 días después de la siembra se evaluó la presencia de organismos patógenos al ensayo en cada uno de los tubos, descartando las unidades experimentales que presentaban contaminación por hongos o bacterias afectando el desarrollo de los explantes.

2.5.4. Respuesta Morfológica

Las evaluaciones se realizaron con el uso de la escala arbitraria propuesta por García Renata, responsable de la investigación, utilizando la escala mostrada en la Tabla 10.

Tabla 10.- Respuesta morfológica en el meristema apical de cultivos *in vitro* de tomate

Fase	Respuesta morfológica
A=0.30	Sin cambios morfológicos
B=0.48	Crecimiento de tallo/explante
C=0.60	Desarrollo foliar
D=0.70	Presencia de Yemas adventicias
E=0.78	Presencia de raíces

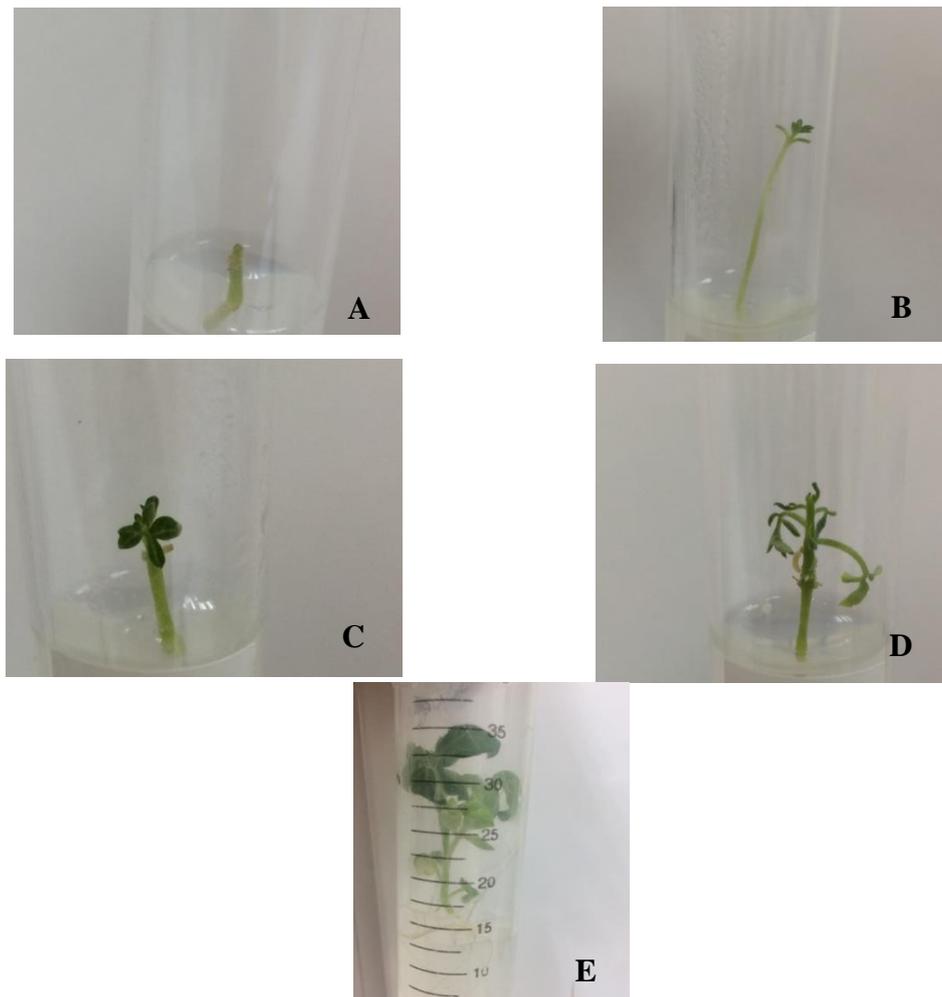


Figura 4.- Respuestas obtenidas en el establecimiento de Cultivo *in vitro* de tomate. **A)** Explante sin cambios morfológicos; **B)** Crecimiento longitudinal del explante; **C)** Desarrollo de hojas a partir del meristema apical; **D)** Presencia de yemas adventicias a los 12 días después de su establecimiento, y **E)** Presencia de raíces al cabo de 24 días de siembra en medio de cultivo.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se exponen los resultados obtenidos a través de los análisis de varianza de las variables de estudio planteadas anteriormente.

3.1. Velocidad de germinación

Se determinó la velocidad de germinación de los materiales vegetales en estudio, Variedad Cherry, Variedad Floradade e Híbrido Micaela, reflejada en la tabla 11.

Tabla 11.- Velocidad de germinación a los días 3, 6 y 9 de evaluación

Material vegetal	Velocidad de germinación
Variedad Cherry	8.2
Variedad Floradade	5.4
Híbrido Micaela	9.5

En la Tabla 11 muestra la velocidad con la que germinó cada material vegetal, siendo el Híbrido Micaela el de mayor velocidad de germinación seguida de la Variedad Cherry que obtuvo un valor de 8.2, a diferencia de los materiales antes mencionados, la Variedad Floradade fue la de menor velocidad de germinación con un valor de 5.4.

Martínez *et al.*, (2010) en su estudio sobre el índice de velocidad evaluado en líneas de maíz, atribuye a las características genéticas de los híbridos, la mejor respuesta de emergencia de radícula en la germinación. En el presente ensayo se marcó una diferencia entre Híbrido Micaela y las Variedades Cherry y Floradade, respecto a la velocidad de germinación, coincidiendo con los resultados de los autores.

3.2. Porcentaje de germinación

Las semillas fueron sembradas en tubos de ensayo con Medio Murashige & Skoog, con un total de 29 unidades por material, siendo estas las plantas donadoras del explante apical.

Tabla 12.- Porcentaje de Germinación de Materiales vegetales

Material	Días de Evaluación					
	1	3	6	9	12	15
MV1	0%	34%	52%	76%	83%	97%
MV2	0%	21%	38%	48%	62%	93%
MV3	0%	41%	76%	83%	90%	100%

A partir del tercer día de la siembra, los materiales empezaron a emerger, presentando una pequeña radícula, al sexto día de evaluación ya se observó la presencia de Hipocótilos en las semillas, originando una plántula. El material 1, a los 6 días de evaluación alcanzó un 52% de germinación, mientras que el material 2, obtuvo el 38% teniendo éste un menor porcentaje de germinación en comparación con los otros dos materiales vegetales; finalmente el material 3 logró el 76%. En la Tabla 12 se muestra los porcentajes alcanzados durante los siguientes días de evaluación.

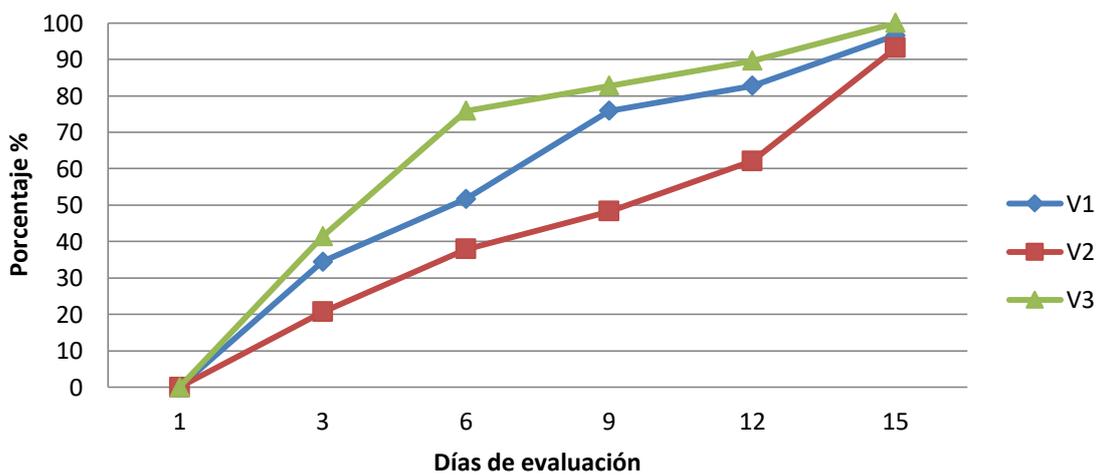


Figura 5.- Porcentaje de Germinación de Materiales vegetales al día 1, 3, 6, 9, 12 y 15 después de la siembra

Benavides (2015), en su trabajo de investigación, Capacidad germinativa del genotipo de tomate Floradade en condiciones salinas, manifiesta que este genotipo no tiene dependencia de factor luz en la germinación, obteniendo incluso mayor desarrollo en ausencia de luz, llegando a la conclusión de que la variedad Floradade tiene una mayor velocidad en oscuridad. Comparando con el estudio del autor mencionado, esta variedad en el presente ensayo tuvo una menor velocidad de germinación debido a la influencia de la luz permanente en esta etapa.

Según Cuadra (1992), la germinación tardía en las semillas se debería a dos posibles causas, dormición o latencia. Cuando la semilla no germina a pesar de tener las condiciones ideales para su desarrollo se conoce como dormición, a diferencia del periodo de latencia, donde la semilla conserva su capacidad germinativa pero espera las condiciones ambientales favorables para su crecimiento. Se sobreentiende que las semillas de cada especie son diferentes, no todas reaccionan de igual forma frente a los

estímulos de los factores necesarios para una germinación, por esa razón existen casos en los que el exceso de uno de los factores provoca la inhibición de la capacidad germinativa, por ejemplo, el exceso de temperaturas altas o bajas se denomina Termo inhibición, o cuando la semilla requiere oscuridad pero está expuesta a la luz, entra en estado de Foto inhibición, tardando en obtener la totalidad de la germinación, como sucedió en la presente investigación, que tardó 15 días en obtener el 100% de la germinación.

En el presente estudio los tres materiales vegetales se diferenciaron en la altura de la planta como se detalla en la Tabla 13. Bajo las condiciones de temperatura adecuada de 28 ± 1 °C, humedad relativa menor a 70%, y un fotoperiodo de 18 horas luz y 6 horas de oscuridad, las plantas se desarrollaron óptimamente en la cámara de crecimiento, alcanzando una altura aproximada entre 2 cm al sexto día de evaluación hasta 6 cm el día 15 de evaluación.

Tabla 13.- Altura de Material vegetal evaluados en diferentes fechas

Material Genético	Días de Evaluación				
	3	6	9	12	15
MV1	0,9 cm	1,5 cm	3,7 cm	4,9 cm	5,5 cm
MV2	0,3 cm	0,9 cm	2 cm	4,5 cm	5 cm
MV3	0,7 cm	1,5 cm	2,8 cm	4,3 cm	6 cm

La genética del material vegetal, el microclima establecido, y los nutrientes del medio de cultivo no garantizan el desarrollo ideal de las plantas germinadas *in vitro*.

Las plántulas germinadas *in vitro* de los materiales tuvieron comportamiento diferente entre sí, específicamente Híbrido Micaela tuvo un mayor crecimiento longitudinal respecto a las dos variedades restantes. De acuerdo con el trabajo de Delgado (2013), las semillas incluso en condiciones climáticas y nutricionales óptimas para su desarrollo, presentan diferentes respuestas en el crecimiento debido a las características genotípicas del material. Según Marín, (2017) la temperatura y humedad relativa son condiciones climáticas cuyos valores debajo del rango óptimo provocan el mal desarrollo de la planta.

3.3. Contaminación de explantes

En la tabla 14 se observa el Análisis de varianza de las evaluaciones realizadas en el establecimiento del cultivo *in vitro*, se utilizó la Prueba de Duncan al 0,05 para determinar las diferencias significativas.

Tabla 14.- ANDEVA realizado a la variable de estudio Contaminación

F.V.	gl	Ev. 1	Ev. 2	Ev. 3	Ev. 4	Ev. 5	F. Valor	
		F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	0,05	0,01
FACTOR A ¹	2	1,12 NS	0,64 NS	1,03 NS	2,17 NS	2,68 NS	3,23	5,18
FACTOR B ²	4	2,8 *	1,05 NS	2,06 *	2,1 *	2,17 *	2,61	3,83
FACTOR A*FACTOR B	8	3,22**	0,98 NS	1,23 NS	1,21 NS	1,14 NS	2,18	2,99
C.V.		13,93	22,85	23,38	23,81	23,67		

1 Material vegetal
 2 Concentraciones de citocinina
 * Significativo
 ** Altamente significativo
 NS No significativo

Los análisis estadísticos de las evaluaciones realizadas a los 11, 15, 18, 25, 35 días después de la siembra de los explantes, descritos en la Tabla 14, permiten observar las diferencias significativas en la Evaluación 1, tanto en el Factor B como en la Interacción, en la F valorada, mientras que en el Factor A no existe diferencia significativa. En cuanto a la Evaluación 2, no existieron diferencias significativas en ninguno de los Factores evaluados ni en la Interacción de los mismos. Respecto a las Evaluaciones 3, 4, 5, hay diferencia significativa al 5% únicamente en el Factor B, mas no en el Factor A y en la Interacción.

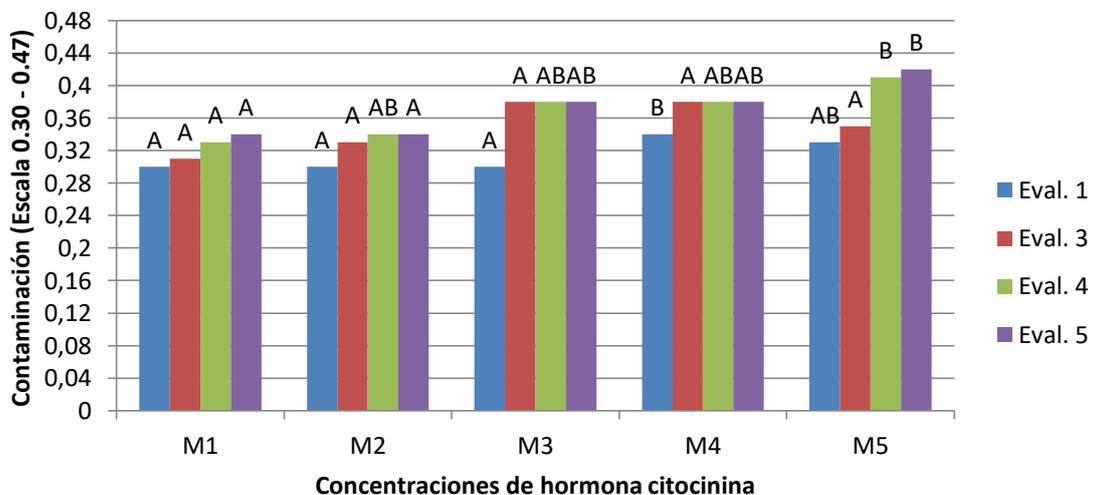


Figura 6.- Resultados del Efecto de las Concentraciones de hormona citocinina (Factor B) en los diferentes días de las evaluaciones en la Variable Contaminación

La Figura 6 describe los resultados de los promedios obtenidos en los análisis estadísticos del Factor B, de la variable Contaminación, donde se determinó que M1 fue no significativo para todos los días evaluados (11, 18, 25 y 35 días), lo que significa que las unidades experimentales no se contaminaron, por presentar valores de 0.30, 0.31, 0.33 y 0.34 dentro de la escala.

En la concentración M2 de la misma variable, se mostraron dos grupos estadísticos, uno conformado por las evaluaciones 1, 3 y 5 cuyos promedios fueron estadísticamente iguales, con valores de 0.30, 0.33 y 0.34, lo que significa que las unidades experimentales no se contaminaron, de acuerdo a la escala establecida; mientras que el otro grupo conformado por la evaluación 4 presentó una diferencia estadística significativa a los 25 días, con valor de 0.34.

Respecto a la concentración M3 se establecieron dos grupos, uno conformado por la evaluación 1 y 3 (11 y 18 días) cuyos promedios fueron estadísticamente iguales, con valores de 0.30 y 0.38, indicando que a pesar del incremento de unidades contaminadas no hay diferencia altamente significativa; mientras que el otro grupo estadístico, formado por las evaluaciones 4 y 5 (25 y 35 días), con valores de 0.38, determinaron una diferencia estadística significativa respecto a las dos primeras evaluaciones, cuyo valor está dentro de la escala establecida lo que indica que los explantes no se vieron afectados en su totalidad por la contaminación.

En la concentración M4 se formaron 3 grupos estadísticos, uno conformado por la evaluación 1 (11 días) donde existieron unidades experimentales contaminadas cuyo promedio 0.34 no fue altamente significativo; el segundo grupo estadístico se conformó por la evaluación 3 (18 días), cuyo promedio, 0.38, a pesar de indicar el aumento de unidades contaminadas no significa una diferencia estadística alta en comparación con el tercer grupo estadístico conformado por las evaluaciones 4 y 5 (25 y 35 días) con promedios de 0.38.

En la concentración M5 de la misma variable, se formaron 3 grupos estadísticos, uno conformado por las evaluaciones 4 y 5 (25 y 35 días) cuyos promedios de 0.41 y 0.42 de acuerdo a la escala, indican el incremento de unidades experimentales contaminadas, estableciendo diferencia significativa respecto los dos grupos estadísticos restantes

conformados por la evaluación 3 (18 días), con promedio de 0.41 y la evaluación 1 (11 días) con valor de 0.33 para el segundo grupo.

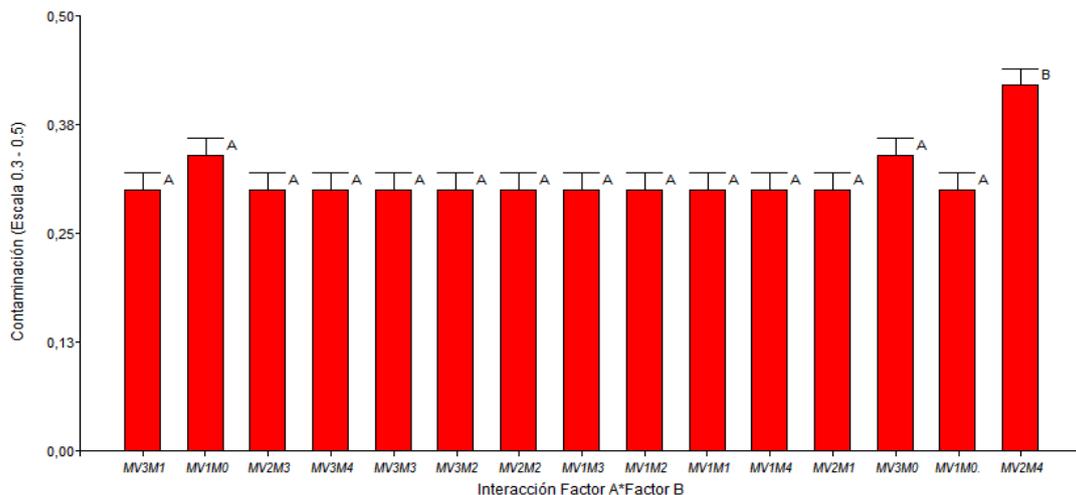


Figura 7.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona) en la Primera Evaluación, 11 días de la Variable Contaminación

En la Figura 7, se puede observar los resultados de los promedios de la Interacción del Factor A* Factor B, de la variable Contaminación, donde se determinó que MV2M4 marcó una diferencia significativa con valor 0.42 indicando que existió una mayor contaminación respecto a las demás interacciones cuyos promedios de 0.30 a 0.34, fueron estadísticamente iguales, determinando que el número de unidades experimentales contaminadas coincidió en las interacciones establecidas.

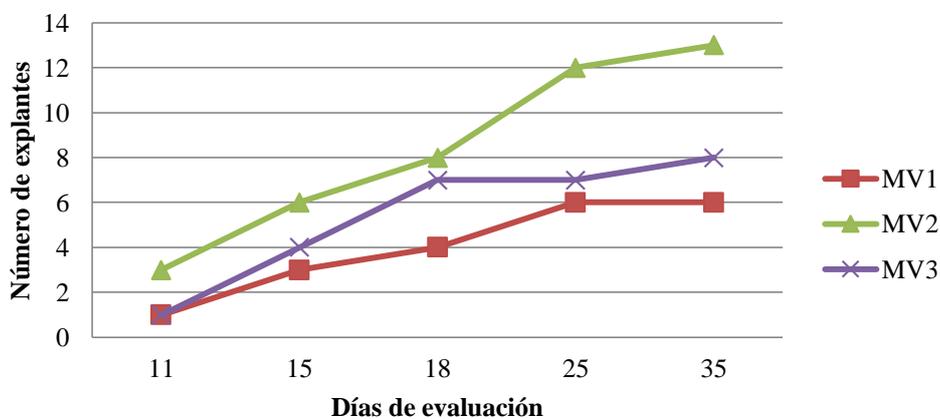


Figura 8.- Número de unidades experimentales contaminadas

En la Figura 8 se describe el número de explantes totales contaminados de acuerdo a las evaluaciones realizadas a los 11, 15, 18, 25 y 35 días después del establecimiento del

cultivo. El total de explantes descartados por contaminación fue 36, significando casi la mitad de las unidades experimentales.

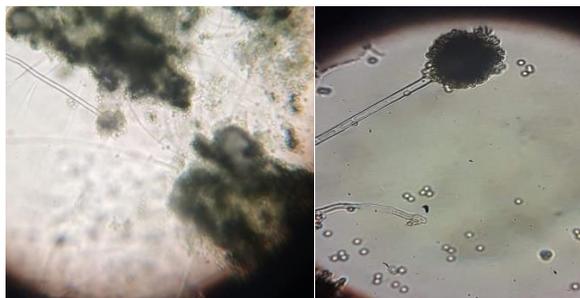


Figura 9.- Agente contaminante. Género *Aspergillus*, observado en lente de 40x.

La figura 9 muestra el agente contaminante que se presentó durante el establecimiento del cultivo *in vitro* fue *Aspergillus*, mismo que fue observado en el microscopio óptico con lente de 40x.

Estudios realizados manifiestan que una de las razones de pérdida de unidades experimentales en cultivos *in vitro*, se debe a la contaminación. Debergh & Zimmerman (1991) citados por Afanador (2005), aseguran que durante las primeras fases del establecimiento del cultivo se obtiene un alto porcentaje de contaminación, relacionado con la presencia de microorganismos fúngicos. Los resultados respecto a la variable de contaminación confirman la teoría de Debergh & Zimmerman (1991) sobre la presencia de hongos, descartando unidades experimentales conforme transcurría el tiempo en el cultivo.

Hernández & González (2010), en su investigación Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en establecimiento *in vitro* aplicados a frutales, explica que los hongos más comunes en cultivos de tejidos son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, entre otros, lo que coincide con los agentes contaminantes en el presente ensayo.

Evaluación del efecto de diferentes dosis de citocinina en explantes

3.4. Respuesta Morfológica

En la tabla 15, se observa el ANDEVA de las evaluaciones realizadas a los 6, 12, 18, 24, 30 días respectivamente, donde se puede notar en la Evaluación 1, existe diferencia significativa al 5% en el Factor A, mientras que el valor de F en el Factor B es

altamente significativo, en la interacción de estos dos factores no hay significancia. Respecto a las Evaluaciones 2 y 3, tanto en el Factor A como en el Factor B, son altamente significativos al 1 %, a diferencia de sus interacciones el valor de F las diferencias significativas son únicamente al 1%. En la Evaluación 4 y 5, se observan diferencias significativas al 1% en los dos Factores de estudios, no obstante para la interacción de éstos no hay significancia.

Tabla 15.- ANDEVA de la variable Cambios morfológicos de los días evaluados

F.V.	gl	Ev. 1	Ev. 2	Ev. 3	Ev. 4	Ev. 5	F. Valor	
		F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	F.Cal	0,05	0,01
FACTOR A	2	4,2*	7,95**	6,75**	5,8**	5,91**	3,23	5,18
FACTOR B	4	9,75**	10,13**	7,31**	7,18**	7,1**	2,61	3,83
FACTOR A*FACTOR B	8	1,53 NS	2,84*	2,65*	1,78 NS	0,77 NS	2,18	2,99
C.V.		18,82	17,98	17,85	19,76	19,75		

1 Material vegetal
 2 Concentraciones de citocinina
 * Significativo
 ** Altamente significativo
 NS No significativo

Los resultados se obtuvieron mediante evaluaciones periódicas realizadas, determinando las respuestas morfológicas de las unidades experimentales, bajo tratamientos de hormona citocinina. Se establecieron 15 tratamientos en total, emitiendo los siguientes valores.

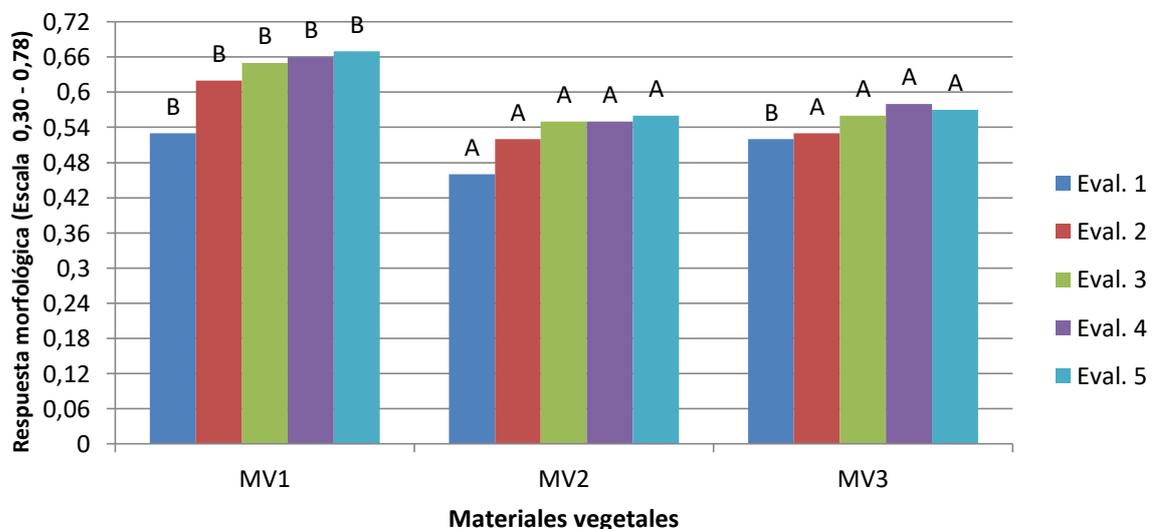


Figura 10.- Resultados del Factor A (Materiales vegetales) en los diferentes días de las evaluaciones en la Variable Respuesta morfológica

La Figura 10 muestra los resultados de los promedios obtenidos en los análisis estadísticos del Factor A, de la Variable Respuesta morfológica, donde se estableció que el Material vegetal 1 (Cherry) en todas las evaluaciones realizadas (6, 12, 18, 24 y 30 días) fueron estadísticamente iguales, con valores de 0.53 a 0.67, llegando a desarrollar yemas adventicias durante la última evaluación realizada.

El material vegetal 2, Variedad Floradade, en las evaluaciones 1, 2, 3, 4, y 5, (6, 12, 18, 24 y 30 días) determinaron que fueron estadísticamente iguales, con promedios de 0.46 a 0.56, cumpliendo con la fase de crecimiento de explante y desarrollo foliar. Respecto al Híbrido Micaela (MV3), en la primera evaluación se diferenció estadísticamente de las demás evaluaciones, con valor de 0.52, estableciendo que el material vegetal 3 en los días 12, 18, 24 y 30 días fueron estadísticamente iguales, con promedios de 0.53 a 0.58, llegando al desarrollo foliar en base a la escala establecida.

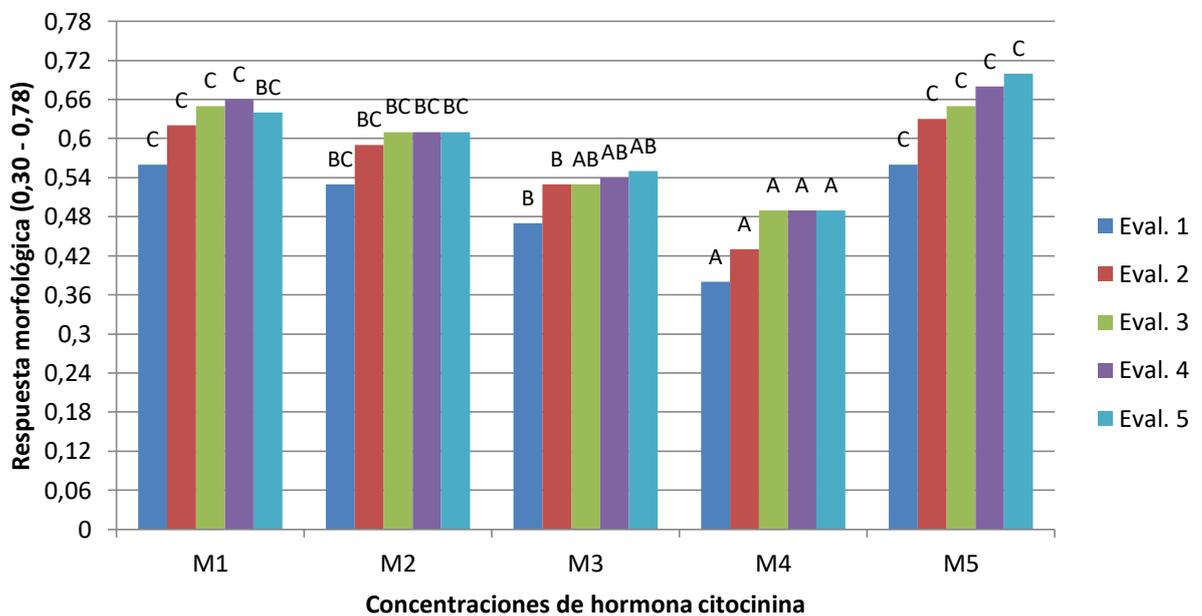


Figura 11.- Resultados del Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en las diferentes Evaluaciones de la Variable Respuesta morfológica

En la Figura 11 se muestran los resultados de los promedios obtenidos en los análisis estadísticos del Factor B, de la variable Respuesta morfológica, donde se determinó que la concentración M1 fue no significativo durante las evaluaciones 1, 2, 3, 4 y 5 (6, 12, 18, 24 y 30 días) al ser estadísticamente iguales, obteniendo la mayor respuesta morfológica en la evaluación 4 con valor 0.66, desarrollando yemas adventicias en las

unidades experimentales, mientras que en las demás evaluaciones llegaron a fase de desarrollo foliar.

Para la concentración M2, en las 5 evaluaciones fueron estadísticamente iguales, sin embargo se nota que la mayor respuesta morfológica fue en las 3 últimas evaluaciones con valores de 0.61 en los tres casos, a su vez se observa que la menor respuesta morfológica en la dosis de 1 mg/L fue durante la primera evaluación con un valor de 0.53, durante las 5 evaluaciones los explantes en esta concentración llegaron a la fase de desarrollo foliar.

En la concentración M3 se formaron 2 grupos estadísticos, conformados por las evaluaciones 3, 4 y 5, con valores de 0.53 a 0.55, obteniendo la mayor respuesta morfológica que se observó en la Evaluación 5, con un valor de 0.55 conforme a la escala establecida, correspondiendo a la fase de crecimiento de tallo, el segundo grupo constituido por las evaluaciones 1 y 2 (6 y 12 días) cuyos promedios de 0.47 y 0.53, indicó que la menor respuesta morfológica fue en la Evaluación 1 no presentando cambios morfológicos.

Para la concentración M4 en la misma variable en las evaluaciones fueron estadísticamente iguales, en las tres últimas evaluaciones se observaron mayor respuesta con un valor de 0.49, equivalente al crecimiento de tallo, a diferencia de la primera evaluación que obtuvo un valor de 0.38 conforme a la escala, no obstante esta concentración fue la menos eficiente respecto a las otras dosis, ya que no presentó respuesta morfológica.

En la concentración M5 las evaluaciones realizadas fueron estadísticamente iguales, en comparación con las otras dosis, alcanzando la mayor respuesta morfológica, desde la evaluación 1 obtuvo un valor de 0.56, cumpliendo con las fases de crecimiento de tallo y desarrollo foliar, a medida que se realizaron las evaluaciones los valores incrementaron, llegando a la Evaluación 5 con 0.7 de acuerdo a la escala de la variable, desarrollando yemas adventicias, y en ciertos casos la presencia de raíces.

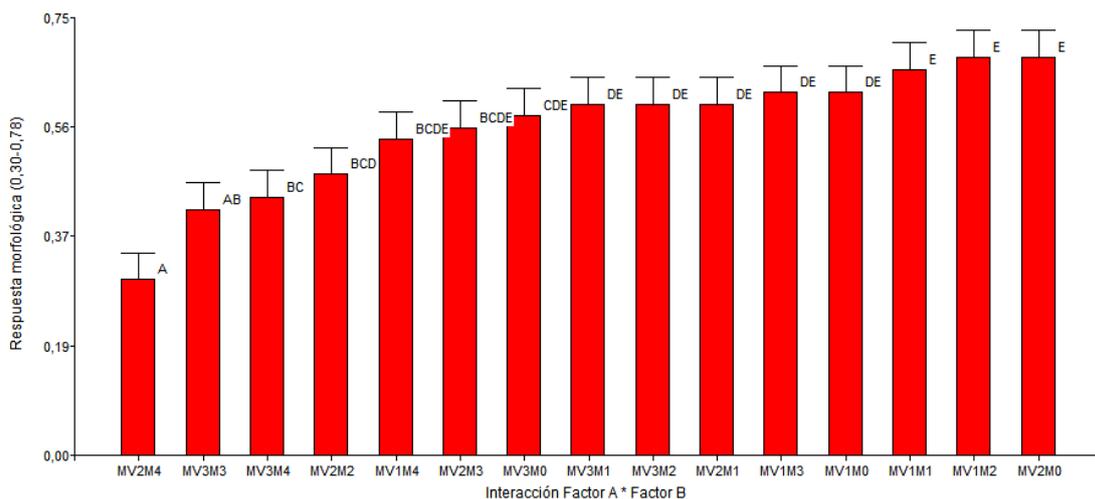


Figura 12.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Segunda Evaluación, 12 días de la Variable Respuesta morfológica

La Figura 12 describe los promedios de la Interacción entre el Factor A y el Factor B, a los 12 días de evaluación de la Variable Respuesta morfológica, donde se observa diferencias estadísticas entre los tratamientos, la mayor respuesta se presentó en los tratamientos MV1M1, MV1M2 y MV2M0, correspondientes a la Variedad Cherry y Variedad Floradade, con concentraciones de 0 mg/L a 1 mg/L de hormona, alcanzando un valor de 0.66, 0.68 y 0.68 respectivamente de acuerdo a la escala establecida, llegando a la Fase de desarrollo foliar. El tratamiento con menor respuesta fue MV2M4 perteneciente a la Variedad Floradade con concentración 2 mg/L que alcanzó un valor de 0.30 no presentando cambios en esta evaluación.

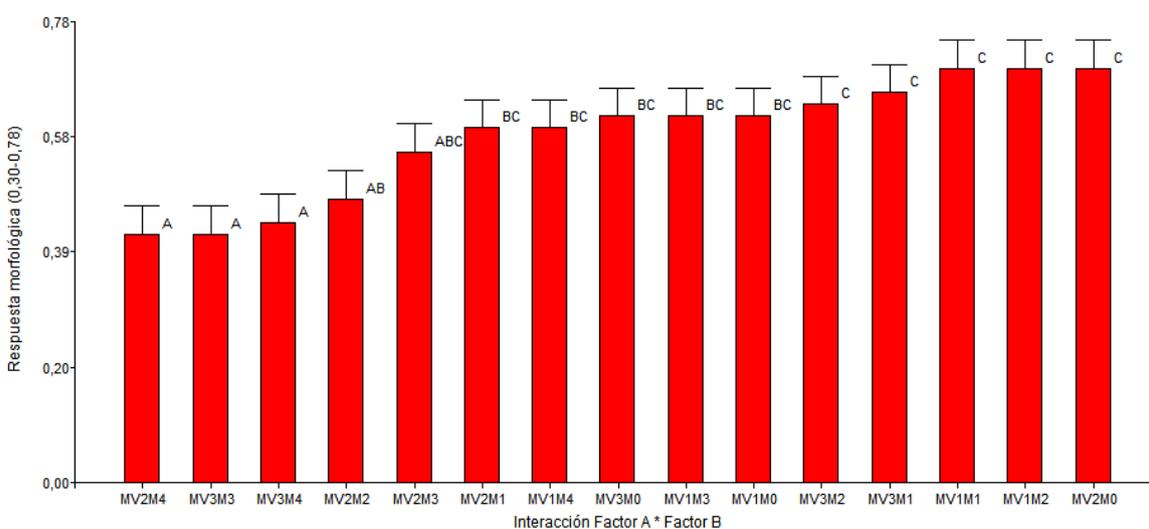


Figura 13.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Tercera Evaluación, 18 días de la Variable Respuesta morfológica

En la Figura 13 se observan los resultados de los promedios de la Interacción de los factores en la Variable Respuesta morfológica, en la Evaluación 3, determinando que los tratamientos MV2M4, MV3M3, MV3M4 obtuvieron la menor respuesta morfológica con valor 0.42, 0.42 y 0.44 llegando a la fase de crecimiento de tallo, por otra parte los tratamientos con mayor respuesta morfológica fueron MV3M2, MV3M1, MV1M1, MV1M2 y MV2M0, con valores de 0.64, 0.66 y 0.70 en los tres últimos mencionados, perteneciendo a los materiales vegetales Híbrido Micaela (MV3), Variedad Cherry (MV1) y Variedad Floradade (MV2) respectivamente, con concentraciones de 0 mg/L hasta 1 mg/L, alcanzando las fases de desarrollo foliar y presencia de yemas adventicias.

Los resultados obtenidos en esta investigación determinaron una mejor respuesta morfológica en las unidades experimentales con menor concentración de hormona, respecto a los tratamientos con altas dosis de BAP, coincidiendo con el estudio realizado por Gutierrez (1995), donde manifiesta que existe una disminución del crecimiento del meristema conforme se aumenta la dosis de citocininas. Según sus observaciones con el uso de concentraciones mínimas de citocinina e incluso en ausencia de esta hormona, se observó mayor dominancia apical.

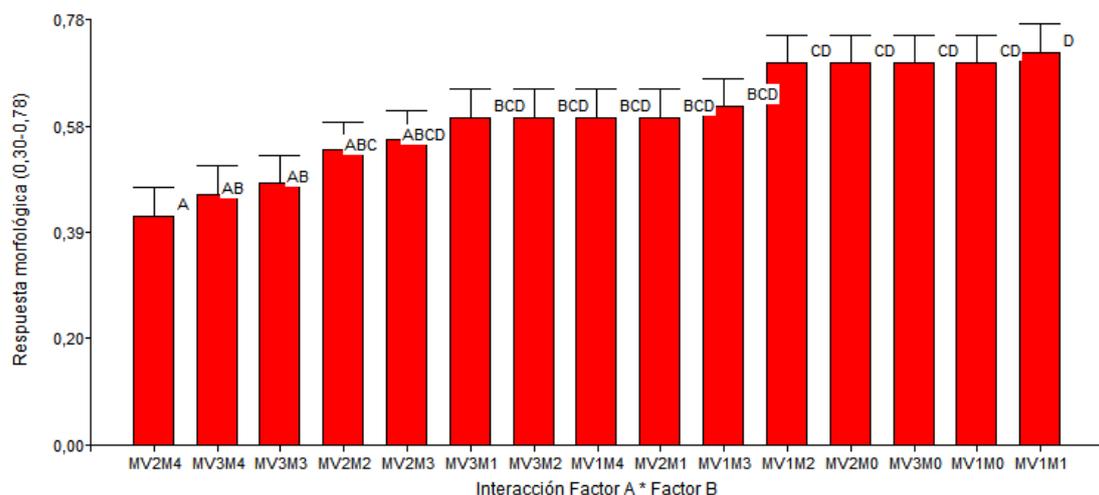


Figura 14.- Resultados de la Interacción Factor A (Material vegetal) * Factor B (Concentraciones de hormona citocinina) en la Quinta Evaluación, 30 días de la Variable Respuesta morfológica

La última evaluación realizada a los 30 días el cultivo *in vitro* emitió los resultados de los promedios reflejados en la Figura 14, donde se formaron grupos estadísticos, determinando que el tratamiento MV2M4 obtuvo la menor respuesta morfológica con

valor de 0.42 de acuerdo a la escala, no presentando cambios en los explantes, estableciendo una diferencia altamente significativa respecto a MV1M2, MV2M0, MV3M0, MV1M0 y MV1M1, que obtuvieron las mejores respuestas morfológicas, con promedios de 0.70 a 0.72, llegando a la fase de presencia de yemas adventicias y en ciertas unidades experimentales se observaron raíces.

Estudios realizados por Criollo *et al*, (2016) aseveran que altas dosis de citocinina (BAP), inhiben el desarrollo de raíces, a su vez, el mismo autor compara los resultados con un trabajo de embriogénesis somática de tomate realizado por Kaparakis & Alderson (2002), llegando a la resolución de dosis altas de BAP, no favorecen el proceso de enraizamiento y la formación de yemas axilares.

Pedroza (2009) a través de los resultados en su trabajo de investigación, encontró que los tratamientos sin concentraciones de BAP obtuvieron mejores resultados, las dosis de 0,5 mg/L y 1 mg/L respectivamente no alcanzó el nivel de aquellos sin hormona, no obstante se considera significativamente buena.

Sigarroa & García (2011) en su estudio sobre el establecimiento y multiplicación de mora, evaluó la influencia de tres medios, uno de ellos constituido por BAP con dosis 1 mg/L, logrando una mayor respuesta con dicha dosis, a diferencia de la concentración 1,5 mg/L que no obtuvo resultados altamente significativos.

Por otro lado Mesa *et al*, (2002) en su estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina aplicada a la especie *Leucaena*, demostró la eficiencia de las dosis bajas en la obtención de plántulas formadas. Krikorian (1991) manifiesta que la hormona BAP es recomendable usarla en concentraciones de 0,5 a 1mg/L, valores que fueron aplicados en el presente ensayo, cuyos resultados estadísticos obtuvieron una alta diferencia significativa frente a las altas dosis usadas.

Estadísticamente los tratamientos evaluados en el cultivo *in vitro* mediante la prueba de Duncan, tuvieron respuestas significativamente diferentes, descritas en la tabla 16.

Tabla 16.- Medias de la Interacción del Factor A * Factor B, por la prueba de Duncan a los 30 días de evaluación

Factor A	Factor B	Medias	*
2	4	0,42	A
3	4	0,46	A B
3	3	0,48	A B
2	2	0,54	A B C
2	3	0,56	A B C D
3	1	0,60	B C D
3	2	0,60	B C D
1	4	0,60	B C D
2	1	0,60	B C D
1	3	0,62	B C D
1	2	0,70	C D
2	5	0,70	C D
3	5	0,70	C D
1	5	0,70	C D
1	1	0,72	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La mayor respuesta morfológica de las unidades experimentales radicó en los Tratamientos con menor concentración de citocinina, 0.5 mg/L, 1 mg/L, incluso aún en los Testigos se obtuvo mejor respuesta, lo que beneficia en el aspecto económico.

Los resultados emitidos por los materiales vegetales estudiados, determinaron a la Variedad Cherry como el material con mejor comportamiento y respuesta morfológica; sin embargo, la Variedad Floradade e Híbrido Micaela tuvieron una alta respuesta morfológica únicamente en ausencia de hormona citocinina.

En este ensayo el mejor protocolo usado para la propagación de plántulas de tomate está relacionado con la ausencia de citocininas o un máximo de 0.5 mg/L en el medio de cultivo, con explantes de 25 días de edad, ya que éste presenta mayores respuestas fisiológicas en los explantes de los materiales genéticos de tomate evaluados, esto probablemente se debe a que en tejidos vegetales de mayor edad se requiere de una mínima cantidad de citocinina exógena.

Se rechaza la hipótesis planteada en base a los resultados obtenidos, demostrando que en altas concentraciones de citocinina no se produce mayor respuesta morfológica, al contrario entre más baja sea la dosis de hormona, mejor será la respuesta.

RECOMENDACIONES

Realizar más investigaciones sobre el cultivo *in vitro* en tomate y la influencia de los reguladores de crecimientos.

Ampliar el número de repeticiones por tratamientos, de modo que se alcance un coeficiente de variación de mayor confianza.

El medio de cultivo debe dejarse en reposo 3 días para visualizar la presencia o no de agentes patógenos.

Pasar a fase de pruebas de los explantes en condiciones semicontroladas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afanador, A. (2005). *Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de Dianthus caryophyllus L. (clavel)*. Tesis , Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Amaguaña, C. (2015). *Cuantificación y logística de la biomasa disponible del cultivo de tomate riñón (Lycopersicum esculentum)*. Tesis , Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Andrade, D., Córdova, M., Criollo, H., & Lagos, T. (2013). Evaluación de medios de cultivo para propagación in vitro de semillas y explantes de especies silvestres de Solanum. *Revistas UNAL*, 62(1), 27-36.
- Barreiro, E. (2015). *Fluctuación de precios en el producto agrícola tomate riñón en el mercado mayorista de Montebello de la ciudad de Guayaquil en el periodo 2010-2013*. Tesis de grado , Universidad de Guayaquil , Facultad Ciencias Económicas , Guayaquil.
- Benavides, P. (2015). *Capacidad germinativa del genotipo de tomate Floradade (Lycopersicon esculentum Mill.) en condiciones de estrés salino en diferentes fotoperiodos*. Tesis, Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad.
- Bidwell, R. (1979). *Fisiología Vegetal* (Primera ed.). México, D.F.
- Camarena , F., Chura , J., & Blas , R. (2014). Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. En *Introducción al Mejoramiento Genético de plantas* (pág. 11). Lima, Perú .
- Casado , M., Torrico, G., & Medina , M. (2012). *Medios de cultivo en un Laboratorio de Microbiología* .
- Cedres, M., & Sharry, S. (2016). Introducción a la Biotecnología. En *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (págs. 6-7). Universidad Nacional de La Plata.

- Córdoba, H., Gómez, S., & Núñez, C. (2018). Evaluación del rendimiento y fenología de tres genotipos de tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(1), 113-125.
- Courtis, A. (2014). *Crecimiento y desarrollo. Cátedra de Fisiología Vegetal*.
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252-261.
- Cuadra, C. d. (1992). *Germinación, latencia y dormición de las semillas*. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario, Madrid.
- Cuesta, A. (2007). *El cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", División de Agronomía, México.
- Custode, M. A. (2015). *Evaluación de tres híbridos de tomate determinado (Lycopersicum esculentum) a campo abierto, en la Finca Integral Limoncito, Provincia de Santa Elena*. Tesis, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil.
- Darquea, J. (2013). *Evaluación del comportamiento de injertos en rosas, de la variedad Freedom, realizadas con yemas ubicadas a diferentes alturas del tallo, Pedro Moncayo - Ecuador*. Tesis, Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Debergh, P., & Zimmerman, R. (1991). *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers., U.S.A.
- Delgado, G. X. (2013). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de Chuquiragua (Chuquiraga jussieu) a partir de yemas apicales y axilares*. Tesis, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí.
- Donoso y asociados. (2010). *Manejo Agronómico de Semillas Hortícolas. Tomate Riñón Tipo Daniela*. Obtenido de <http://www.hazera.co.il>.
- ESPAC. (2013). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*.

- FAO. (S/f). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/S>
- García , B. (2011). *Biorreguladores de crecimiento, fertilizantes químicos y orgánicos en tomate (Lycopersicon esculentum MILL.) de invernadero*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Escobedo, Nuevo León.
- García , L., Pérez , M., & Torres, D. (2015). Efecto de 6-BAP en la multiplicación in vitro de *Spathiphyllum wallisii* Regel . En *Bioteología Vegetal* (págs. 59-62). Santa Clara : Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
- Garzón, J. (2011). *Caracterización y evaluación morfoagronómica de la colección de tomate tipo Cherry*. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
- González, A. (2016). *Reproducción Asexual o Multiplicación vegetativa*. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema22/multiplicacion-vegetativa.htm>
- González, D. (2007). *Efectividad Biológica de un Fulvato de Fierro en la Calidad y Producción de Tomate Cherry (Lycopersicum esculentum Mill.) Var. Red Cherry*. Tesis , Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", México.
- Gutierrez, J. A. (1995). *Micropropagación de brotes de tomate (Lycopersicon sculentum Mill.) a partir de plántulas germinadas in vitro*. Tesis , Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Redalyc*, 31(4), 58-69.
- Jácome, A. (2011). *Micropropagación in vitro de la especie endémica: Jiguerón (Aegiphila ferruginea), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción*. Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí.
- Jordán , M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En F. Squeo, & L. Cardemil , *Fisiología Vegetal* (págs. 19-23). La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.

- Kaparakis , G., & Alderson, P. (2002). Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(2), 186-190.
- Krikorian, A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones . En *Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación* (pág. 65). Colombia.
- López , A., López, M., & Loaiza , C. (2016). Efecto de diferentes agentes gelificantes en la germinación y desarrollo in vitro de plántulas de Echinocactus platyacanthus link et otto (cactaceae). *Polibotánica*(42).
- Lucas, E. (2009). *Bioteología vegetal: aplicaciones del cultivo de meristemas apicales de tallo*. Córdoba: El Cid Editor.
- Maestu, E. (2018). *Regeneración de plantas en cultivo in vitro de tomate (Solanum lycopersium L.)*. Tesis de grado, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Marín, L. M. (2017). *Manual técnico del cultivo de tomate (Solanum Lycopersicum)*. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria , San José, Costa Rica.
- Martínez, J. (2012). Propagación y técnicas de cultivo del Tomate rojo o Jitomate (Lycopersicum esculentum). *Revista Vinculando*.
- Martínez, J., Virgen , J., Peña , M., & Santiago , A. (2010). Índice de Velocidad de emergencia en líneas de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(3).
- Mesa , D., Romero , A., & Cruz , A. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación de la Leucaena leucocephala vc Perú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36(3), 271-274.
- Montenegro, V. (2012). *Evaluación de la aclimatación de veinte y dos cultivares*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Escuela de Ingeniería Agronómica , Chimborazo.

- Morales, J. (2016). *Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro a partir de la semilla de Solanum caripense Dunal, para la obtención de plantas libres de bacterias y hongos*. Tesis , Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito.
- Murashige , T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. En *Physiologia Plantarum* (Vol. 15, págs. 473-497). Wisconsin.
- Olmos , S., Luciani, G., & Galdeano , E. (2010). Micropropagación. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (págs. 353 - 362). INTA.
- Osorio, J. R. (2014). *Establecimiento de cultivos in vitro de albacá (Ocimum basilicum) para la producción de aceite esencial*. Tesis , Universidad Autónoma del Estado de México, México.
- Pedroza-Manrique, J. A. (2009). Efecto del carbón activado, ácido indolacético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 17-32.
- Pincay, V. (2017). *Multiplificación in vitro de café caturra rojo Coffea arábica L. con la interacción de dos fitohormonas*. Tesis, Guayaquil, Ecuador.
- Proaño, J., & Briones, C. (2015). Gestión del riego y la salinidad en los cultivos de la Península de Santa Elena y la cuenca baja del Río Guayas. *SECSUELO*.
- Ramírez, G. (2013). *Evaluación agronómica bajo cubierta de tres híbridos de tomate riñón (Lycopersicon esculentum Mill.) en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas*. Tesis , Escuela Politécnica del Ejército , Departamento de Ciencias de la Vida , Santo Domingo.
- Ramírez, H. (2012). *Rutas: Organogénesis y Embriogénesis somática*.
- Ramírez, H., Lentini , Z., & Vallejo, F. (2009). Evaluación y selección de un protocolo para la regeneración in vitro de la variedad de tomate Unapal-Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(1), 29-33.

- Rodríguez , D., López, J., Rayas, A., Montano, N., Santos , A., Basail, M., . . . Medero, V. (2015). Embriogénesis somática en el cultivar de plátano ‘FHIA – 25’ (AAB) a partir de ápices meristemáticos. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 17(2), 65-75.
- Rodríguez, M. (2013). *Formación de embriones somáticos a partir de semillas inmaduras en sorgo (Sorghum bicolor) variedad CIAP 132-R*. Santa Clara, Cuba.
- Sánchez, J. (2017). *Generación de líneas T-DNA de tomate (Solanum lycopersicum) para la identificación de mutantes de inserción alterados en la morfogénesis y el desarrollo vegetal*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia .
- Sigarroa, A., & García, C. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Revistas UNAL*, 60(4).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 2). Los Ángeles : Publicaciones de la Universidad de Jaume .
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Vences, C. (2016). *Manual de prácticas*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Villareal, B. (2015). ¿Cómo se forman las nuevas plantas in vitro? En S. Sharry, M. Adema , & W. Abedini , *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos* (pág. 94). La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Viñas, M., & Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 13(2), 229-242.

ANEXOS

Tabla 1A. Velocidad de germinación de semillas de Materiales genéticos a los 3, 6, 9 días

Material Genético	Variable: Velocidad de germinación					
	Día 3		Día 6		Día 9	
	Plantas emergidas	Plantas no emergidas	Plantas emergidas	Plantas no emergidas	Plantas emergidas	Plantas no emergidas
Variedad Cherry	10	19	15	14	22	7
Variedad Floradade	6	23	11	18	14	15
Híbrido Micaela	12	17	22	7	24	5

Tabla 2A. Matriz de germinación de materiales genéticos

 UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS CARRERA AGROPECUARIA 													
Proyecto: Estudio y selección de híbridos y variedad de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivos introducidos en la provincia de Santa Elena													
Ficha N° 1	Variable: Porcentaje de germinación												
Material Genético	# Tubos	Días de Evaluación											
		1	%	3	%	6	%	9	%	12	%	15	%
Variedad Cherry	29	0	0	10	34	15	52	22	76	24	83	28	97
Variedad Floradade	29	0	0	6	21	11	38	14	48	18	62	27	93
Híbrido Micaela	29	0	0	12	41	22	76	24	83	26	90	29	100

Tabla 3A. Registro de Unidades experimentales, Variable Contaminación

 UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA DE SANTA ELENA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS CARRERA AGROPECUARIA 						
Proyecto: Estudio y selección de híbridos y variedad de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivos introducidos en la provincia de Santa Elena.						
Ficha Nº: 2		Variable: Contaminación				
TRATAMIENTOS	Explantes	Días de evaluación despues de la siembra				
		11 DDS	15 DDS	18 DDS	25 DDS	35 DDS
T1: V1M1	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	2	2	2	2
T2: V1M2	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1
T3: V1M3	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	2	2	2	2
	R5	1	1	2	2	2
T4: V1M4	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1
T5: V2M1	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	2	2
	R4	1	1	1	1	2
	R5	1	1	1	1	1
T6: V2M2	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	2	2	2	2
	R3	1	1	1	2	2
	R4	1	1	2	2	2
	R5	1	1	1	1	1
T7: V2M3	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	2	2	2	2
	R3	1	1	2	2	2
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1

T8: V2M4	R1	1	1	1	1	1
	R2	2	2	2	2	2
	R3	2	2	2	2	2
	R4	1	1	1	1	1
	R5	2	2	2	2	2
T9: V3M1	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1
T10: V3M2	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1
T11: V3M3	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	2	2	2	2
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	2	2	2	2
T12: V3M4	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	2	2	2
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	2	2	2	2
	R5	1	1	2	2	2
T13: V1M0	R1	2	2	2	2	2
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	1	2	2
	R5	1	1	1	2	2
T14: V2M0	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	2	2	2	2
	R3	1	1	1	2	2
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	2	2
T15: V3M0	R1	1	1	1	1	1
	R2	1	1	2	2	2
	R3	2	2	2	2	2
	R4	1	1	1	1	1
	R5	1	1	1	1	2

Tabla 4A. Escala de Contaminación

Estado	Valor
No contaminado	1
Contaminado	2

Tabla 5A. Número de unidades experimentales descartadas por evaluación

Material Genético	Días de evaluación				
	11	15	18	25	35
V1	1	4	5	8	6
V2	4	8	11	16	13
V3	1	5	9	9	8
Porcentaje	9	23	34	44	36

Tabla 6A. Medias de Factor A, Primera evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0,31	25	0,01	A
3	0,31	25	0,01	A
2	0,32	25	0,01	A

Tabla 7A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable contaminación

FACTOR B	Medias	n	E.E.	
3	0,3	15	0,01	A
2	0,3	15	0,01	A
1	0,3	15	0,01	A
5	0,33	15	0,01	A B
4	0,34	15	0,01	B

Tabla 8A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera Evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
3	1	0,3	5	0,02	A
2	5	0,3	5	0,02	A
2	3	0,3	5	0,02	A
3	4	0,3	5	0,02	A
3	3	0,3	5	0,02	A
3	2	0,3	5	0,02	A
2	2	0,3	5	0,02	A
1	3	0,3	5	0,02	A
1	2	0,3	5	0,02	A
1	1	0,3	5	0,02	A
1	4	0,3	5	0,02	A
2	1	0,3	5	0,02	A
3	5	0,34	5	0,02	A
1	5	0,34	5	0,02	A
2	4	0,42	5	0,02	B

Tabla 9A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,08	18	0	2,33	0,01
FACTOR A	0	2	0	1,12	0,33
FACTOR B	0,02	4	0,01	2,8	0,03
REPETICIÓN	0,01	4	0	0,7	0,6
FACTOR A*FACTOR B	0,05	8	0,01	3,22	0
Error	0,11	56	0		
Total	0,19	74			

Tabla 10A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0,32	25	0,02	A
3	0,33	25	0,02	A
2	0,35	25	0,02	A

Tabla 11A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable contaminación

FACTOR B	Medias	n	E.E.	
2	0,31	15	0,02	A
1	0,31	15	0,02	A
5	0,34	15	0,02	A
4	0,35	15	0,02	A
3	0,35	15	0,02	A

Tabla 12A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda Evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
3	2	0,3	5	0,03	A
2	1	0,3	5	0,03	A
3	1	0,3	5	0,03	A
1	4	0,3	5	0,03	A
1	2	0,3	5	0,03	A
3	4	0,34	5	0,03	A B
3	5	0,34	5	0,03	A B
2	3	0,34	5	0,03	A B
1	5	0,34	5	0,03	A B
1	3	0,34	5	0,03	A B
1	1	0,34	5	0,03	A B
2	2	0,34	5	0,03	A B
2	5	0,34	5	0,03	A B
3	3	0,38	5	0,03	A B
2	4	0,42	5	0,03	B

Tabla 13A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo		0,1	18	0,01	0,97	0,5
FACTOR A		0,01	2	0	0,64	0,53
FACTOR B		0,02	4	0,01	1,05	0,39
REPETICIÓN		0,02	4	0,01	1,05	0,39
FACTOR A*FACTOR B		0,05	8	0,01	0,98	0,46
Error		0,33	56	0,01		
Total		0,43	74			

Tabla 14A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0,33	25	0,02	A
3	0,36	25	0,02	A
2	0,36	25	0,02	A

Tabla 15A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable contaminación

FACTOR B	Medias	n	E.E.	
1	0,31	15	0,02	A
2	0,33	15	0,02	A
5	0,35	15	0,02	A
4	0,38	15	0,02	A
3	0,38	15	0,02	A

Tabla 16A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera Evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
1	4	0,3	5	0,04	A
3	2	0,3	5	0,04	A
2	1	0,3	5	0,04	A
1	2	0,3	5	0,04	A
3	1	0,3	5	0,04	A
2	5	0,34	5	0,04	A
1	1	0,34	5	0,04	A
1	5	0,34	5	0,04	A
3	5	0,38	5	0,04	A
3	3	0,38	5	0,04	A
1	3	0,38	5	0,04	A
2	2	0,38	5	0,04	A
2	3	0,38	5	0,04	A
2	4	0,42	5	0,04	A
3	4	0,42	5	0,04	A

Tabla 17A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,19	18	0,01	1,58	0,1
FACTOR A	0,01	2	0,01	1,03	0,36
FACTOR B	0,06	4	0,01	2,06	0,1
REPETICIÓN	0,06	4	0,01	2,06	0,1
FACTOR A*FACTOR B	0,07	8	0,01	1,23	0,3
Error	0,38	56	0,01		
Total	0,57	74			

Tabla 18A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
1	0,35	25	0,02	A
3	0,36	25	0,02	A
2	0,4	25	0,02	A

Tabla 19A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable contaminación

FACTOR B	Medias	n	E.E.		
1	0,33	15	0,02	A	
2	0,34	15	0,02	A	B
4	0,38	15	0,02	A	B
3	0,38	15	0,02	A	B
5	0,41	15	0,02		B

Tabla 20A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
3	1	0,3	5	0,04	A
1	4	0,3	5	0,04	A
3	2	0,3	5	0,04	A
1	2	0,3	5	0,04	A
2	1	0,34	5	0,04	A
1	1	0,34	5	0,04	A
2	3	0,38	5	0,04	A
3	5	0,38	5	0,04	A
1	3	0,38	5	0,04	A
3	3	0,38	5	0,04	A
3	4	0,42	5	0,04	A
2	2	0,42	5	0,04	A
2	4	0,42	5	0,04	A
2	5	0,42	5	0,04	A
1	5	0,42	5	0,04	A

Tabla 21A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,24	18	0,01	1,75	0,06
FACTOR A	0,03	2	0,02	2,17	0,12
FACTOR B	0,06	4	0,02	2,1	0,09
REPETICIÓN	0,07	4	0,02	2,27	0,07
FACTOR A*FACTOR B	0,07	8	0,01	1,21	0,31
Error	0,43	56	0,01		
Total	0,67	74			

Tabla 22A. Medias de Factor A, Quinta evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	Medias	n	E.E.		
1	0,35	25	0,02	A	
3	0,36	25	0,02	A	B
2	0,4	25	0,02		B

Tabla 23A. Medias de Factor B, Quinta evaluación, Variable contaminación

FACTOR B	Medias	n	E.E.		
2	0,34	15	0,02	A	
1	0,34	15	0,02	A	
4	0,38	15	0,02	A	B
3	0,38	15	0,02	A	B
5	0,42	15	0,02		B

Tabla 24A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Quinta Evaluación, Variable contaminación

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
1	2	0,3	5	0,04	A
3	1	0,3	5	0,04	A
3	2	0,3	5	0,04	A
1	4	0,3	5	0,04	A
1	1	0,34	5	0,04	A
3	3	0,38	5	0,04	A
2	3	0,38	5	0,04	A
1	3	0,38	5	0,04	A
2	1	0,38	5	0,04	A
2	2	0,42	5	0,04	A
3	4	0,42	5	0,04	A
3	5	0,42	5	0,04	A
2	5	0,42	5	0,04	A
2	4	0,42	5	0,04	A
1	5	0,42	5	0,04	A

Tabla 25A. Análisis de varianza, Quinta evaluación, Variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,26	18	0,01	1,84	0,04
FACTOR A	0,04	2	0,02	2,68	0,08
FACTOR B	0,07	4	0,02	2,17	0,08
REPETICIÓN	0,08	4	0,02	2,51	0,05
FACTOR A*FACTOR B	0,07	8	0,01	1,14	0,35
Error	0,43	56	0,01		
Total	0,69	74			

Tabla 26A. Registro de cambios morfológicos presentes en las unidades experimentales

 UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA DE SANTA ELENA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS CARRERA AGROPECUARIA 						
Proyecto: Estudio y selección de híbridos y variedad de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) tolerantes al estrés hídrico a partir de cultivos introducidos en la provincia de Santa Elena.						
Ficha Nº: 4		Variable: Porcentaje de Contaminación				
TRATAMIENTOS	Explantos	Días de evaluación despues de la siembra				
		6 DDS	12 DDS	18 DDS	24 DDS	30 DDS
T1: V1M1	R1	2	3	4	5	5
	R2	3	4	4	4	4
	R3	3	3	4	4	4
	R4	3	4	4	4	4
	R5	3	4	4	4	4
T2: V1M2	R1	3	4	4	4	4
	R2	3	4	4	4	4
	R3	2	4	4	4	4
	R4	3	3	4	4	4
	R5	3	4	4	4	4
T3: V1M3	R1	2	3	3	3	3
	R2	1	3	3	3	3
	R3	3	4	4	4	4
	R4	2	3	3	3	3
	R5	3	3	3	3	3
T4: V1M4	R1	1	1	3	3	3
	R2	1	3	3	3	3
	R3	3	3	3	3	3
	R4	2	3	3	3	3
	R5	2	3	3	3	3
T5: V2M1	R1	2	3	3	3	3
	R2	2	3	3	3	3
	R3	2	3	3	3	3
	R4	2	3	3	3	3
	R5	2	3	3	3	3
T6: V2M2	R1	1	1	1	1	3
	R2	1	1	1	1	1
	R3	2	3	3	3	3
	R4	2	3	3	3	3
	R5	2	3	3	3	3
T7: V2M3	R1	2	2	2	2	2
	R2	2	3	3	3	3
	R3	2	2	2	2	2
	R4	1	3	3	3	3
	R5	2	3	3	3	3

T8: V2M4	R1	1	1	3	3	3
	R2	1	1	1	1	1
	R3	1	1	1	1	1
	R4	1	1	3	3	3
	R5	1	1	1	1	1
T9: V3M1	R1	3	3	3	3	3
	R2	3	3	4	4	3
	R3	3	3	4	4	3
	R4	3	3	4	4	3
	R5	3	3	3	3	3
T10: V3M2	R1	3	3	3	4	3
	R2	3	3	3	3	3
	R3	3	3	4	4	3
	R4	3	3	4	4	3
	R5	2	3	3	3	3
T11: V3M3	R1	1	1	1	1	3
	R2	3	3	3	3	1
	R3	1	1	1	1	3
	R4	3	3	3	4	3
	R5	2	1	1	1	1
T12: V3M4	R1	1	2	2	2	3
	R2	2	2	2	2	2
	R3	1	1	1	1	3
	R4	3	3	3	3	1
	R5	1	1	1	1	1
T13: V1M0	R1	1	1	1	1	1
	R2	3	4	4	5	5
	R3	3	4	4	5	5
	R4	3	4	4	4	5
	R5	3	4	4	4	5
T14: V2M0	R1	3	4	4	4	4
	R2	3	3	4	4	4
	R3	3	4	4	4	4
	R4	3	4	4	4	4
	R5	3	4	4	4	4
T15: V3M0	R1	3	4	4	5	5
	R2	3	4	4	5	5
	R3	1	1	1	1	1
	R4	3	3	4	4	5
	R5	3	3	4	5	5

Tabla 27A. Medias de Factor A, Primera evaluación, 6 días, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
2	0,46	25	0,02	A
3	0,52	25	0,02	B
1	0,53	25	0,02	B

Tabla 28A. Medias de Factor B, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
4	0,38	15	0,02	A		
3	0,47	15	0,02		B	
2	0,53	15	0,02		B	C
5	0,56	15	0,02			C
1	0,56	15	0,02			C

Tabla 29A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Primera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.					
2	4	0,3	5	0,04	A				
3	4	0,4	5	0,04	A	B			
2	2	0,42	5	0,04	A	B	C		
1	4	0,44	5	0,04		B	C	D	
3	3	0,46	5	0,04		B	C	D	E
2	3	0,46	5	0,04		B	C	D	E
2	1	0,5	5	0,04		B	C	D	E
1	3	0,5	5	0,04		B	C	D	E
3	5	0,54	5	0,04			C	D	E
1	5	0,54	5	0,04			C	D	E
1	2	0,58	5	0,04				D	E
3	2	0,58	5	0,04				D	E
1	1	0,58	5	0,04				D	E
3	1	0,6	5	0,04					E
2	5	0,6	5	0,04					E

Tabla 30A. Análisis de varianza, Primera evaluación, Variable Respuesta morfológica

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,58	18	0,03	3,66	0
FACTOR A	0,07	2	0,04	4,2	0
FACTOR B	0,35	4	0,09	9,75	0
REPETICIÓN	0,06	4	0,01	1,58	0,2
FACTOR A*FACTOR B	0,11	8	0,01	1,53	0,2
Error	0,5	56	0,01		
Total	1,08	74			

Tabla 31A. Medias de Factor A, Segunda evaluación, 12 días, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
2	0,52	25	0,02	A
3	0,53	25	0,02	A
1	0,62	25	0,02	B

Tabla 32A. Medias de Factor B, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
4	0,43	15	0,03	A		
3	0,53	15	0,03		B	
2	0,59	15	0,03		B	C
1	0,62	15	0,03			C
5	0,63	15	0,03			C

Tabla 33A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Segunda Evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.					
2	4	0,3	5	0,04	A				
3	3	0,42	5	0,04	A	B			
3	4	0,44	5	0,04		B	C		
2	2	0,48	5	0,04		B	C	D	
1	4	0,54	5	0,04		B	C	D	E
2	3	0,56	5	0,04		B	C	D	E
3	5	0,58	5	0,04			C	D	E
3	1	0,6	5	0,04				D	E
3	2	0,6	5	0,04				D	E
2	1	0,6	5	0,04				D	E
1	3	0,62	5	0,04				D	E
1	5	0,62	5	0,04				D	E
1	1	0,66	5	0,04					E
1	2	0,68	5	0,04					E
2	5	0,68	5	0,04					E

Tabla 34A. Análisis de varianza, Segunda evaluación, Variable Respuesta morfológica

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,88	18	0,05	4,83	0
FACTOR A	0,16	2	0,08	7,95	0
FACTOR B	0,41	4	0,1	10,13	0
REPETICIÓN	0,08	4	0,02	1,96	0,11
FACTOR A*FACTOR B	0,23	8	0,03	2,84	0,01
Error	0,56	56	0,01		
Total	1,44	74			

Tabla 35A. Medias de Factor A, Tercera evaluación, 18 días, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
2	0,55	25	0,02	A
3	0,56	25	0,02	A
1	0,65	25	0,02	B

Tabla 36A. Medias de Factor B, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
4	0,49	15	0,03	A		
3	0,53	15	0,03	A	B	
2	0,61	15	0,03		B	C
5	0,65	15	0,03			C
1	0,65	15	0,03			C

Tabla 37A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Tercera Evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.			
2	4	0,42	5	0,05	A		
3	3	0,42	5	0,05	A		
3	4	0,44	5	0,05	A		
2	2	0,48	5	0,05	A	B	
2	3	0,56	5	0,05	A	B	C
2	1	0,6	5	0,05		B	C
1	4	0,6	5	0,05		B	C
3	5	0,62	5	0,05		B	C
1	3	0,62	5	0,05		B	C
1	5	0,62	5	0,05		B	C
3	2	0,64	5	0,05			C
3	1	0,66	5	0,05			C
1	1	0,7	5	0,05			C
1	2	0,7	5	0,05			C
2	5	0,7	5	0,05			C

Tabla 38A. Análisis de varianza, Tercera evaluación, Variable Respuesta morfológica

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,78	18	0,04	3,98	0
FACTOR A	0,15	2	0,07	6,75	0
FACTOR B	0,32	4	0,08	7,31	0
REPETICIÓN	0,08	4	0,02	1,94	0,12
FACTOR A*FACTOR B	0,23	8	0,03	2,65	0,02
Error	0,61	56	0,01		
Total	1,39	74			

Tabla 39A. Medias de Factor A, Cuarta evaluación, 24 días, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
2	0,55	25	0,02	A
3	0,58	25	0,02	A
1	0,66	25	0,02	B

Tabla 40A. Medias de Factor B, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
4	0,49	15	0,03	A		
3	0,54	15	0,03	A	B	
2	0,61	15	0,03		B	C
1	0,66	15	0,03			C
5	0,68	15	0,03			C

Tabla 41A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Cuarta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

ACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.				
2	4	0,42	5	0,05	A			
3	3	0,44	5	0,05	A	B		
3	4	0,44	5	0,05	A	B		
2	2	0,48	5	0,05	A	B	C	
2	3	0,56	5	0,05	A	B	C	D
2	1	0,6	5	0,05		B	C	D
1	4	0,6	5	0,05		B	C	D
1	3	0,62	5	0,05			C	D
3	1	0,66	5	0,05				D
3	2	0,66	5	0,05				D
1	5	0,66	5	0,05				D
3	5	0,68	5	0,05				D
1	2	0,7	5	0,05				D
2	5	0,7	5	0,05				D
1	1	0,72	5	0,05				D

Tabla 42A. Análisis de varianza, Cuarta evaluación, Variable Respuesta morfológica

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,83	18	0,05	3,33	0
FACTOR A	0,16	2	0,08	5,8	0,01
FACTOR B	0,4	4	0,1	7,18	0
REPETICIÓN	0,08	4	0,02	1,36	0,26
FACTOR A*FACTOR B	0,2	8	0,02	1,78	0,1
Error	0,78	56	0,01		
Total	1,61	74			

Tabla 43A. Medias de Factor A, Quinta evaluación, 30 días, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	Medias	n	E.E.	
2	0,56	25	0,02	A
3	0,57	25	0,02	A
1	0,67	25	0,02	B

Tabla 44A. Medias de Factor B, Quinta evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR B	Medias	n	E.E.			
4	0,49	15	0,03	A		
3	0,55	15	0,03	A	B	
2	0,61	15	0,03		B	C
1	0,64	15	0,03		B	C
5	0,7	15	0,03			C

Tabla 45A. Medias de Interacción Factor A* Factor B, Quinta Evaluación, Variable Respuesta morfológica

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.				
2	4	0,42	5	0,05	A			
3	4	0,46	5	0,05	A	B		
3	3	0,48	5	0,05	A	B		
2	2	0,54	5	0,05	A	B	C	
2	3	0,56	5	0,05	A	B	C	D
3	1	0,6	5	0,05		B	C	D
3	2	0,6	5	0,05		B	C	D
1	4	0,6	5	0,05		B	C	D
2	1	0,6	5	0,05		B	C	D
1	3	0,62	5	0,05		B	C	D
1	2	0,7	5	0,05			C	D
2	5	0,7	5	0,05			C	D
3	5	0,7	5	0,05			C	D
1	5	0,7	5	0,05			C	D
1	1	0,72	5	0,05				D

Tabla 46A. Análisis de varianza, Quinta evaluación, Variable Respuesta morfológica

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,65	18	0,04	2,59	0	
FACTOR A	0,17	2	0,09	6,19	0	
FACTOR B	0,38	4	0,1	6,77	0	
REPETICIÓN	0,02	4	0,01	0,4	0,8	
FACTOR A*FACTOR B	0,08	8	0,01	0,7	0,69	
Error	0,79	56	0,01			
Total	1,44	74				

Tabla 47A. Medias de Factor B, en Evaluaciones con significancia, Variable contaminación

Factor B	Eval. 1	Eval. 3	Eval. 4	Eval. 5
M1	0,3	0,31	0,33	0,34
M2	0,3	0,33	0,34	0,34
M3	0,3	0,38	0,38	0,38
M4	0,34	0,38	0,38	0,38
M5	0,33	0,35	0,41	0,42

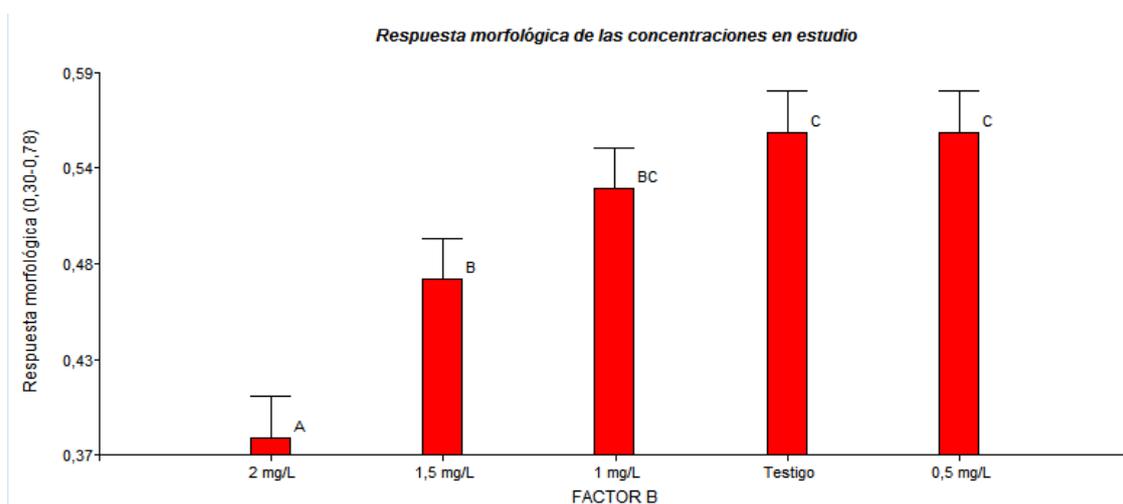


Figura 1A. Respuesta morfológica de las Unidades Experimentales en base a las dosis establecidas en la Primera evaluación

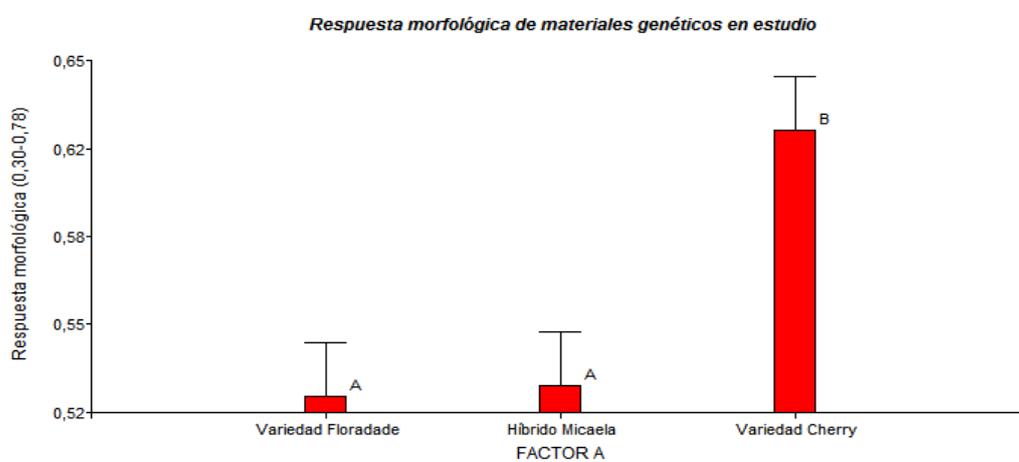


Figura 2A. Respuesta morfológica de los materiales en estudio a los 12 días de evaluación

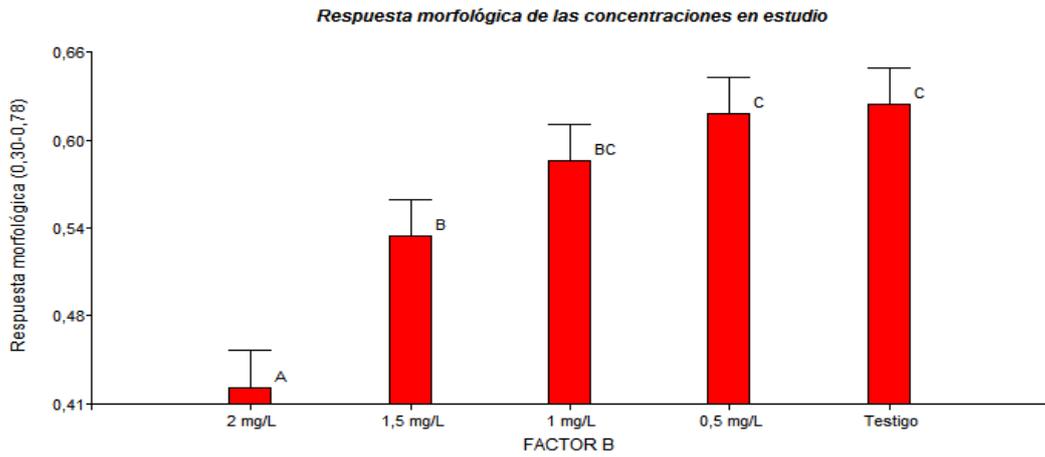


Figura 3A. Respuesta morfológica (Datos transformados a Log (x+1) del Cultivo *in vitro* de acuerdo a las dosis en estudio

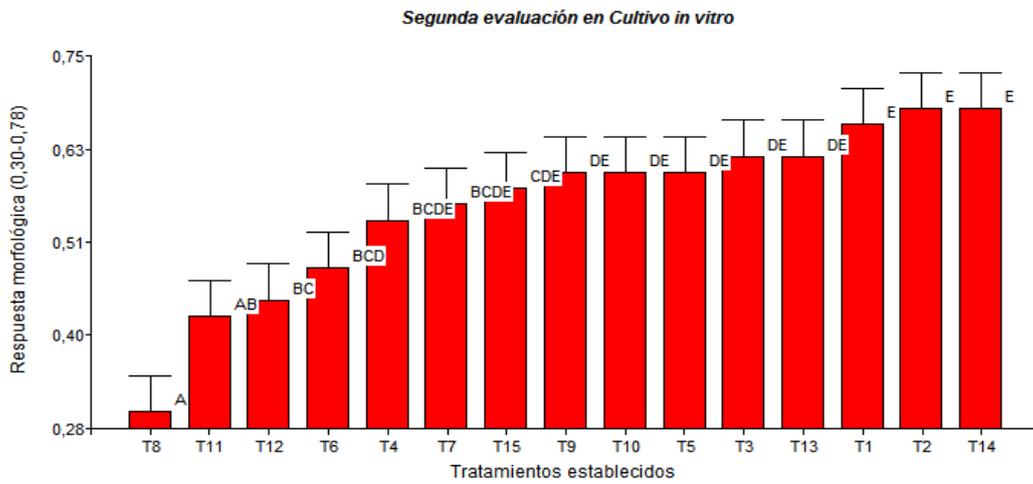


Figura 4A. Resultados de la Interacción Factor A * Factor B en la Segunda evaluación, 12 días de la variable Respuesta morfológica

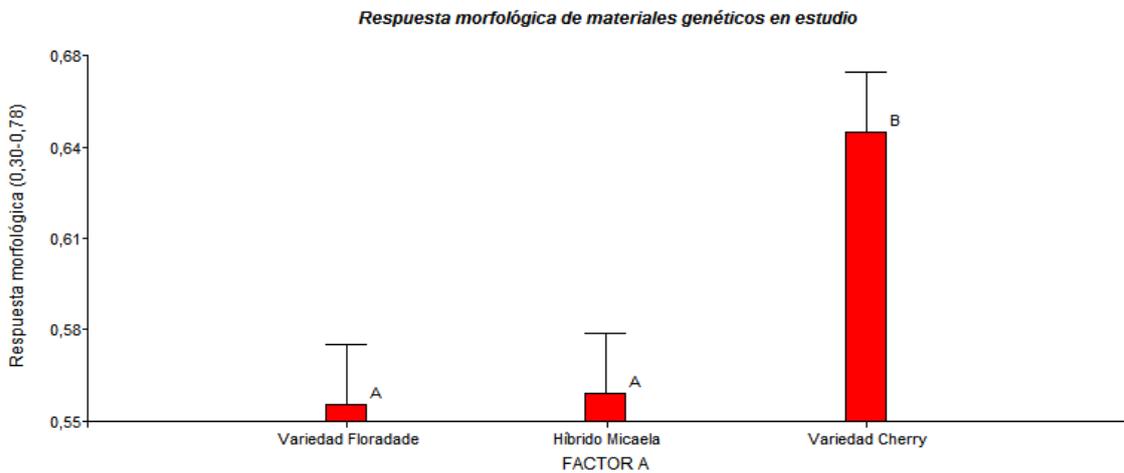


Figura 5A. Respuesta morfológica (Transformadas a Log(x+1) de los materiales genéticos en estudio en la Tercera evaluación

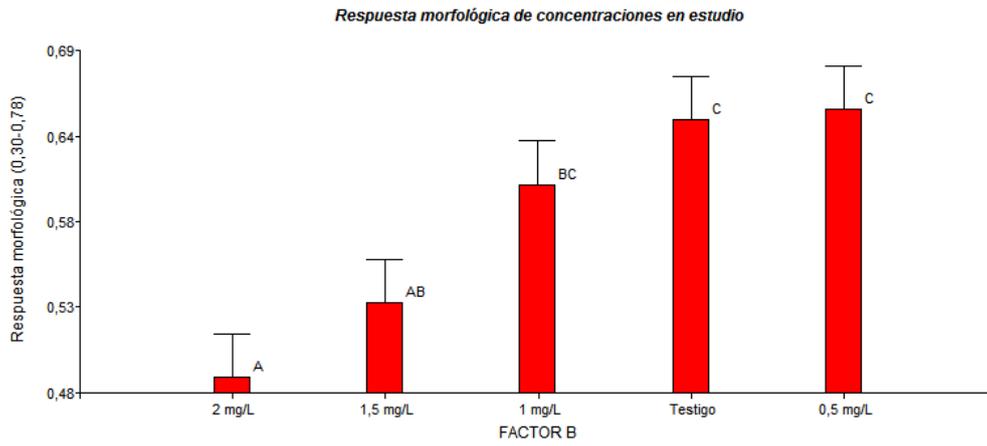


Figura 6A. Cambios morfológicos en base a las dosis de estudio, Tercera evaluación

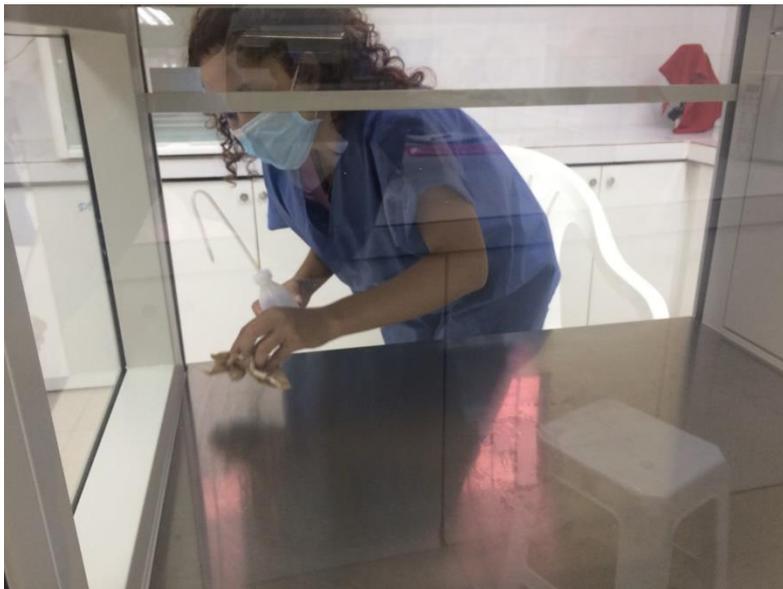


Figura 7A. Limpieza de Cámara de Flujo laminar previo al establecimiento de cultivo



Figura 8A. Preparación de medio de cultivo



Figura 9A. Germinación del material genético Micaela, a los 6 días de evaluación

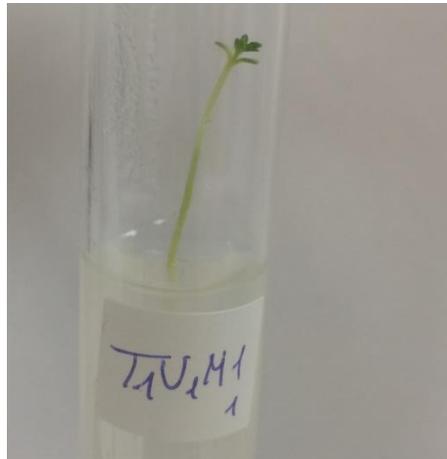


Figura 10A. Unidad experimental, variedad Cherry en fase B, elongación de explante



Figura 11A. Unidad experimental, variedad Cherry en fase D, presencia de yemas adventicias



Figura 12A. Unidad experimental, Testigo, Híbrido Micaela en fase D, presencia de yemas adventicias



Figura 13A. Unidad experimental, Testigo, Variedad Cherry en fase D, presencia de yemas adventicias



Figura 14A. Unidad experimental, Testigo, Variedad Floradade en fase D, presencia de yemas adventicias

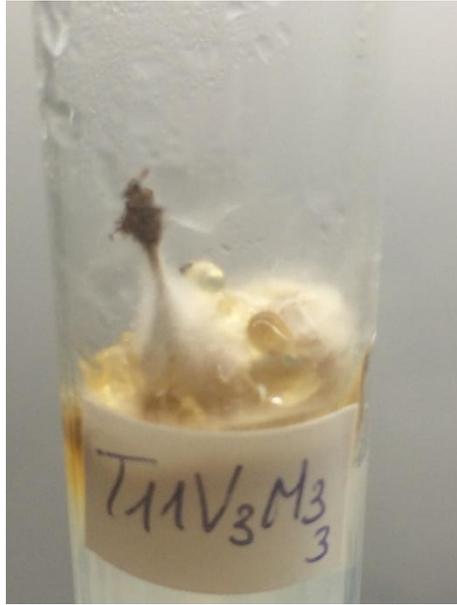


Figura 15A. Contaminación fúngica de Unidad experimental, Híbrido Micaela