



Universidad Estatal Península de Santa Elena

Facultad de Ciencias Agrarias

Carrera de Agropecuaria



**PRODUCCIÓN DE BROTES DE GENOTIPOS DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum*) A PARTIR DE LA
MICROPROPAGACIÓN DE MERISTEMAS APICALES**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autor: Montoya Bonilla Katty Vanessa

La Libertad, 2020



**Universidad Estatal Península de Santa
Elena**

Facultad de Ciencias Agrarias

Carrera de Agropecuaria



**PRODUCCIÓN DE BROTES DE GENOTIPOS DE
TOMATE (*Solanum lycopersicum*) A PARTIR DE LA
MICROPROPAGACIÓN DE MERISTEMAS APICALES**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

Autor: Montoya Bonilla Katty Vanessa

Tutor: Ing. Lourdes Ortega M. MSc.

La Libertad, 2020

TRIBUNAL DE GRADO



Ing. Néstor Lozano, PhD.
**DECANO (E) DE LA FACULTAD
CIENCIAS AGRARIAS
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**




Ing. Nadia Quevedo Pinos, PhD.
**DIRECTORA DE CARRERA
AGROPECUARIA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blgo. Javier Soto Valenzuela, MSc.
**PROFESOR DEL ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Ing. Lourdes Ortega M. MSc.
**PROFESOR TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Abg. Víctor Coronel Ortiz, Mgt.
SECRETARIO GENERAL (E)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana, por estar en cada momento que he necesitado de su apoyo moral, intelectual y económico, porque me educaron con buenos valores.

A mis profesoras encargadas de esta investigación Ing. Lourdes Ortega y la Ing. Clotilde Andrade, por haber compartido sus conocimientos en este proceso.

A mis compañeros del proyecto de titulación por estar pendientes durante el proceso del ensayo.

A mis amigos y compañeros de clases por las risas compartidas y por su apoyo constante en todo momento de vida universitaria.

Katty Vanessa Montoya Bonilla

DEDICATORIA

Dedicado especialmente a mi familia que me apoyaron para seguir adelante en esta etapa muy importante de mi vida, dándome consejos, ayudando en lo que se pueda, durante los años de mi carrera profesional, para mantener la constancia y no decaer ante las circunstancias adversas.

Con humildad y respeto dedico también a los futuros estudiantes que les sirva como guía para estimular e incentivar el interés por esta ciencia que la considero muy útil y necesaria para el beneficio de la humanidad.

Katty Vanessa Montoya Bonilla

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un vegetal que pertenece a la familia de las solanáceas con una alta diversidad genética diferenciándose de color, forma y sabor por lo que tiene mucha acogida en el comercio a nivel mundial, en Ecuador el rendimiento promedio es de 730 qq/Ha. Una forma de mejoramiento genético en plantas de tomate es la micropropagación denominada propagación clonal, que ayuda a obtener plantas genéticamente idénticas mediante el uso de sus hipocótilos, cotiledones, hojas, yemas, ápices, segmento de tallo, meristemas, etc., conservando las características de la planta madre, sembradas en ambientes controlados (estériles) con el uso de medios de cultivo que contiene carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos, produciendo materiales libres de bacterias y hongos. En este estudio, se evaluó la producción de brotes de *Solanum lycopersicum* a partir de la micropropagación, se trabajó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4, utilizando tres materiales genéticos: Línea UPSE-19, Línea UPSE-78, e Híbrido Micaela HA1903. Aplicando cuatro dosis de citocininas con auxinas, 0.00 mg.l⁻¹ (M1); 0.40 mg.l⁻¹ citocinina & 0.25 mg.l⁻¹ auxina (M2); 0.60 mg.l⁻¹ citocinina & 0.28 mg.l⁻¹ auxina (M3) y 0.65 mg.l⁻¹ citocinina & 0.26 mg.l⁻¹ auxina (M4). El medio con hormonas más destacado fue el M2; obteniendo un promedio de 1.83 brotes/explante, sin embargo, el testigo (M1) generó más brotes alcanzando un promedio de 2.70.

Palabras claves: *Solanum lycopersicum*, cultivo *in vitro*, micropropagación, medio de cultivo.

ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is a vegetable that belongs to the family of Solanaceae with a high genetic diversity differentiating from color, shape, and flavor, so it has very well received in trade worldwide. In Ecuador, the average yield is 730 qq/Ha. Micropropagation called clonal propagation helps to obtain genetically identical plants by using their hypocotyls, cotyledons, leaves, buds, apexes, stem segment, meristem, etc., preserving the characteristics of the parent plant, planted in controlled environments (sterile) with the use of culture medium containing carbon, nitrogen, inorganic salts, growth regulators, vitamins and amino acids, producing materials free of bacteria and fungi. This study evaluated the production of *Solanum lycopersicum* sprouts from micropropagation. It worked with a completely random design with 3x4 factorial arrangement, using three genetic materials: Line UPSE-19, Line UPSE-78, and Hybrid Micaela HA1903. Applying four doses of cytokines with auxins, 0.00 mg.l⁻¹ (M1); 0.40 mg.l⁻¹ cytokinin & 0.25 mg.l⁻¹ auxin (M2); 0.60 mg.l⁻¹ cytokinin & 0.28 mg.l⁻¹ auxin (M3) and 0.65 mg.l⁻¹ cytokinin & 0.26 mg.l⁻¹ auxin (M4). The most prominent hormone medium was M2; obtaining an average of 1.83 shoots/explant, however, the witness (M1) generated more shoots reaching an average of 2.70.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *in vitro* crop, micropropagation, culture medium

“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”.

A handwritten signature in blue ink, reading "Kathy Montoya B", is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Firma digital del estudiante

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Importancia del cultivo de tomate <i>Solanum lycopersicum</i>	5
1.2 Fisiología del tomate	5
1.3 Mejora genética del tomate	6
1.4 Distribución en Ecuador y sus usos	7
1.5 Producción de tomate <i>in vitro</i>	9
1.6 Cultivos <i>in vitro</i>	10
1.6.1 Totipotencialidad celular	10
1.6.2 Desdiferenciación celular	11
1.7 Medio de cultivo	11
1.7.1 Componentes del medio de cultivo.....	12
1.8 Micropropagación	18
1.8.1 Edad del explante.....	19
1.8.2 Luz y Fotoperiodo.....	19
1.9 Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	20
1.9.1 Elección de explante	20
1.9.2 Desinfección	20
1.9.3 Establecimiento <i>in vitro</i>	21
1.9.4 Multiplicación de brotes	21
1.9.5 Enraizamiento	22
1.9.6 Aclimatación.....	22
1.10 Agentes contaminantes	23
1.11 Oxidación fenólica.....	24

1.12	Vitrificación.....	25
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		26
2.1	Ubicación y descripción del lugar del experimento	26
2.2	Materiales y equipos	26
2.2.1	Material genético	26
2.2.2	Materiales de laboratorio	28
2.3	Diseño experimental y tratamientos.....	29
2.3.1	Tratamientos	29
2.3.2	Diseño experimental	30
2.3.3	Análisis estadístico	30
2.3.4	Delineamiento experimental	31
2.3.5	Conversión de datos a logaritmo y raíz cuadrada	31
2.4	Manejo del experimento.....	31
2.4.1	Asepsia de instrumentos	31
2.4.2	Esterilización de los materiales de laboratorio	32
2.4.3	Esterilización de semillas.....	32
2.4.4	Pre-germinación de semillas	33
2.4.5	Preparación de medio de cultivo para germinación (M1).....	34
2.4.6	Siembra de semillas	35
2.4.7	Preparación de medio para siembra de explantes (M2)	36
2.4.8	Siembra de meristemas apicales	36
2.5	Variables Experimentales.....	37
2.5.1	Porcentaje de explantes con contaminación visible.....	37
2.5.2	Porcentaje de Oxidación o Necrosis	37
2.5.3	Longitud de la plántula	38
2.5.4	Porcentaje de explantes que responden a cada medio de cultivo	38

2.5.5	Promedio de brotes por explante	38
2.5.6	Número de explantes que forman plantas completas.....	39
2.5.7	Promedio del número de hojas.....	39
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		40
3.1	Porcentaje de explantes con contaminación visible	40
3.2	Porcentaje de Oxidación o Necrosis	41
3.3	Longitud de la plántula.....	42
3.4	Porcentaje de explantes que responden a cada medio de cultivo.....	46
3.5	Promedio de brotes por explante.....	47
3.6	Número de explantes que forman plantas completas.....	49
3.7	Promedio del número de hojas	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		51
	<i>Conclusiones</i>	51
	<i>Recomendaciones</i>	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> en Ecuador.....	7
Tabla 2. Precios de tomate riñón a campo abierto.....	8
Tabla 3. Valores nutricionales de tomate.....	9
Tabla 4. Multiplicación de brotes.	22
Tabla 5. Aclimatación de plántulas en vivero.....	23
Tabla 6. Características agronómicas de la Línea UPSE-78.....	27
Tabla 7. Características agronómicas de la Línea UPSE-19.....	27
Tabla 8. Características agronómicas del Híbrido MICAELA HA-1903.....	28
Tabla 9. Material genético y sus concentraciones de hormonas.....	29
Tabla 10. Número de tratamientos y repeticiones.	30
Tabla 11. Análisis estadístico.	30
Tabla 12. Componentes del M1.....	34
Tabla 13. Insumos del M2.	36
Tabla 14. Escala de porcentaje de oxidación o necrosis.....	38
Tabla 15. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable longitud de la plántula (mm) de <i>Solanum lycopersicum</i> en Factor A (Material genético) en cuatro días evaluados.	42
Tabla 16. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable Longitud de la plántula (mm) de <i>Solanum lycopersicum</i> en el Factor B (Medio de cultivo) en cuatro días evaluados.	43
Tabla 17. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable longitud de la plántula (mm) de <i>Solanum lycopersicum</i> en Factor A*B (MG*MC) en cuatro días evaluados.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plántula de tomate.	6
Figura 2. Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIB) UPSE.....	26
Figura 3. a. Limpieza de instrumentos de laboratorio, b. Lavado de materiales, c. Secado de materiales.....	32
Figura 4. a. Materiales esterilizados, b. Esterilización del material en la estufa, c. Destilación de agua.....	32
Figura 5. Desinfección de semillas.....	33
Figura 6. a. Incubación de semillas, b. Muestras de semillas pre-germinadas.....	33
Figura 7. a. Pesaje de insumos, b. Preparación de medios de cultivo, c. Medio de cultivo listo para dispensar.	35
Figura 8. a. Semillas germinadas, b. Siembra de semillas.....	35
Figura 9. a. Plántulas de UPSE-78, UPSE-19 y MICAELA; b. Cortes de explantes de UPSE-78, UPSE-19 y MICAELA; c. Siembra de explantes.....	37
Figura 10. Porcentaje de contaminación en medios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum lycopersicum</i> evaluado a los 19 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.....	40
Figura 11. Porcentaje de oxidación en medios de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum lycopersicum</i> a los 26 días de evaluación, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.	41
Figura 12. Resultados de cuatro evaluaciones de la longitud de la plántula <i>in vitro</i> de <i>Solanum lycopersicum</i> , en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78 (Factor A).....	43
Figura 13. Resultados de la longitud de la plántula <i>in vitro</i> de <i>Solanum lycopersicum</i> en cuatro días evaluados, en los medios de cultivo MC1 (testigo), MC2, MC3 y MC4 (Factor B).....	44

Figura 14. Longitud de la plántula en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* en cuatro días evaluados, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas. 45

Figura 15. Porcentaje de explantes que responden a los medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas. 46

Figura 16. Promedio de brotes por explante en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas. 47

Figura 17. Número de explantes que forman plantas completas en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* a los 26 días de evaluación, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas. 49

Figura 18. Promedio del número de hojas en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas. 50

ÍNDICE DE ANEXOS

Glosario	56
Tabla 1A. Presupuesto de materiales de laboratorio.....	57
Tabla 2A. Presupuesto de Insumos de laboratorio.....	58
Tabla 3A. Presupuesto de equipos de laboratorio.....	58
Tabla 4A. Presupuesto total del experimento.	58
Tabla 5A. Resultados semanales de las variables evaluadas durante el establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. lycopersicum</i>	59
Tabla 6A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 5).....	64
Tabla 7A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 12).....	65
Tabla 8A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 19).....	66
Tabla 9A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 26).....	67
Tabla 10A. Proceso del ensayo.....	68

INTRODUCCIÓN

La producción de brotes *in vitro* de (*Solanum lycopersicum*) se fundamenta en el aislamiento de tejidos vegetales (ápices caulinares), según Pelacho et al. (2006), que además indica que esta técnica permite cultivar en condiciones estériles una parte vegetal, desarrollándose en medios nutritivos artificiales y libres de microorganismos, empleando reguladores de crecimiento para el desarrollo de plántulas completamente asépticas. Cabe recalcar que la totipotencia celular permite el desarrollo potencial de dicho organismo, de acuerdo con Contreras (2013), se puede regenerar una planta completa desde un meristema o cualquier tejido de la planta.

Según Polo (2014), el pionero de los cultivos *in vitro* fue Haberlandt, quien en 1902 mencionó que era posible cultivar células vegetales juntas agregando soluciones nutritivas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios. Así mismo, otros fundadores de la biotecnología vegetal, como lo son White y Gautheret, identificaron a las auxinas como reguladoras naturales de crecimiento vegetal y el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas.

A nivel mundial se han desarrollado diversidad de estudios de cultivos *in vitro*, según lo menciona Rodríguez y Torres (2018), como la aplicación en la industria farmacéutica; usando plantas medicinales con el fin de aumentar el número y la calidad de metabolitos secundarios mediante su manipulación, facilitando el descubrimiento de nuevos compuestos bioquímicos, y aunque su costo de producción es elevado, sus resultados a largo plazo resultan favorables y compensatorios.

En Ecuador, existen investigaciones, proyectos y empresas que se dedican al desarrollo de plantas *in vitro*, con el fin de mejorar la producción a través de nuevas variedades genéticas. Ortiz (2018), indica que en Ecuador se puede realizar plantas de cultivos *in vitro* teniendo una oportunidad de producción a bajo costo y libre de enfermedades genéticas, e inclusive es una oportunidad de obtener mayores ingresos para el país a través de la exportación.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) contiene valores nutricionales como vitamina C (21 mg), calcio (12 mg), fósforo (25 mg), ácido fólico (39 mg), entre otros; que son muy importantes para la alimentación de las personas siendo una de las hortalizas con mayor producción a nivel nacional y mundial; por ello como alternativa la producción *in vitro* de *Solanum lycopersicum* es una excelente opción para generar plantas de buena calidad a corto plazo supliendo el método tradicional que permiten cultivar plántulas en laboratorio con una temperatura de 22 a 26 °C, humedad relativa de 67 a 73% y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a partir de una planta madre mediante medios axénicos artificiales en condiciones estériles para prevenir contaminaciones.

La micropropagación es una técnica que tiene como objetivo clonar plantas idénticas con la utilización de cotiledones, hipocótilos, hojas, yemas, ápices, meristemas, semillas, etc., que son cultivados en cámaras de cultivo (ambiente controlado) usando frascos con medios de cultivo (mezcla de sustancia acuosa) requeridos de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agente gelificante y fitohormonas, para que el crecimiento morfológico de las plantas sea apropiado; de esta manera disponer de cultivos sanos (libres de microorganismos) que pueden ser plantados en campo.

Las fitohormonas son producidas por las plantas naturalmente y también existen de tipo artificial, las cuales están encargadas de regular reacciones a los factores que tiene el material vegetal, controlando los procesos fisiológicos que ayudan al propio desarrollo. En esta investigación se aplicaron las hormonas vegetales citocinina (kinetina) y auxina (ácido indolacético), con el fin de estimular la división celular, retardar el envejecimiento celular, generar la diferenciación de tejidos y estimular el crecimiento de tallos y brotes, para aumentar el número de brotes meristemáticos de tomate y así multiplicar a corto plazo plántulas libres de microorganismos.

En la provincia de Santa Elena según Barzola (2017), el tomate es poco rentable porque es importado de otras ciudades y otros países a costos menores, además de ser un cultivo susceptible a plagas y enfermedades por lo que los agricultores se ven obligados a sembrar áreas pequeñas porque los costos de producción son altos, sin

embargo la demanda es significativa siendo uno de los productos más consumidos, que están distribuidos en todas las redes comerciales.

Este ensayo se realizó aplicando la metodología de Criollo *et al.* (2016), donde indica que para efectuar micropropagación *in vitro* en vegetales uno de los primeros pasos, es mantener una total asepsia de los materiales y equipos de trabajo, así como del material genético, ya que estos factores influyen en la propagación. Posterior a ello, se procede con la germinación de semillas en un medio de cultivo, después de seis semanas, se siembran los hipocótilos para continuar con su propagación; sin embargo, cabe recalcar que para el presente ensayo se esperó 15 días para sembrar los meristemas apicales.

Problema Científico:

¿Será eficiente aplicar la micropropagación en materiales genéticos de (*Solanum lycopersicum*), considerando la producción de brotes meristemáticos con el uso de hormonas vegetales?

Objetivo General:

- ✓ Evaluar la producción de brotes a partir del uso de hormonas vegetales en diferentes materiales genéticos de (*Solanum lycopersicum*) mediante la micropropagación.

Objetivos Específicos:

- ✓ Valorar las respuestas que generan la combinación de las hormonas citocininas y auxinas, en la producción de brotes de (*Solanum lycopersicum*).
- ✓ Determinar el comportamiento morfológico de explantes, a partir de tres materiales genéticos de tomate mediante meristemas apicales.
- ✓ Establecer el protocolo más eficiente para la producción de brotes en diferentes materiales genéticos de tomate.

Hipótesis:

Existe diferencia en el comportamiento morfológico de los materiales genéticos de tomate con el uso de hormonas vegetales en la micropropagación.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importancia del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*

El tomate (*Solanum lycopersicum*) perteneciente a la familia de las solanáceas es según Guzmán *et al.* (2017) la hortaliza más sembrada a nivel mundial, en Chile ocupa el tercer lugar de los cultivos hortícolas en consumo fresco. Este cultivo goza de una alta diversidad genética, con infinitudes de variedades con características diferentes en forma, color y sabor, gracias a eso, la producción y comercialización tiene gran acogida.

Maestu (2018), define que el tomate es un cultivo tipo arbusto, anual perenne, su crecimiento es rastrero, semi-erecto o erecto. La semilla presenta un color grisáceo, de forma oval, aplanada, que puede medir de 3 a 5 milímetros de diámetro.

Por otra parte, Guevara y Alvarado (2014) recalca que la importancia de los antioxidantes que tiene el *Solanum lycopersicum*, radica en prevenir enfermedades como cáncer, estimula el sistema inmune, mejora el metabolismo, tiene propiedades antivirales y antimicrobianos.

1.2 Fisiología del tomate

La fisiología hace referencia a las respuestas de un cultivo en relación a las condiciones que se expone para su desarrollo, tanto factores ambientales como su tratamiento en general. Para Escobar y Lee (2009), la fisiología depende de cada etapa fenológica, siendo la primera el desarrollo vegetativo, que abarca la germinación, la aparición de la plántula y del primer racimo floral, este último suele surgir luego de la formación de hasta 10 hojas y de un crecimiento de la planta superior a 40 cm. La siguiente etapa incluye la formación progresiva de los frutos; seguida de la etapa de producción, cuando los frutos maduran y están aptos para la cosecha; cabe mencionar que durante estas etapas la planta se mantiene generando nuevas hojas y racimos florales. Por último, el desarrollo desemboca en una etapa donde la planta detiene su crecimiento ya sea de forma natural o por inducción, y únicamente se mantiene el desarrollo de frutos previamente formados.

López (2016), describe que el tallo está compuesto de epidermis con pelos glandulares, corteza, cilindro vascular y tejido medular, las hojas están revestidas de pelos glandulares y en posición alternada sobre el tallo, existen varios tipos como: enana, hoja de papa, estándar, peruvianum, pimpinellifolium o hirsutum; en cuanto a las flores tienen seis estambres alternados con los pétalos, el ovario posee dos o más segmentos, las inflorescencias se colocan en las axilas cada tres hojas; el fruto goza de pericarpio, tejido placentario y semillas, es una baya bilocular, plurilocular, subesférica globosa o alargada.

Por otro lado, López (2016) también menciona que existen plantas de crecimiento determinado, cuya característica es que el tallo principal y lateral interrumpe su crecimiento, cuando el número de inflorescencias cesa según la variedad y de crecimiento indeterminado donde los tallos principal y lateral, crecen mediante un patrón donde el siguiente tallo se desarrolla en la yema terminal.



Figura 1. Plántula de tomate.
Fuente: Katty Montoya, (2020)

1.3 Mejora genética del tomate

Con el objeto de mejorar la calidad de los cultivos, se han desarrollado varios métodos entre ellos la propagación *in vitro*, Maestu (2018), señala que el hombre sometió a diversos factores abióticos y bióticos a frutos de tamaño grande así como de menor susceptibilidad, para producir nuevas variedades, que eran semejantes a las ancestrales; con el paso del tiempo se ha creado variedades resistentes a plagas y enfermedades, incrementando la calidad y uniformidad del fruto, vida postcosecha, valor nutricional y su rendimiento.

De igual forma, Sharry *et al.* (2015), afirma que el mejoramiento genético multiplica la producción y calidad de las plantas por unidad de terreno a corto plazo, adaptándolas a las necesidades del agricultor y consumidor con el fin de alcanzar una alta productividad. Para obtener un F4 con alto mejoramiento genético a través de semillas autofecundadas, González (2014), argumenta que se lo logra a partir de estudios de generaciones F2 y F3 con plantas evaluadas en campo, donde se observan caracteres morfológicos del fruto, estructurales de las plantas y rendimiento.

En cuanto a la mejora de la genética del cultivo de tomate, Hoyos y Martín (2005) citado por Palazón y García (2015), mencionan que los diversos caracteres buscados son el aumento de la producción, la resistencia a estreses bióticos, la tolerancia a condiciones adversas en el ambiente, la arquitectura de la planta y la calidad externa del fruto en color, forma, tamaño, sabor, entre otros.

1.4 Distribución en Ecuador y sus usos

Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos-INEC (2018), el rendimiento de *Solanum lycopersicum* en Ecuador es de 730 qq/Ha en promedio, la relación beneficio/costo es de 1.68 dólares (por cada dólar se recupera 0.68 dólares), (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de *Solanum lycopersicum* en Ecuador.

RENDIMIENTO		5292 cajas
Total Venta	# cajas * precio de venta	58 212 USD
Utilidad Neta	Total venta - costos totales	23 575.92 USD
Relación B/C	Total venta / costos totales	1.68 USD
Costo Unitario	Costos totales / # cajas	6.54 USD
Utilidad por caja	Precio de venta - costo unitario	4.46 USD
Punto de equilibrio	Cfijos / (precio venta - costo unit)	727.10 cajas
	Pto. Equilibrio / precio venta	7 988.19 USD

Fuente: Aragón (2019).

Elaborado por: Katty Montoya.

El Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería y Pesca (2017) citado por Varela (2018), afirma que los precios por mercados del tomate a campo abierto son los siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Precios de tomate riñón a campo abierto.

Mercado	Categoría	Producto	Fecha Investigación	Precio/ Presentación (USD)	Presentación	Precio (USD)	Unidad Medida
Guayaquil - TTV	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	03/01/2017	11.00	Cartón 55.00 Libra	0.44	kg
Guayaquil - TTV	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	29/12/2016	11.00	Cartón 55.00 Libra	0.44	kg
Guayaquil - TTV	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	27/12/2016	11.00	Cartón 55.00 Libra	0.44	kg
Ibarra - COMERC IBARRA	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	30/12/2016	7.00	Cartón 40.00 Libra	0.38	kg
Portoviejo	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	30/12/2016	15.00	Cartón 60.00 Libra	0.55	kg
Quito - MMQ-EP	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	03/01/2017	5.00	Cartón 40.00 Libra	0.27	kg
Quito - MMQ-EP	Hortalizas - Producto fresco	Tomate Riñón a campo abierto	27/12/2016	5.33	Cartón 40.00 Libra	0.29	kg

Fuente: Varela (2018).

Elaborado por: Katty Montoya.

Según Argerich *et al.* (2010) el tomate aporta los siguientes valores nutricionales (Tabla 3):

Tabla 3. Valores nutricionales de tomate.

Nutriente	Contenido
Agua	93.5%
Calorías	20
Colesterol	0
Proteínas	1 g
Grasas	0.2 g
Carbohidratos	4.3 g
Fibras	0.47 g
Vitamina A	820 IU
Vitamina C	21 mg
Tiamina	0.05 mg
Riboflavina	0.04 mg
Niacina	0.6 mg
Calcio	12 mg
Fósforo	25 mg
Hierro	0.5 mg
Sodio	3 mg
Potasio	222 mg
Ácido Fólico	39 mg
Vitamina E	0.9 mg
Licopeno	3.1 mg

Fuente: Argerich *et al.* (2010).

Elaborado por: Katty Montoya.

1.5 Producción de tomate *in vitro*

La producción *in vitro* del tomate hace referencia a la generación de una variedad de planta de mayor calidad, es decir, que tenga características que mejoren su desarrollo y se disminuya la posibilidad que su genética resulte afectada por condiciones externas o de manejo del cultivo.

De acuerdo con Ramírez *et al.* (2009), la técnica *in vitro* se ve afectada por el tipo de explantes que se emplee, así como la concentración y tipo de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo; pese a existir varios tipos medios de cultivo generalmente el más utilizado en tomate es el medio Murashige y Skoog (MS), puesto que es el más conocido y apto para la mayoría de las especies; para su elaboración se puede utilizar soluciones concentradas de nutrientes o productos prefabricados, además de hormonas vegetales que garanticen su efectividad.

Sharry *et al.* (2015), plantean que los cultivos se deben conservar en temperatura constante (23 °C a 27 °C), con intensidad lumínica de 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Si es necesario se incuban en oscuridad. Cada vez que sea necesario se verifica la presencia de contaminación, se revisa los explantes y sus respuestas morfológicas. Según Angarita (2012), la propagación vegetal puede generarse a partir de yemas axilares o del meristemo caulinar, utilizando plantas axénicas obtenidas de semillas esterilizadas, usando recipientes de 95 mm de diámetro x 105 mm de altura.

1.6 Cultivos *in vitro*

Según Rodríguez y Torres (2018), los cultivos *in vitro* son alternativas que reemplazan el método tradicional, permitiendo conservar el desarrollo de células vegetales, tejidos, órganos o plantas completas en medios sólidos artificiales, con factores óptimos para su crecimiento, tomando en cuenta su asepsia.

De acuerdo con Álvarez (2018), el cultivo *in vitro* tiene como finalidad aportar a la planta nutrientes que son indispensables para su óptimo desarrollo, a través de medios axénicos sólidos compuestos de carbohidratos (Carbono), y energía (sacarosa), además de minerales, vitaminas, aminoácidos, suplementos orgánicos y fitohormonas reguladoras de crecimiento como las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

Medina (2013), confirma que los cultivos de tejidos vegetales *in vitro*, desarrollados en laboratorio tienen que estar en total asepsia y en condiciones estériles para evitar contaminaciones.

Sharry *et al.* (2015), deduce que los cultivos *in vitro* simplifica la propagación de plantas idénticas masivamente a corto plazo, y los costos de mantenimiento son menores a nivel de laboratorio, porque gracias al requerimiento de asepsia, el lugar está libre de plagas y enfermedades.

1.6.1 Totipotencialidad celular

La totipotencia de una célula es la capacidad que tiene para regenerarse, Calva (2005) citado por Indacochea *et al.* (2019), señala que toda célula vegetal se puede regenerar

en los cultivos *in vitro*, a partir de una planta madre, tomando en cuenta todas las condiciones como temperatura, fotoperiodo, reguladores de crecimiento, entre otras. Esta totipotencia es sumamente importante, puesto que de ello depende que el cultivo *in vitro* sea exitoso, si las plantas no poseen dicha capacidad, resulta imposible la generación de nuevas plantas.

1.6.2 Desdiferenciación celular

Indacochea *et al.* (2019), fundamentan que es un proceso de transformación y pérdida de características de tipo celular para formar células meristemáticas, esto ayuda sobre todo para que las células en caso de algún daño en sus tejidos o pérdida de una parte de ellos, regresen al estado de la célula madre y nuevamente se desdiferencien y recuperen el tejido que han perdido.

Esta capacidad de las células es aprovechada en los cultivos *in vitro*, para producir con éxito la propagación de la planta. Rivas (2016) señala que este proceso depende del genoma de la especie y depende propiamente del balance hormonal y el estado fisiológico que posea el órgano, tejido o célula que se ha puesto en cultivo, así como de los reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo.

1.7 Medio de cultivo

Según Sharry *et al.* (2015), el medio de cultivo es una mezcla de sustancias acuosas con objeto de sembrar tejidos vegetales, células, microorganismos y/o animales, que requieren de nutrientes (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agente gelificante y hormonas de crecimiento), para garantizar a las plantas un desarrollo morfológico apropiado.

La consistencia de los medios de cultivo es un factor que debe considerarse al momento de proceder con la micropropagación del cultivo, Aguilar *et al.* (2016), mencionan que es muy importante que el medio de cultivo tenga la consistencia adecuada, los que se usan a nivel general son los sólidos; los medios semisólidos y líquidos tienen consecuencias como la vitrificación. La composición que

frecuentemente se utiliza son macro y micronutrientes, vitaminas, inositol, sacarosa, aminoácidos y fitohormonas.

Así también, es necesario que las sustancias utilizadas y sus cantidades sean las adecuadas y garanticen las condiciones necesarias para el cultivo. Santana (2019), especifica que para preparar un litro de medio de cultivo para germinar semillas se requiere de los siguientes componentes: Agar (7 g/l), Sales MS (5 g/l), Sacarosa (30 g/l), Inositol (100 mg/l), TH-Cl (1 mg/l).

1.7.1 Componentes del medio de cultivo

1.7.1.1 Macroelementos

Según Sharry *et al.* (2015), los macroelementos son necesarios para que la planta realice sus funciones vitales como sintetizar ácidos nucleicos y fosfolípidos (fósforo), aminoácidos, cisteína y metionina (azufre), formación de la célula (nitrógeno).

Perea (2009), indica que el nitrógeno se suministra en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+), pero se recomienda disminuir las dosis para prevenir vitrificación en los explantes. El fósforo es esencial para el metabolismo, la fotosíntesis y la respiración de las células de las plantas. El azufre es componente de la estructura de la cisteína. Y añade que a otros macroelementos como el potasio, que se encuentra en las vacuolas en cantidades copiosas, protege el mecanismo de apertura y cierre de estomas, sostiene la osmorregulación, influye en los sistemas enzimáticos; el calcio en cambio induce al crecimiento de hojas y raíces, se presenta en el citosol en muy pocas proporciones; y el magnesio, el cual forma parte de los cloroplastos y de las moléculas de clorofila.

1.7.1.2 Microelementos

Indacochea *et al.* (2019), mencionan que los microelementos como el boro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, hierro, cloro, son necesarios para que las enzimas cumplan de manera natural sus actividades funcionales. El hierro ayuda a la fotosíntesis, el manganeso impulsa a formar yemas, y el boro estimula formación de callos.

De igual forma, para Perea (2009), estos elementos son vitales para el crecimiento vegetal, especifica que el hierro se encuentra en las enzimas redox y en algunos pigmentos. El manganeso activa las enzimas respiratorias del ciclo de Krebs; el zinc participa en la síntesis y conservación de auxinas, está presente en la raíz; el cobre actúa en los procesos de oxidación-reducción. El boro favorece el transporte de los azúcares en la parte interna de la planta por medio de la pared celular, interviene en la regulación hormonal, germinación, división y crecimiento celular; y el molibdeno contribuye a la asimilación del nitrato mediante la enzima nitrato reductasa.

1.7.1.3 Vitaminas

Las vitaminas son uno de los factores que contribuyen al correcto desarrollo de las plantas, Indacochea *et al.* (2019), relatan que las vitaminas son esenciales para el crecimiento de las plantas y diferenciación en el metabolismo celular; son componentes de las células vegetales que realizan funciones catalizadoras a través de reacciones enzimáticas.

Según Sharry *et al.* (2015), son compuestos sintetizados naturalmente por las plantas, sin embargo añade que en cultivos *in vitro*, también se aplican de forma artificial con la finalidad de enriquecer la morfología de la nueva planta y que contribuyan a mejorar su respuesta a las diversas condiciones que le ocasionan estrés.

1) Tiamina (B1)

La tiamina, conocida como vitamina B1, de acuerdo con Indacochea *et al.* (2019), ayuda a las coenzimas en la fase de respiración a oxidar el ácido pirúvico. Esta vitamina es almacenada en los cotiledones y sintetizada en las hojas, generalmente las plantas producen suficiente vitamina B1 por ellas mismas, sin embargo, para los cultivos *in vitro* se puede usar generalmente dosis de 0.4 mg/l, para estimular la formación de brotes. Esta vitamina les brinda a las plantas, una resistencia a enfermedades provenientes de hongos, bacterias y virus, aumentando su resistencia y fortaleciendo su sistema de defensa.

2) Adenina

Según Sharry *et al.* (2015), esta vitamina es una base nitrogenada presente en los ácidos nucleicos, en los cultivos *in vitro* es empleada para la formación de brotes vegetales proporcionando energía a la célula.

3) Piridoxina (B6)

Perea (2009), indica que esta vitamina actúa en procesos respiratorios, brinda energía a la célula mediante la transformación de moléculas alimenticias, regula el metabolismo del nitrógeno, sintetiza aminoácidos creando resistencia a ciertas enfermedades.

4) Inositol o myo-inositol

Indacochea *et al.* (2019), recalcan que es un azúcar alcohol, que se encuentra presente en las membranas de los cloroplastos, activa el crecimiento y división celular, en los medios de cultivo se aplica 100 mg/l.

1.7.1.4 Ácido Nicotínico

Indacochea *et al.* (2019), detallan que en los cultivos *in vitro* se puede aplicar concentraciones de 0.1 a 10 mg/l, es foto y termoestable, vital para el crecimiento por lo que estimula a las coenzimas en las reacciones de energía.

1.7.1.5 Fuentes de Carbono

Aguilar *et al.* (2016), indican que la sacarosa es la más empleada en los cultivos *in vitro*, esta sustancia ayuda al proceso de diferenciación celular, formación de elementos vasculares y de clorofila, las dosis que se aplica es de 2 a 3%.

Según Sharry *et al.* (2015), en diversas especies se emplea sacarosa, fructuosa, maltosa, celobiosa, rafinosa y glucosa, sin embargo se destaca a la sacarosa por ser la mejor fuente de carbohidratos teniendo del 2 al 5% y es la que generalmente se usa en la industria de los cultivos *in vitro*.

1.7.1.6 Aminoácidos

Según Aguilar *et al.* (2016) la participación de estos elementos ayuda a la proliferación de callos y la organogénesis, los de forma D son tóxicos y los de forma L tienen acción benéfica.

1.7.1.7 Agente gelificante

a) Agar

Indacochea *et al.* (2019), indican que el agar-agar se agrega en la preparación de los medios de cultivo, es un polisacárido insoluble en agua fría, pero en agua hirviendo se solubiliza, a una temperatura de 45 °C se solidifica, las dosis que normalmente se usan son de 0.7 a 1.5%.

Sharry *et al.* (2015), recalcan que cuando los medios de cultivo contienen altas dosis de sales minerales, el porcentaje de agar debe ser alto. Si el medio es duro, el desarrollo vegetal decrece, las dosis eficaces oscilan entre 0.7-1.5%, concentraciones menores a 1 g.l⁻¹ generan hojas suculentas y frágiles (vitrificación).

1.7.1.8 El pH

Indacochea *et al.* (2019), manifiestan que es imprescindible ajustar el pH de la solución a un valor no menor a 5.8 para conseguir una adecuada gelificación del medio y absorción de sales minerales.

Sharry *et al.* (2015), indican que el pH se ajusta con HCl (ácido clorhídrico) si el medio es alcalino y en caso que el medio sea ácido se aplica NaOH (hidróxido de sodio), posterior a la adición de todos los insumos excluido el agar.

1.7.1.9 Reguladores de crecimiento

Según Calva (2005), las fitohormonas son sustancias que producen las plantas y regulan las reacciones a los diversos factores que se encuentra el material genético como luz, temperatura y humedad para que se desarrollen normalmente las plantas.

Todas las plantas poseen hormonas, las cuales son encargadas de aportar características tanto en su desarrollo interno como externo, una de estas hormonas es la auxina, que según Jordán y Casaretto (2006), es la encargada del desarrollo y crecimiento de las plantas, mediante la presencia principal del ácido indolacético, aunque también existen otros componentes como el ácido 4-cloro-indolacético, ácido fenilacético, ácido indolbutírico y el ácido indolpropiónico.

Otra de las hormonas es la citocinina la cual, acorde a Jordán y Casaretto (2006), además de estar presente en los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, también interviene en el accionar de varios genes; el autor menciona que se pueden diferenciar dos tipos de esta hormona, el primero corresponde a aquellas que se generan naturalmente por las plantas, y el segundo tipo son las artificiales, que son sintetizadas por el ser humano.

Medina (2013), defiende que la relación de estas hormonas regulariza la morfogénesis en cultivos de tejidos, por lo que al variar sus concentraciones se ha reformado el desarrollo de las células indiferenciadas, si la auxina es mayor, el tejido diferenciado organiza raíces, mientras que si la citocinina es mayor, se produce la formación de yemas; por otra parte si se las equilibra se produce tanto raíces como yemas es decir, una plántula.

1) Auxinas

Vega *et al.* (2016), mencionan que el Ácido indol-3-acético es la hormona vegetal producida por bacterias que controla procesos fisiológicos de la planta para ayudar en la diferenciación de tejidos, elongación, división celular y las respuestas a la luz y la gravedad.

Indacochea *et al.* (2019), definen que estas hormonas combinadas con citocininas son aplicadas en la multiplicación y enraizamiento de cultivos *in vitro*, intervienen en el crecimiento de ápices caulinares, para cultivos de callos es recomendable utilizar dosis de 0.1 a 5 mg.l⁻¹ de ácido indolacético (AIA).

2) Citocininas

Indacochea *et al.* (2019), dicen que éstas hormonas actúan en el transporte de auxinas, estimulan la división celular y retardan el envejecimiento celular, en los cultivos *in vitro* usualmente son aplicadas en combinación de auxinas.

Aguilar *et al.* (2016), mencionan que estas hormonas estimulan la división celular, crecimiento de yemas laterales, inhibe el desarrollo de yemas apicales, combinadas con auxinas induce a la producción de tallos y raíces.

3) Giberelinas

Cueva y Lucero (2018), indican que para la estimulación germinativa de las semillas se debe usar reguladores de crecimiento como las Giberelinas (AG₃), sin embargo si se agrega citocininas el resultado será más efectivo en la formación de brotes, considerando la concentración en que se trabaje, así como las condiciones de luz y oscuridad. La AG₃ se emplea generalmente para cultivo de ápices o meristemas caulinares.

Por otro lado Indacochea *et al.* (2019), mencionan que estas hormonas forman parte de las plantas, siendo responsables del crecimiento y elongación de las células, entrenudos y meristemas, además inducen la ruptura de dormancia de semillas o embriones aislados, e impiden la formación de tallos y raíces adventicias.

4) Ácido abscísico (ABA)

Según Chamorro *et al.* (2016) este ácido regula los procesos vasculares en las plantas no vasculares (ciclo de vida haploide), por lo cual es denominada hormona del estrés ambiental.

Barrueto y Carvalho (2008), indican que el ácido abscísico ayuda a la dormancia de yemas y brotes, con el objetivo de conservar plantas de *Manihot esculenta* a partir de medio nutritivo aplicando ABA (20 y 30 uM) por un periodo de 90 días y su posterior desarrollo en medio sin ABA durante 45 días.

5) Etileno

Indacochea *et al.* (2019), recalcan que es una hormona gaseosa que se origina en todos los órganos de las plantas, sin embargo a largo plazo resulta perjudicial para su desarrollo, debido a que este gas es causante de la disminución de los órganos y el envejecimiento de la planta.

Cerezo (2017), indica que la estructura del etileno es simple, se presenta en todas las etapas del ciclo biológico de las plantas: germinación de semillas, respuesta al estrés, maduración y senescencia. Se desplaza libremente por los espacios intercelulares, modula la velocidad de síntesis del gas.

1.8 Micropropagación

Castillo (2017), define que esta técnica también se le denomina propagación clonal, en la cual se necesita una planta madre con el fin de obtener clones (plantas genéticamente idénticas), mediante el uso de sus hipocótilos, cotiledones, hojas, yemas, ápices, segmento de tallo, meristemas, embrión, nudo, semillas y/o anteras. De acuerdo a Calva (2005), la micropropagación se usa para conseguir clones somáticos y regenerar plantas completas, de esta manera disponer de cultivos exentos de microorganismos.

Domínguez *et al.* (2008), rectifican que esta técnica permite propagar plantas conservando la particularidad de la planta madre, en ambientes controlados (temperatura, humedad y luz) en un espacio pequeño, plantadas en medios de cultivo que contienen fuentes de carbono, nitrógeno, sales inorgánicas, reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos, en recipientes estériles; con el propósito de obtener materiales libres de bacterias, hongos, etc.

Sharry *et al.* (2015), consideran que la micropropagación favorece la obtención de diversidad de plantas libres de virus, una tasa muy alta de multiplicación; mediante

cultivo de meristemas, produciendo alteración genética. Para usarlas posteriormente en cultivo a campo o para otras biotécnicas.

1.8.1 Edad del explante

Recalde (2007), menciona que en plantas de *Nepeta hederacea variegata* se utilizó esquejes de un año de edad, puesto que las plantas donantes fueron cultivadas en condiciones de invernadero.

1.8.2 Luz y Fotoperiodo

Todos los cultivos *in vitro* independientemente de su especie, necesitan determinadas condiciones como horas de luz y oscuridad, temperatura y humedad relativa, para conseguir un desarrollo favorable y no interrumpir ninguno de sus procesos vitales, según Borrero (2007), para las plántulas de *Solanum betaceum* la temperatura que se requiere en la cámara de cultivo oscila entre 18 y 24 °C y fotoperiodo de 16h luz y 8h de oscuridad.

En cambio, Recalde (2007), recalca que para el establecimiento de plantas *Nepeta hederacea variegata in vitro*, la temperatura media de la cámara de cultivo puede ser de 21 ± 2 °C, la humedad relativa media de $70\pm 3\%$ y el fotoperiodo de 16h luz y 8h de oscuridad, siendo 2000 lux la intensidad lumínica proveniente de tubos fluorescentes blancos.

Hernández y Chico (2020), señala que material vegetal de *Physalis peruviana* (*Solanaceae silvestre*) se puede mantener en el cuarto de cultivo a una temperatura promedio de 25 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Por otra parte Górriz (2019), menciona que en una especie como el melón (*Cucumis melo*) también es necesario un fotoperiodo de 16 horas luz además de contar con una intensidad lumínica de 2000 luxes y una temperatura que varía entre 26 °C durante el periodo luminoso y 22 °C en la oscuridad, mientras que la humedad relativa varía entre 40% y 70% dependiendo el periodo.

1.9 Etapas del cultivo *in vitro*

1.9.1 Elección de explante

Calva (2005), indica que la incubación de los explantes requiere ambientes de luz, temperatura y humedad examinadas constantemente, para que el desarrollo de la micropropagación sea el apropiado.

Sharry *et al.* (2015), relatan que en la elección del explante se usa frecuentemente las yemas apicales, yemas axilares, discos de hoja, secciones de raíz y meristemas, de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas para que el desarrollo sea superior.

Maestu (2018), menciona que los tipos de explantes con lo que se puede trabajar en plantas *in vitro* son cotiledones proximal y distal (parte central se divide en cuatro cortes longitudinales), limbo de hoja (dos cortes transversales), peciolo de foliolo (un corte a unos mm del raquis), peciolo de hoja (cortes transversales de 4 mm).

Mroginski *et al.* (2011), recalcan que para el estudio del proceso fisiológico mediante callos, se puede usar explantes jóvenes obtenidos de germinación de semillas, para el estudio de requerimientos nutricionales se utiliza el cultivo de ovarios fecundados, para el estudio de formación de las fibras en algodón se requiere del cultivo de óvulos.

1.9.2 Desinfección

Medina (2013), señala que la desinfección se realiza sumergiendo las semillas en etanol al 80% durante 1 minuto, seguido de una solución al 20% de Cloro comercial con 0.01% de Tween, durante 15 minutos. Para la desinfección de las semillas es necesario separar las secas de las buenas, Cueva y Lucero (2018), indican que las que estaban en buen estado fueron colocadas en cajas Petri, luego se coloca en alcohol al 70% en agitación constante durante 1 minutos, en seguida se enjuaga con agua destilada estéril, posteriormente se lava con hipoclorito de sodio al 20% más una gota de jabón líquido por 5 minutos, así mismo se enjuaga con agua destilada estéril, consecutivamente se coloca peróxido de hidrógeno al 10% y se agita durante 5 minutos, finalmente se enjuaga con agua destilada estéril.

Pequeño *et al.* (2015), muestran en su investigación que el material vegetal seleccionado en campo, se lavó con jabón líquido y agua potable, luego con etanol al 70% por 30 segundos, adicionalmente con una solución de NaClO al 3.24% más tween-20 al 0.1%, después enjuagaron con agua estéril, finalmente los incubaron en agua por una hora. En cambio Criollo *et al.* (2016), detallan que el proceso de desinfección de semillas de *Solanum betaceum* consiste en: sumergirlas en yodo por aproximadamente 15 minutos, lavarlas tres veces con agua estéril, colocarlas en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% por 10 min y para terminar enjuagarlas con agua estéril cinco veces.

1.9.3 Establecimiento *in vitro*

Según Cueva y Lucero (2018), se debe tomar en cuenta que en la mayoría de cultivos *in vitro* el material vegetal que se usa son comerciales, porque no han sufrido algún tipo de selección. Asimismo, Indacochea *et al.* (2019), enfatizan que en la fase preparativa se deben seleccionar plantas madres jóvenes con características fenotípicas especiales, utilizar explantes pequeños para evitar posibles contaminaciones y cultivarlos en cámaras con ambientes controlados ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

1.9.4 Multiplicación de brotes

Osuna y Saucedo (2011), declaran que para multiplicación de brotes se colocan yemas axilares y ápices de aproximadamente un centímetro, en frascos de vidrio con el medio de cultivo MS, con las respectivas dosis de hormonas de crecimiento. Además para que en esta etapa se mantengan y aumenten los números de brotes, Sharry *et al.* (2015), señalan que debe tomarse en cuenta la importancia de los medios de cultivo, hormonas vegetales y las condiciones de crecimiento.

Aguilar *et al.* (2016), indican que el propósito de esta etapa es reproducir explantes y aumentar el número de plantas a corto plazo con el adecuado manejo del sistema. Para ello, como muestra la Tabla 4, en el caso de *Nepeta hederacea variegata* (especie ornamental), Recalde (2007), menciona que realizaron cortes de 0.5 cm de largo, los cuales fueron sembrados en los siguientes medios de cultivo:

Tabla 4. Multiplicación de brotes.

Tratamiento	Sales minerales	Sacarosa (g/l)	Agar (g/l)	ANA (ppm)	BAP (ppm)
T1	MS	30	7	0.1	0.0
T2	MS	30	7	0.1	0.5
T3	MS	30	7	0.1	1.0
T4	MS	30	7	0.1	1.5
T5	MS	30	7	0.1	2.0

Fuente: Recalde (2007).

Elaborado por: Katty Montoya

1.9.5 Enraizamiento

La etapa de enraizamiento es según Aguilar *et al.* (2016), donde se acondicionan las plántulas para generar raíces, en condiciones asépticas y puedan ser trasplantadas a invernadero; para ello al medio de cultivo se adiciona concentraciones de auxinas, con una temperatura apta de 20 a 30 °C.

Recalde (2007), menciona que para enraizar plántulas *in vitro*, se usan brotes de 0.5 cm de largo empleando sales de Murashige y Skoog (1962), sacarosa 30 g/l, agar 7 g/l y 1 ppm ANA al medio de cultivo ajustando el pH a 5.7; los frascos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 15 min y se incubaron por 30 días en la cámara de cultivo.

1.9.6 Aclimatación

La aclimatación debe ser manejada con alta precaución, Aguilar *et al.* (2016), señalan que los riesgos que las plántulas presentan al momento de trasplantar a invernadero compromete la sobrevivencia. El método adecuado es separar el medio de las raíces y enjuagarlas correctamente, posterior a esto se clasifica por tamaño para tener homogeneidad y manejarlas fácilmente.

Para evitar el estrés de las plántulas la humedad relativa debe ser alta desde el inicio, colocando las bandejas con sistemas de nebulización o en coberturas de plástico, el sustrato inerte compuesto por mezclas de musgo, arena, cascarilla de arroz, vermiculita o perlita, necesita tener buena capacidad de retención hídrica para que se mantenga suelto; después de un mes se aplica fertilizante para que la planta se desarrolle

satisfactoriamente. Para la prevención de plagas es recomendable realizar pulverizaciones con fungicidas e insecticidas.

Según Cárdenas *et al.* (2016) para aclimatar a la especie *Solanum dolichosepalum* (frutillo), se debe extraer las plántulas de los frascos, eliminar con agua el agar de las raíces, y colocarlas en vasos plásticos de 100 ml contenidos de sustratos como tierra, tierra: mantillo de bosque (3:1), tierra: turba (3:1), tierra: arena (3:1) y tierra: mantillo: arena (3:2:1), establecerlas en un invernadero con riego durante una semana por nebulización, posteriormente realizar riego manual aproximadamente por dos meses.

En el trabajo realizado por Criollo *et al.* (2016), mencionan que las plántulas de *Solanum betaceum* fueron sembradas en semilleros con turba y colocadas en un vivero con temperatura aproximadamente 25 °C, HR del 80% y 50% de luminosidad, pasado el mes evaluaron el número de plantas vivas.

Recalde (2007), recalca que en esta etapa se retiran las plántulas del medio de cultivo para eliminar con suficiente agua los residuos de las raíces, posteriormente las colocaron en una solución de fungicida (Eurapen 1 g.l⁻¹), luego se sembraron en bandejas con sustrato (50% coco + 50% turba), aplicando la fitohormona Hormonagro #1 (ayuda a formar raíces) y se colocaron en diversas áreas de aclimatación empleando los siguientes tratamientos (Ver Tabla 5):

Tabla 5. Aclimatación de plántulas en vivero.

Tratamiento	Área Túnel	Área Propagación	Área Aclimatación
T1	2 semanas	2 semanas	
T2		2 semanas	2 semanas
T3			4 semanas

Fuente: Recalde (2007).

Elaborado por: Katty Montoya

1.10 Agentes contaminantes

Hernández (2010), recalca que los contaminantes dentro de los cultivos *in vitro* se los denomina como vitropatógenos, estos pueden ser hongos, bacterias y levaduras que son los que compiten con los explantes por los nutrientes del medio, produciendo metabolitos tóxicos que colonizan los tejidos y deterioran la multiplicación vegetal a

causa de la deficiente manipulación del personal operador en los laboratorios, por aberturas naturales, heridas.

Por otra parte, Aguilar *et al.* (2016) exponen que las fuentes de contaminación son el inadecuado manejo del material genético, escasas técnicas de asepsia, esterilización parcial del medio de cultivo, desperfectos en los equipos, aparición de ácaros, trips y hormigas, formas de desinfección incorrectas en la fase de establecimiento del cultivo; puesto que dan inicio a la proliferación de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Neurospora*, entre otros. También explica que, para disminuir los agentes patológicos, se puede aplicar fungicidas sintéticos y bactericidas, aunque en algunos casos los microorganismos requieren un lapso de tiempo para adaptarse, previo a manifestarse generalmente en la fase de multiplicación.

1.11 Oxidación fenólica

La oxidación en los explantes puede ser causado por el agente desinfectante que se empleó durante la preparación. Azofeifa (2008), expresa que las estrategias para impedir la oxidación son, usar material vegetal juvenil, el explante debe crecer en baja temperatura y luminosidad, realizar subcultivos con frecuencia, usar medio de cultivo en estado líquido, utilizar componentes adsorbentes y antioxidantes en el medio de cultivo, la concentración de iones de hidrógeno del medio de cultivo debe ser baja, y también los reguladores de crecimiento deben usarse según el material vegetal.

Pequeño *et al.* (2015), afirman que aplicar hipoclorito de sodio provoca la activación indirecta de la enzima polifenol oxidasa (PPO), causando la oxidación y necrosis de los explantes, lo que impide su correcto desarrollo, terminando en su muerte inevitable.

Para disminuir la oxidación de los explantes, Aguilar *et al.* (2016), indican que existen varias técnicas tales como: aplicar dosis moderadas de fitohormonas al medio de cultivo, incubar los explantes bajo oscuridad o intensidad lumínica reducida, usar ácido cítrico, ácido ascórbico, polivinilpirrolidone (PVP), carbón activado (antioxidantes).

1.12 Vitrificación

Sharry *et al.* (2015), verifican que este problema se da cuando la humedad relativa y el potencial de agua afecta a la fotosíntesis y transpiración; por causas como humedad excesiva, factores nutricionales, baja intensidad lumínica, recipientes que afectan el intercambio gaseoso, altas concentraciones de fitohormonas; por ello, para evitar este problema se puede utilizar frascos con filtro para mejorar el intercambio gaseoso.

Aguilar *et al.* (2016), expresan que la vitrificación en los explantes se da debido al abuso de la dosis de citocininas, a la humedad relativa en el frasco y a las dosis altas de agar por su efecto reductor de citocinina.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación y descripción del lugar del experimento

La presente investigación se ejecutó en el Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIB) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, que se encuentra ubicada en La Libertad, provincia de Santa Elena, la zona presenta una altura de 10 msnm, una latitud de 2°13'55.83'' y una longitud de 80°52'33.30''

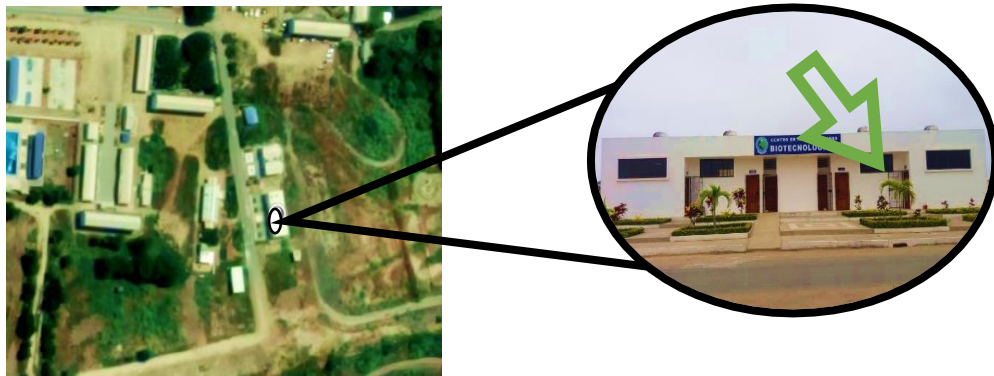


Figura 2. Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIB) UPSE.

2.2 Materiales y equipos

2.2.1 *Material genético*

2.2.1.1 Semillas UPSE-78 y 19

Los materiales genéticos utilizados en el ensayo fueron obtenidos de las nuevas líneas promisorias de la UPSE, tolerantes a estrés hídrico que se desarrollaron durante los años 2013 al 2019 provenientes de los híbridos Daniela y Acerado que fueron germinados en altas concentraciones de agua de mar, con el pedigrí, denominados UPSE-78 y UPSE-19. En las Tablas 6 y 7 se observa sus respectivas características agronómicas.

Tabla 6. Características agronómicas de la Línea UPSE-78.

Características	Detalle
Días a floración	40 días DDT
Altura de Planta	1.14 - 1.35m
Número de Racimos Florales	5 a 7
Número de frutos por racimo	5 -8
Peso Promedio de Fruto	108 - 110g
Rendimiento (Ton/ha)	54 a 100
Grados Brix	4.19
Dureza de la pulpa	5.14
Estrés Hídrico	TOLERANTE
Resistencia a <i>Prodiplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo	MODERADA

Elaborado por: Katty Montoya.

Tabla 7. Características agronómicas de la Línea UPSE-19.

Características	Detalle
Días a floración	45 días DDT
Altura de Planta	1.38- 1.45m
Número de Racimos Florales	4 a 6
Número de frutos por racimo	3 a 5
Peso Promedio de fruto	134 -160 g
Rendimiento (Ton/ha)	32 a 90
Grados Brix	3.54
Dureza de la pulpa	5.26
Estrés Hídrico	TOLERANTE
Resistencia a <i>Prodiplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo	MODERADA

Elaborado por: Katty Montoya.

2.2.1.2 Híbrido MICAELA HA-1903

Rivera (2010), señala que éste híbrido es de crecimiento indeterminado y tiene un follaje con excelente ventilación, se puede cultivar en la sierra y la costa. Posee las siguientes características agronómicas (Tabla 8).

Tabla 8. Características agronómicas del Híbrido MICAELA HA-1903.

Características	Detalle
Número de Racimos Florales	8 a 10
Número de frutos por racimo	5 a 8
Peso Promedio de fruto	190 -250 g
Rendimiento (Ton/ha)	200 a 220
Estrés Hídrico	TOLERANTE
Resistencia a <i>Prodiplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo	MODERADA

Elaborado por: Katty Montoya.

2.2.2 Materiales de laboratorio

MATERIALES

Cinta Parafilm	Papel filtro
Cinta aislante blanca	Pinza bayoneta de Jansen
Espátula mango de madera	Papel aluminio
Frascos de vidrio 250 cm ³	Papel toalla
Gasa	Plástico stretch film
Hojas de bisturí N° 15	Puntas de pipeta cito test 1000-100ul, 100 – 10ul
Matraz Erlenmeyer 250 cm ³ , 500 cm ³ , 1000 cm ³	Probeta 250 cm ³ , 50 cm ³
Mango de bisturí N° 3	Tubos falcon 15 cm ³
Mechero de alcohol	Tubos de ensayo vidrio tapa rosca

EQUIPOS

REACTIVOS

Autoclave	Agar
Agitador magnético con calefacción	Alcohol
Balanza analítica	Agua destilada
Cámara de flujo laminar	Antibióticos: Fluconazol y Gentamicina (160mg)
Cámara de crecimiento	Hipoclorito de sodio (NaClO)
Calibrador vernier	Hormona Citocinina: Kinetina
Estufa	Hormona Auxina: AIA
Micropipeta 1000-100ul, 100 – 10ul	Sacarosa
Peachímetro digital	Sales de Macro y Micronutrientes MS
	Vitamina Tiamina HCL
	Vitamina Inositol

2.3 Diseño experimental y tratamientos

2.3.1 *Tratamientos*

El experimento se analizó mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3x4, considerando tres concentraciones con hormonas y uno sin hormonas (testigo) y tres materiales genéticos como se indica en la Tabla 9, con un total de 12 tratamientos y 3 repeticiones (Tabla 10).

Tabla 9. Material genético y sus concentraciones de hormonas.

Material genético	Concentraciones Citocinina-Auxinas
MG1: UPSE-19	Medio de cultivo 1: MC1 (0.00 mg/l)
MG2: UPSE-78	Medio de cultivo 2: MC2 (0.4 mg/l citocinina-0.25 mg/l auxina)
MG3: MICAELA	Medio de cultivo 3: MC3 (0.6 mg/l citocinina-0.28 mg/l auxina)
	Medio de cultivo 4: MC4 (0.65 mg/l citocinina-0.26 mg/l auxina)

Elaborado por: Katty Montoya.

Tabla 10. Número de tratamientos y repeticiones.

Número de Tratamientos	Tratamientos	Repeticiones
T1	MG1M1	1
T2	MG1M2	1
T3	MG1M3	1
T4	MG1M4	1
T5	MG2M1	2
T6	MG2M2	2
T7	MG2M3	2
T8	MG2M4	2
T9	MG3M1	3
T10	MG3M2	3
T11	MG3M3	3
T12	MG3M4	3

Elaborado por: Katty Montoya.

2.3.2 *Diseño experimental*

El ensayo estuvo conformado de tres materiales genéticos y cuatro concentraciones con tres repeticiones donde en cada tratamiento se incluyó el testigo absoluto, con un total 36 unidades experimentales.

2.3.3 *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat, aplicando la prueba de Duncan $p \leq 0.05$.

Tabla 11. Análisis estadístico.

Fuente de Variación	Grados de libertad
Tratamientos (T-1)	11
A (Mat gen) (a-1)	(2)
B (Medio) (b-1)	(3)
Interacción A*B	(6)
Error Experimental (a*b)*(r-1)	24
Total (T*r)-1	35

Elaborado por: Katty Montoya.

Se obtuvo un error experimental de 24 en grados de libertad, como se menciona en la Tabla 11. En total se consideró 3 frascos por tratamiento (repeticiones), obteniendo un total de 35 (Gl).

2.3.4 Delineamiento experimental

a. Diseño experimental	DCA con arreglo factorial 3x4
b. Tratamientos	12
c. Repeticiones	3
d. Número Total de frascos en el ensayo	36
e. Número de brotes por frasco	5
f. Número de frascos por tratamiento	3
g. Total de brotes por tratamiento	15
h. Total de brotes	180

2.3.5 Conversión de datos a logaritmo y raíz cuadrada

Para el tratamiento de los resultados, se consideró necesario convertir en ciertos casos los datos obtenidos, aplicando logaritmo ($\text{Log}(x+1)$) y raíz cuadrada ($\text{Raíz}(x*100+0.5)$), dado que existió exageración en el coeficiente de variación.

2.4 Manejo del experimento

2.4.1 Asepsia de instrumentos

Es necesario mantener limpios los instrumentos de trabajo para evitar contaminaciones futuras en la propagación de las plántulas, por ello se desinfectó previo a su empleo (Figura 3).

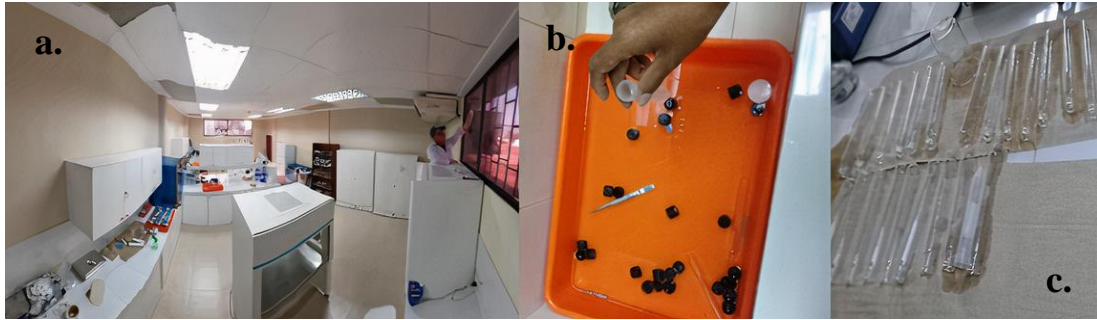


Figura 3. a. Limpieza de instrumentos de laboratorio, b. Lavado de materiales, c. Secado de materiales.

Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.2 Esterilización de los materiales de laboratorio

Antes de proceder a esterilizar los materiales de vidrio, se remojó durante media hora en una solución de hipoclorito de sodio al 30%, y se enjuagó. Una vez lavados, se colocó en la estufa (80 °C durante 2 horas), con algodón y papel aluminio en la superficie a los materiales que son de vidrio; esto se realizó para eliminar microorganismos presentes en el material (Figura 4).



Figura 4. a. Materiales esterilizados, b. Esterilización del material en la estufa, c. Destilación de agua.

Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.3 Esterilización de semillas

Para el correcto desarrollo del experimento, fue necesario realizar la desinfección de las semillas para la eliminación de los restos orgánicos o químicos, primero con agua normal y luego con desinfectante líquido agitando varias veces, se enjuagó hasta

eliminar la espuma; posteriormente se llevó a la cámara de flujo laminar, donde finalizó la desinfección utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 50% durante treinta minutos; consecutivamente se enjuagó tres veces con agua destilada estéril por un lapso de 5, 10, y 15 minutos respectivamente (Figura 5).



Figura 5. Desinfección de semillas.
Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.4 Pre-germinación de semillas

En la cámara de flujo laminar, se colocó cajas Petri, pinzas, recipiente con agua destilada estéril, papel filtro, gotero, cinta parafilm y semillas, todo previamente esterilizado; se introducen en las cajas Petri dos pedazos circulares de papel filtro, se adicionó 7 ml de agua destilada estéril con ayuda del gotero, posteriormente se depositaron las semillas, finalmente se selló con cinta parafilm y se dejó en reposo por cuatro días en oscuridad para promover la emergencia de la radícula (Figura 6).

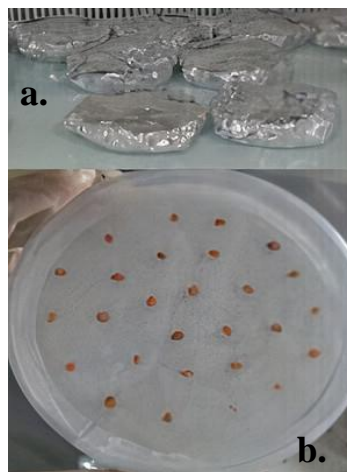


Figura 6. a. Incubación de semillas, b. Muestras de semillas pre-germinadas.
Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.5 Preparación de medio de cultivo para germinación (M1)

El medio de cultivo necesita varios componentes para que las semillas germinen normalmente, para la preparación de un litro de medio se especifica en la Tabla 12 las características de dichos componentes:

Tabla 12. Componentes del M1.

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

*Solución madre

Elaborado por: Katty Montoya

En un matraz Erlenmeyer, se colocó 500 ml de agua destilada estéril, se agregó sales, sacarosa y vitaminas, se disolvió todo con un agitador de vidrio, se midió el pH hasta un rango de 5.6 a 5.8; en el caso que la solución se encuentre con pH ácido se aplica hidróxido de sodio, si la solución es alcalina se regula con ácido clorhídrico. A continuación, se añadió el agar con los 500 ml restantes de agua destilada, por último, se colocó un agitador magnético para mezclar la solución, el cual fue ubicado en un termo agitador durante 15 minutos. Después se trasladó el MS al autoclave para esterilizarlo, a 121 °C, 15 PSI, por un lapso de 45 min. Una vez tibio el medio de cultivo, previo a dispensar en los frascos, se aplicó 1.60 mg/l de antibióticos (0.80 mg de fluconazol y 0.80 mg de gentamicina) (Figura 7).



Figura 7. a. Pesaje de insumos, b. Preparación de medios de cultivo, c. Medio de cultivo listo para dispensar.

Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.6 *Siembra de semillas*

La cámara de flujo laminar se desinfectó previamente con alcohol, para proceder a colocar dentro los materiales, tales como pinzas, papel filtro, plástico stretch film, mechero de alcohol, vaso de precipitación con alcohol al 70%, cinta aislante blanca, esfero, cajas Petri con semillas pre-germinadas y frascos de vidrio con medio de cultivo sólido, que igualmente se esterilizaron y desinfectaron. Posterior a esto, se procedió a sembrar las semillas pre-germinadas, con ayuda de pinzas previamente flameadas se acomodaron las semillas dentro del frasco, el cual al finalizar se cubre con papel aluminio y se sella con film plástico, para la prevención de futuras contaminaciones. Enseguida se introdujeron los frascos en la cámara de crecimiento, manteniendo una temperatura de 22 a 26 °C con fotoperiodos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz (Figura 8).



Figura 8. a. Semillas germinadas, b. Siembra de semillas.

Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.4.7 Preparación de medio para siembra de explantes (M2)

El medio de cultivo para explantes requiere varios insumos para que desarrolle brotes sin dificultad, los componentes por litro de agua destilada se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Insumos del M2.

Agar	6 g/l
Sales MS	2.5 g/l
Sacarosa	30 g/l
Vitaminas B5*	(10 ml)
Inositol	(100 mg/L)
TH-Cl	(1 mg/L)
Fitohormonas	
Ácido Indolacético (AIA)	0.25; 0.26; 0.28 mg/L
Kinetina	0.40; 0.60; 0.65 mg/L

*Solución madre

Elaborado por: Katty Montoya

Se realizó el mismo procedimiento que en el M1, con diferencia que después de colocar las vitaminas se añade las fitohormonas.

2.4.8 Siembra de meristemas apicales

Transcurridos 15 días se procedió a elegir explantes para que se desarrollen en un medio con hormonas vegetales, para ello se ubicaron los materiales indispensables para realizar dicho trabajo, entre ellos pinzas, papel filtro estéril, mechero de alcohol, recipiente con alcohol al 70%, plástico stretch film, bisturí, cinta aislante, frascos de vidrio con medio de cultivo sólido y las plántulas. Una vez dentro de la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se procedió a cortar el hipocótilo y la mitad de los cotiledones, con las pinzas se ubicaron los meristemas en el medio, así mismo se selló herméticamente con papel aluminio y plástico stretch film, por último, se etiqueta cada tratamiento (Figura 9).



Figura 9. a. Plántulas de UPSE-78, UPSE-19 y MICAELA; b. Cortes de explantes de UPSE-78, UPSE-19 y MICAELA; c. Siembra de explantes.
Fuente: Katty Montoya, (2020)

2.5 Variables Experimentales

2.5.1 Porcentaje de explantes con contaminación visible

Se determinó a los 12, 19 y 26 días después del establecimiento del ensayo, mediante el conteo de explantes contaminados. El resultado de esta variable está expresado en porcentaje aplicando la siguiente ecuación:

$$\%Contaminación = \frac{\text{número de explantes contaminados}}{\text{Total de explantes}} * 100$$

2.5.2 Porcentaje de Oxidación o Necrosis

Para conocer el porcentaje de oxidación se contabilizaron los explantes que presentaron oxidación y/o necrosis a los días 12, 19 y 26, evaluando según la escala (Tabla 14) de Guamán (2018):

Tabla 14. Escala de porcentaje de oxidación o necrosis.

ESCALA	NOMBRE	DETALLE
1	No oxidado	El explante es viable y no muestra oxidación degenerativa de tejido.
2	Oxidado vivo	Existencia de necrosamiento pero no muy avanzado, lo cual permite viabilidad del explante.
3	Oxidado muerto	Necrosamiento total.

Fuente: Guamán (2018)

Elaborado por: Katty Montoya

2.5.3 Longitud de la plántula

La longitud de las plántulas se evaluó a los 5, 12, 19 y 26 días, posteriores a la siembra del explante, utilizando un calibrador vernier para medir desde la base hasta el ápice del tallo, los resultados fueron medidos en centímetros.

2.5.4 Porcentaje de explantes que responden a cada medio de cultivo

Se determinó a los 5, 12, 19 y 26 días después de la siembra, mediante el conteo de explantes vivos sin oxidación, expresando el resultado porcentual.

$$\%Explantes = \frac{N^{\circ} \text{ Explantes no oxidados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

2.5.5 Promedio de brotes por explante

Se contabilizó la cantidad de brotes que presentaba cada explante a los 26 días posteriores a la siembra, obteniendo su promedio mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prom de brotes por explante} = \frac{\text{Total de brotes}}{\text{total de explantes con brotes}}$$

2.5.6 Número de explantes que forman plantas completas

A los 26 días después de la siembra del explante, se cuantificaron las plántulas que presentaron raíz, tallo y hojas.

2.5.7 Promedio del número de hojas

La siguiente variable fue evaluada visualmente, contabilizando el número de hojas por plántula a los 26 días, utilizando la siguiente fórmula.

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

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de explantes con contaminación visible

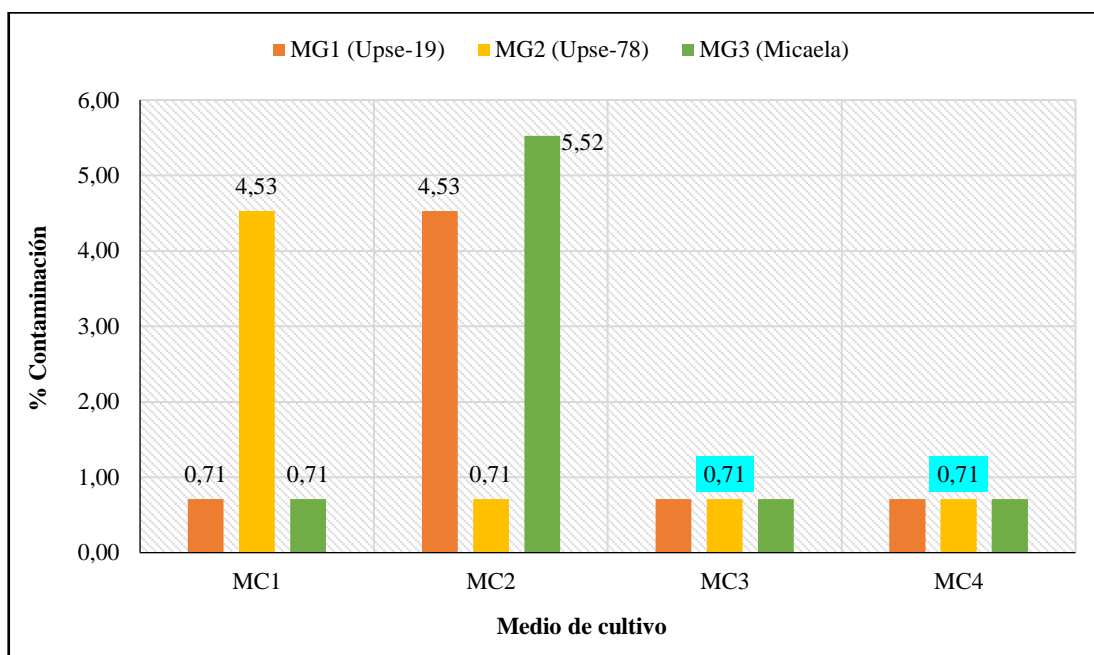


Figura 10. Porcentaje de contaminación en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 19 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 10 se observa que en los tres MG (materiales genéticos) se mantuvieron en el mismo porcentaje de contaminación con un valor de 0.71 %, en los MC (medios de cultivo) 3 y 4, mientras que UPSE-19 y UPSE-78 obtuvieron un porcentaje similar de contaminación de 4.53% en el testigo medio de cultivo 1 (MC1) y en el medio de cultivo 2 (MC2) respectivamente, en cambio en MICAELA en MC2, su porcentaje de contaminación fue más alto con un valor de 5.52%.

En base a lo anteriormente expuesto se puede mencionar que los materiales genéticos mejorados UPSE 19 y 78 se presentaron más tolerantes a la contaminación a diferencia de MICAELA que en las mismas dosis de auxinas y citocininas (0.40 mg/l citocinina-0.25 mg/l auxina) obtuvo un porcentaje más alto de contaminación. Así mismo se puede mencionar, que existe una correlación entre las dosis y la contaminación, es decir que a menor dosis mayor contaminación.

Al respecto Aguilar *et al.* (2016), mencionan que la contaminación se debe al incorrecto manejo de la fase en la cual se realiza el establecimiento del cultivo, teniendo como consecuencia la proliferación de hongos desarrollándose en colonias que son visibles después de dos semanas de incubación, para disminuir estos agentes patógenos se puede aplicar fungicidas sintéticos como Benomil y Mancozeb en proporción de 2 y 10 g/l respectivamente y los bactericidas cetofaxina y ampicilina en una relación de 25 mg/l.

Por otro lado Morales (2016), demuestra en su investigación que para mantener una completa esterilidad de los explantes y exista mayor germinación, el tratamiento de desinfección más eficaz es: alcohol al 30% por 10 min, hipoclorito de sodio al 30% durante 10 min y peróxido de hidrógeno al 7% por 8 min y finalmente enjuagados con agua destilada estéril.

3.2 Porcentaje de Oxidación o Necrosis

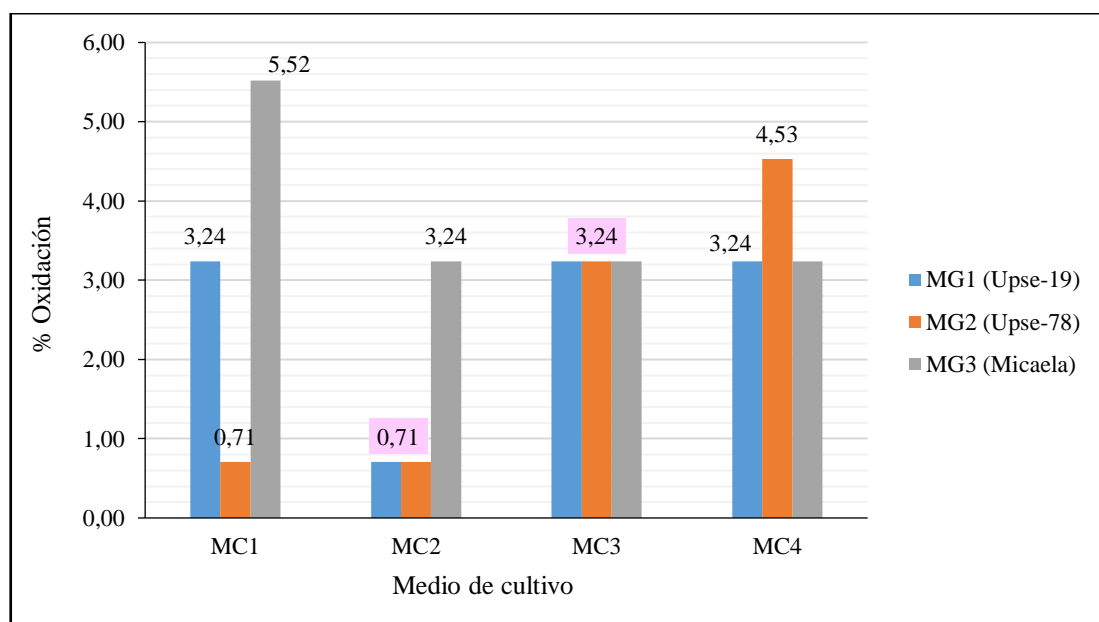


Figura 11. Porcentaje de oxidación en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* a los 26 días de evaluación, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 11 se refleja que UPSE-19 en el medio de cultivo 2 (MC2) tuvo el menor porcentaje de explantes oxidados (0.71%), mientras que el UPSE-78 en el medio de cultivo 4 (MC4) fue el que presentó mayor oxidación con un valor de 4.53%, por

último, MICAELA se mantuvo con un valor de 3.24% en los tres medios de cultivo con hormonas (MC2, MC3 y MC4).

Dicho de otro modo, el material MICAELA presentó una oxidación considerable, en comparación con los demás materiales genéticos. Por lo tanto, la utilización de mínimas dosis de hormonas ayuda a los explantes a sostener un crecimiento deseable. Estos resultados concuerdan con Aguilar *et al.* (2016), quienes reafirman que aplicar concentraciones bajas de fitohormonas ayuda a la prevención de la oxidación de los explantes.

Cabe destacar lo indicado por Pequeño *et al.* (2015), dado que la causa indirecta de la oxidación se debe al agente desinfectante hipoclorito de sodio, lo cual prueba que daña los tejidos del explante.

Según Recalde (2007) cuando se utiliza alcohol (70%) para desinfectar los explantes el porcentaje de necrosis aumenta, mientras que cuando se aplica simplemente cloro (20%) el porcentaje disminuye considerablemente.

3.3 Longitud de la plántula

Tabla 15. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable longitud de la plántula (mm) de *Solanum lycopersicum* en Factor A (Material genético) en cuatro días evaluados.

Días evaluados	G.L	F. Cal	<i>p</i> -valor
Día 5	2	36.54	<0.0001*
Día 12	2	12.48	<0.0001*
Día 19	2	13.44	<0.0001*
Día 26	2	18.36	<0.0001*
CV ^{1/}	13.07%; 14.41%; 11.63%; 11.30%		

* Significativo ($p < 0.05$)

1/ Días a la evaluación

Elaborado por: Katty Montoya

En la Tabla 15 se aprecia el Análisis de la varianza del Factor A en la variable longitud de la plántula, cuyos resultados demuestran que existe diferencias estadísticas significativas en función a *p*-valor, en todos los días de la evaluación. Así mismo, el

coeficiente de variación se presenta aceptable en todos los días evaluados, de acuerdo a los porcentajes, en un ambiente controlado.

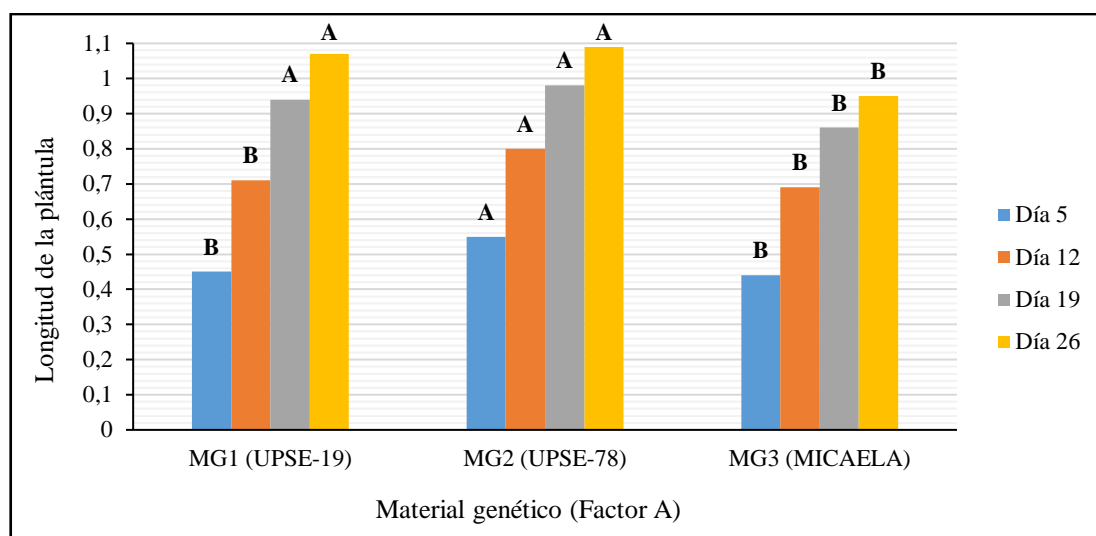


Figura 12. Resultados de cuatro evaluaciones de la longitud de la plántula *in vitro* de *Solanum lycopersicum*, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78 (Factor A).

En la Figura 12 se muestra los resultados del Factor A (Material genético) en el cual existe diferencias estadísticas significativas en los días evaluados 5, 12, 19 y 26; donde se observa que los materiales genéticos UPSE-19 (MG1), UPSE-78 (MG2) y MICAELA (MG3) en el día 5 obtuvieron las siguientes longitudes: 0.45 mm, 0.55 mm y 0.44 mm respectivamente; en cambio en el día 12 llegaron a 0.71 mm, 0.80 mm y 0.69 mm; en el día 19 alcanzaron 0.94 mm, 0.98 mm y 0.86 mm; y en el día 26 lograron 1.07 mm, 1.09 mm y 0.95 mm. Según las longitudes mencionadas se aprecia que el material que tuvo mayor desarrollo fue UPSE-78.

Tabla 16. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable Longitud de la plántula (mm) de *Solanum lycopersicum* en el Factor B (Medio de cultivo) en cuatro días evaluados.

Días evaluados	G.L	F. Cal	p- Valor
Día 5	3	1 061.42	<0.0001*
Día 12	3	349.46	<0.0001*
Día 19	3	570,82	<0.0001*
Día 26	3	471,42	<0.0001*
CV ^{1/}	13.07%; 14.41%; 11.63%; 11.30%		

* Significativo ($p < 0.05$)

1/ Días a la evaluación

Elaborado por: Katty Montoya

En la Tabla 16 se muestra el Análisis de la varianza del Factor B en la variable longitud de la plántula, que da como resultado diferencias estadísticas significativas en todos los días evaluados en función a p -valor. De igual manera, los porcentajes del coeficiente de variación son admisibles, en un ambiente controlado.

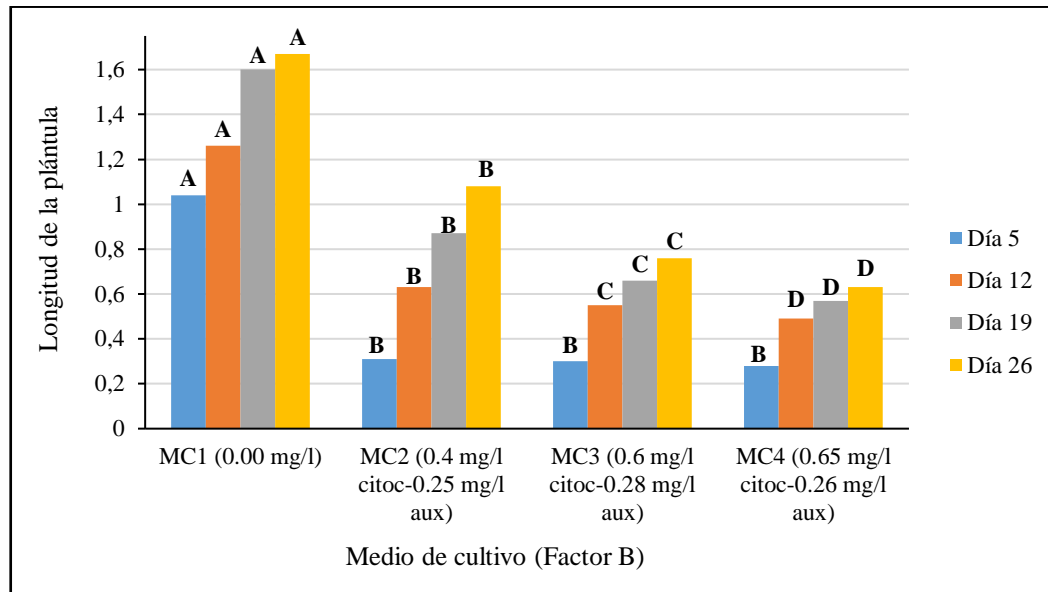


Figura 13. Resultados de la longitud de la plántula *in vitro* de *Solanum lycopersicum* en cuatro días evaluados, en los medios de cultivo MC1 (testigo), MC2, MC3 y MC4 (Factor B).

En la Figura 13 se puede apreciar que existen diferencias estadísticas significativas en el Factor B, donde el MC1 (testigo) a pesar de ser el medio sin hormonas, en todos los días evaluados fue el que resultó con mayores longitudes, siendo éstas las siguientes: 1.04 mm (día 5), 1.26 mm (día 12), 1.60 mm (día 19) y 1.67 mm (día 26); por otro lado uno de los medios de cultivo con hormonas que mejor se comportó fue el MC2 (medio de cultivo 2) con dosis de 0.4 mg/l citocinina-0.25 mg/l auxina, alcanzando longitudes entre 0.31 a 1.08 mm a partir del día 5; el medio de cultivo que tuvo un menor crecimiento fue el MC4 en los días 5, 12, 19 y 26 con valores de 0.28 mm, 0.49 mm, 0.57 mm y 0.63 mm respectivamente.

Tabla 17. ANDEVA ($p < 0.05$) de la variable longitud de la plántula (mm) de *Solanum lycopersicum* en Factor A*B (MG*MC) en cuatro días evaluados.

Días evaluados	G.L	F. Cal	p- Valor
Día 5	6	8.98	<0.0001*
Día 12	6	4.87	0.0002*
Día 19	6	4.17	0.0008*
Día 26	6	6.74	<0.0001*
CV ^{1/}	13.07%; 14.41%; 11.63%; 11.30%		

* Significativo ($p < 0.05$)

1/ Días a la evaluación

Elaborado por: Katty Montoya

En la Tabla 17 se visualiza el Análisis de la varianza del Factor A*B en la variable longitud de la plántula, el resultado muestra diferencias estadísticas significativas acorde a p -valor, en todos los días evaluados. Del mismo modo, el coeficiente de variación está dentro del rango del 15% establecido para un ambiente controlado.

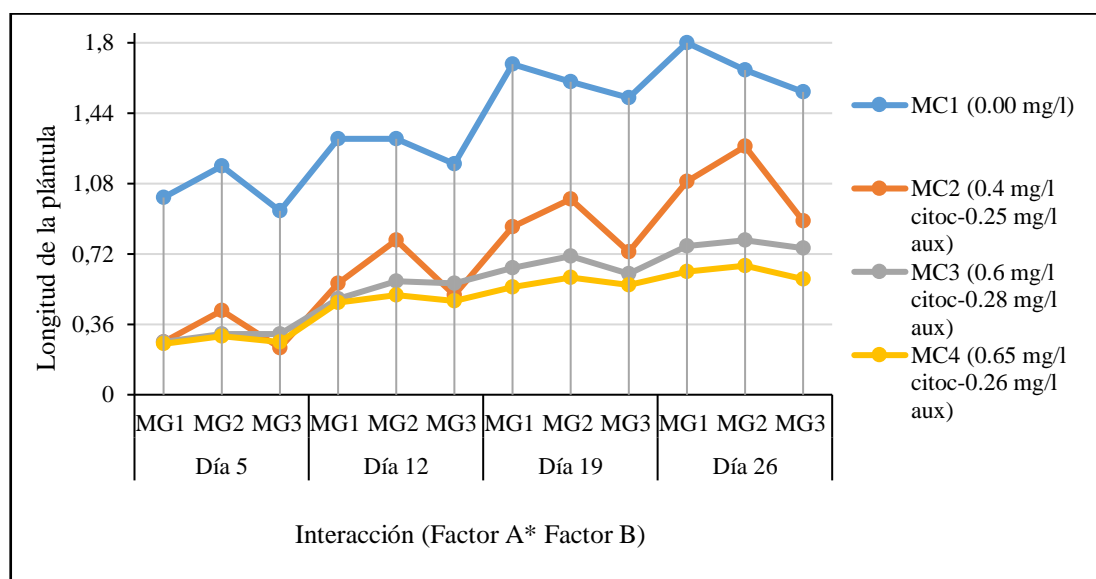


Figura 14. Longitud de la plántula en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* en cuatro días evaluados, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 14 se observa que en el medio de cultivo 1 (MC1) pese a ser el testigo, los materiales genéticos registraron un mayor crecimiento, es así que el material UPSE-78 en el día 5 llegó a medir 1.17 mm, mientras que entre los medios de cultivo que contenían hormonas, MC2 se muestra más favorable para los materiales UPSE-19 y 78, los cuales obtuvieron una longitud de 0.27 y 0.43 mm respectivamente, sin embargo para el material MICAELA el medio más apropiado fue el MC3 donde

registró 0.31 mm. Así mismo, en el día 26 se diferencia que el medio de cultivo con hormonas que alcanzó mayor crecimiento fue MC2, con los siguientes valores, 1.09 mm (UPSE-19), 1.27 mm (UPSE-78) y 0.89 mm (MICAELA); en cambio en el MC3 los tres materiales genéticos presentaron similar crecimiento con valores de 0.76 mm (UPSE-19), 0.79 mm (UPSE-78) y 0.75 mm (MICAELA).

De lo expuesto, se puede analizar que en el medio de cultivo sin hormonas existió un mayor crecimiento. No obstante, en concentraciones de 0.40 mg/l de citocinina y 0.25 mg/l de auxina el incremento fue favorable con respecto a las concentraciones de 0.60 mg/l de citocinina y 0.28 mg/l de auxina. Evidentemente la primera concentración es más adecuada para un mejor desarrollo de las plántulas.

Esto está relacionado con lo mencionado por Uribe y Cifuentes (2004), quienes afirman que las dosis de hormonas más adecuadas están entre 0.1 a 0.5 mg/l, así se logra aumentar la longitud de los explantes. Cárdenas *et al.* (2016), indican que la longitud de microtallo de la especie *Solanum dolichosepalum*, en medios de cultivo con auxinas más citocininas alcanzaron 3.6 a 4.1 cm.

3.4 Porcentaje de explantes que responden a cada medio de cultivo

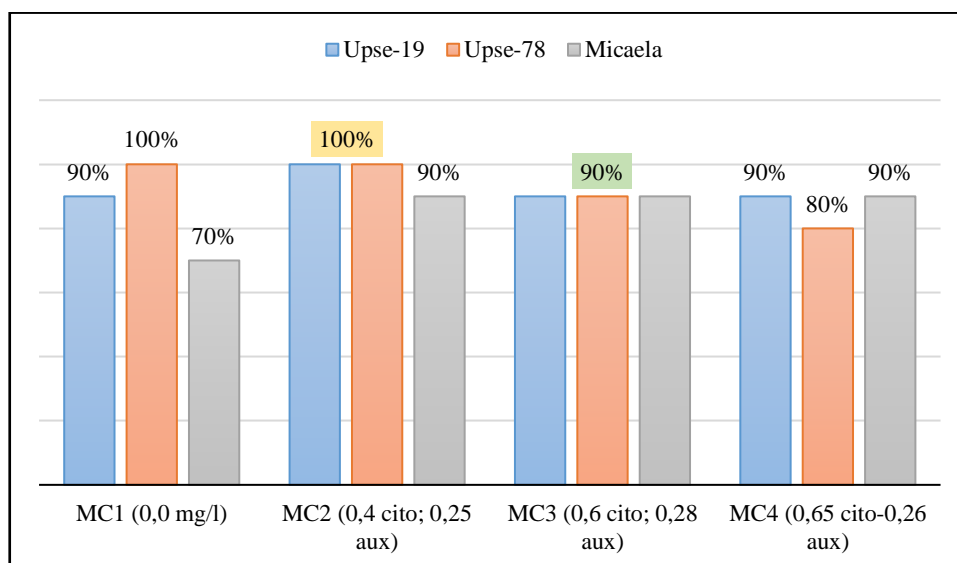


Figura 15. Porcentaje de explantes que responden a los medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 15, se observa que en el medio de cultivo 1 (MC1) el material que menor respuesta tuvo fue MICAELA con 70% de los explantes y los materiales UPSE-19 y 78 con el 90% y 100% respectivamente, en los medios de cultivo MC2 y MC3 el material MICAELA alcanzó un 90% de respuesta, en cambio en MC4 el que menos respondió fue el material UPSE-78 con 80% a diferencia de MICAELA y UPSE-19 que alcanzaron el 90%.

Lo expresado anteriormente, indica que en el medio con dosis bajas (0.25 mg/l de auxinas y 0.40 mg/l de citocininas) aumenta las probabilidades de tener mejor respuesta al medio de cultivo. A diferencia de lo que indica Cueva y Lucero (2018), el material comercial (Híbrido MICAELA) utilizado en este ensayo obtuvo resultados inferiores a los demás materiales, específicamente en el testigo. Las respuestas de los explantes en los medios de cultivo, también dependen de las dosis de hormonas, tal como menciona Medina (2013), al variar sus concentraciones se reforma el desarrollo de las células indiferenciadas.

3.5 Promedio de brotes por explante

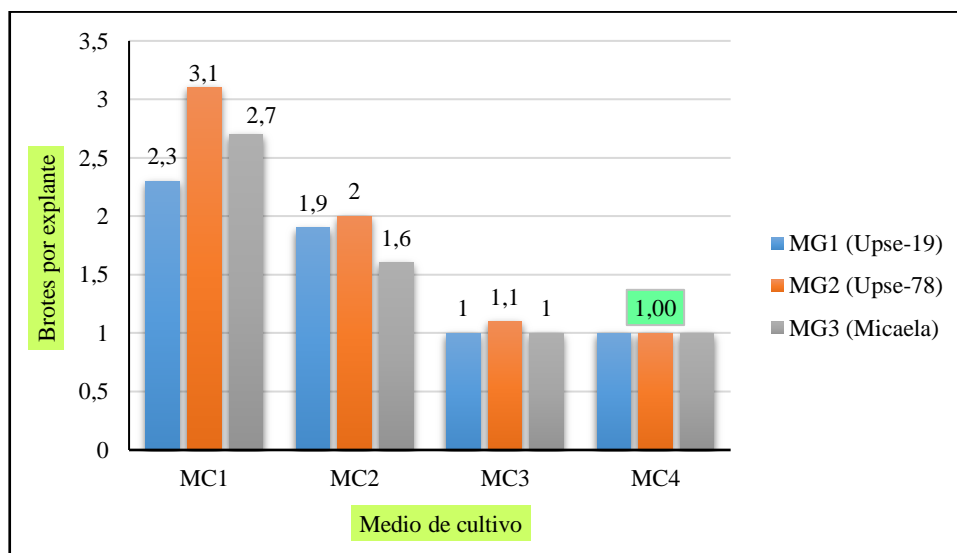


Figura 16. Promedio de brotes por explante en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 16 se observa que en el medio de cultivo testigo (MC1), el material genético UPSE-78 obtuvo un promedio máximo de 3.10 brotes, mientras que en el

material MICAELA se obtuvo 2.70 y en UPSE-19 se logró 2.30 brotes por explante. En MC2 el material UPSE-78 presenta un máximo de 2.00 brotes, seguido de UPSE-19 con 1.90 y el material MICAELA con 1.60 brotes por explante. Los valores inferiores se obtuvieron en MC4 con un promedio de brotes por planta de 1.00 en los tres materiales estudiados.

Los resultados anteriores indican que en concentraciones de 0.25 mg/l de auxinas y 0.40 mg/l de citocininas, el material UPSE-78 fue el que mejor se desarrolló, en cambio utilizando 0.26 mg/l de auxinas y 0.65 mg/l de citocininas los materiales genéticos presentaron similar desarrollo, lo que indica que a menor concentración de auxinas y citocininas mayor número de brotes. Cabe recalcar que los explantes desarrollados en cultivos *in vitro* sin concentraciones de auxinas y citocininas presentaron aún mayor número de brotes, que en presencia de hormonas. Esto concuerda con Morales (2016), quien señala que al emplear concentraciones altas de hormonas la brotación de las plántulas disminuye, en cambio cuando se usa dosis relativamente bajas incrementa la brotación.

Los resultados de este experimento son similares a los realizados por Barcelo *et al.* (1995) citado por Uribe y Cifuentes (2004), donde expresa que aplicando combinación de fitohormonas en donde la citocinina debe ser mayor a la auxina para aumentar la inducción de brotes. De igual forma, coinciden con los resultados conseguidos por Criollo *et al.* (2016), donde con la aplicación al medio de cultivo de 0.5 mg/l de AIA el promedio de brotes de *Solanum betaceum* fue 1.50, mientras que sin AIA el promedio fue de 0.90 brotes.

Maestu (2018), indica que para la producción de brotes de tomate de colgar, el medio de cultivo más eficiente, es aquel que contiene Ácido indolacético (0.5 mg/l), Kinetina (1 mg/l) y Zeatina (1 mg/l) generando 6 brotes por explante.

3.6 Número de explantes que forman plantas completas

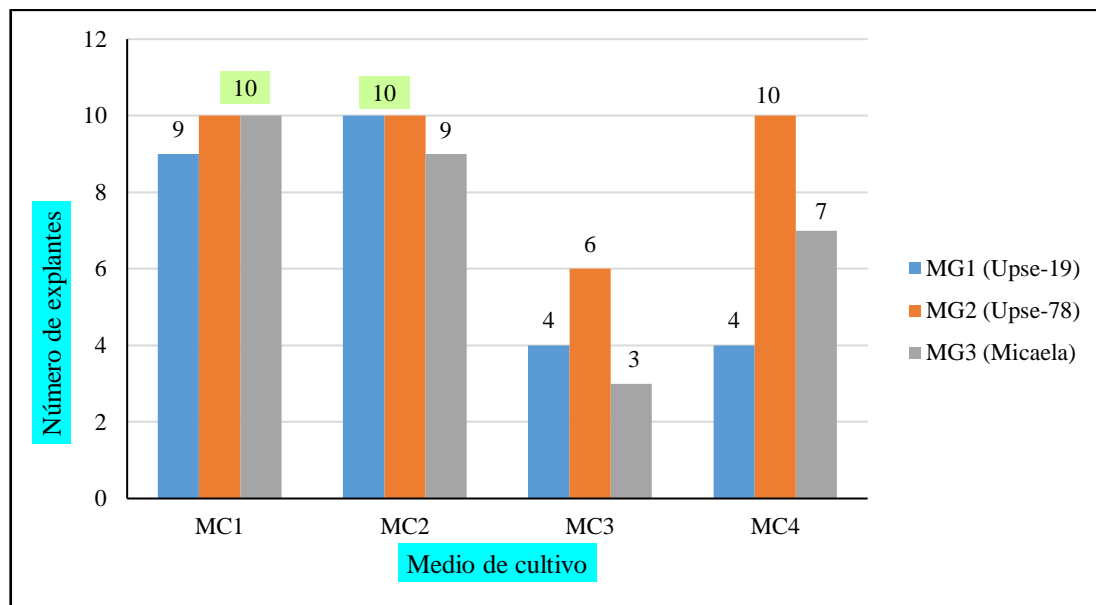


Figura 17. Número de explantes que forman plantas completas en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* a los 26 días de evaluación, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 17, resulta claro que en el medio de cultivo 2 (MC2) todos los explantes de los materiales UPSE-19 y UPSE-78 formaron plantas completas y el material MICAELA en cambio formó solamente nueve plántulas. Por el contrario, en MC3, seis explantes de UPSE-78 originaron plantas completas, UPSE-19 únicamente cuatro plántulas, y MICAELA sólo tres plántulas. Por otra parte, en MC4 el material cuatro explantes de UPSE-19 produjeron plantas completas, en MICAELA se formaron siete plántulas y en UPSE-78 el total de los explantes formaron plantas completas.

Lo expresado anteriormente, señala que en dosis de 0.25 mg/l de auxinas y 0.40 mg/l de citocininas, los materiales alcanzaron su máximo potencial para convertirse en plantas completas, mientras que en dosis de 0.28 mg/l de auxinas y 0.60 mg/l de citocininas, al igual que 0.26 mg/l de auxinas y 0.65 mg/l de citocininas, disminuyeron su potencial para desarrollarse. En efecto dosificar mínimas concentraciones al medio de cultivo, beneficia a los explantes en su proceso de transformación.

Esto concuerda con Criollo *et al.* (2016), quienes dicen que aplicando AIA (0.5 mg/l) sin citocininas el porcentaje de plántulas completas fue de 36,9 % siendo el mejor de sus resultados.

3.7 Promedio del número de hojas

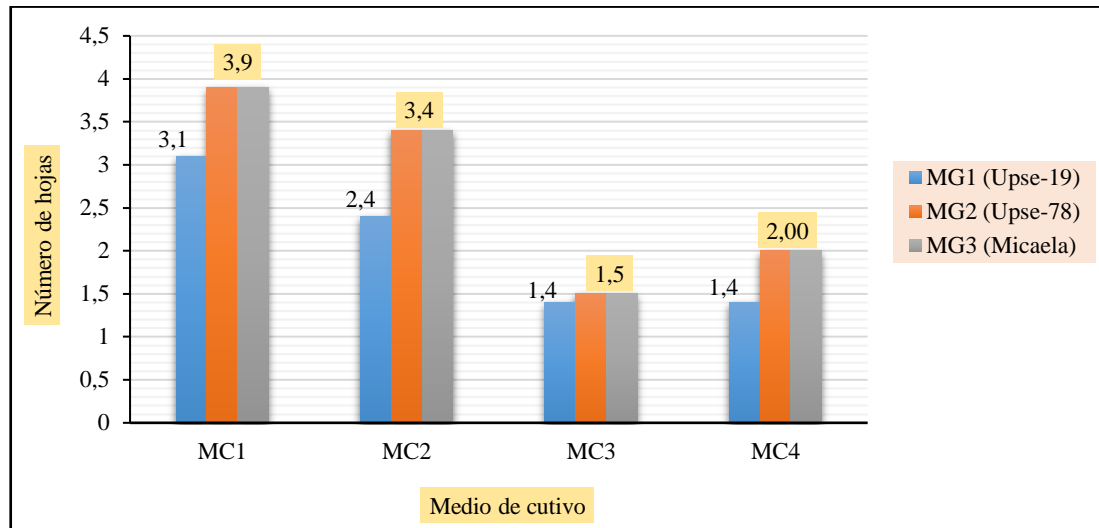


Figura 18. Promedio del número de hojas en medios de cultivo *in vitro* de *Solanum lycopersicum* evaluado a los 26 días, en los materiales genéticos Híbrido MICAELA, UPSE 19 y 78, con diferentes concentraciones de auxinas/citocininas.

En la Figura 18 se muestra que los medios con hormonas, el medio de cultivo 2 (MC2), fue el que tuvo mejor efecto en los tres materiales genéticos, en donde UPSE-78 y MICAELA generaron tres hojas por plántula, mientras que en MC3 todos adquirieron menos de dos hojas por plántula.

En relación a la idea anterior, el medio de cultivo que contenía menos dosis (0.25 mg/l de auxinas y 0.40 mg/l de citocininas) formó un aumento de las hojas en las plántulas a diferencia del medio que tenía mayor concentración (0.28 mg/l de auxinas y 0.60 mg/l de citocininas), en síntesis las hormonas usadas en concentraciones altas son las menos adecuadas para originar la cantidad de hojas que se requiere en estos cultivos; concordando con Uribe y Cifuentes (2004) quienes indican que las diferencias estadísticas son significativas cuando se aplica los dos tipos de hormonas (auxina/citocinina) combinando las dosis entre 0.1-0.5 mg/l respectivamente.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- ✓ La combinación de las hormonas auxina (Ácido Indolacético) y citocinina (Kinetina) respondieron de manera óptima en la producción de brotes con 100% de respuesta en UPSE-78 y 19 que generaron 2 y 1.90 brotes por explante respectivamente y el 90% de respuesta en el Híbrido MICAELA con 1.60 brotes.
- ✓ El material genético UPSE-78 generó plántulas de 1.27 mm de longitud, las cuales obtuvieron un promedio de tres hojas por plántula, en cambio en UPSE-19 la longitud fue de 1.09 mm con un promedio de dos hojas; mientras que MICAELA presentó plántulas de 0.89 mm con tres hojas. En los tres casos se formaron plántulas completas en el medio de cultivo 2.
- ✓ Se considera que el mejor protocolo se obtuvo con el medio de cultivo MC2 (0.25 mg/l de Ácido Indolacético y 0.40 mg/l de Kinetina) porque los explantes se desarrollaron mejor debido a los siguientes componentes: agar (6 g/l); Sales MS (2.5 g/l); sacarosa (30 g/l); Inositol (100 mg/l); TH-Cl (1 mg/l); Kinetina (0.40 mg/l) y Ácido Indolacético (0.25 mg/l).

Recomendaciones

- ✓ Para generar mejores respuestas en los explantes se puede utilizar concentraciones hasta 0.25 mg/l de Ácido Indolacético y 0.40 mg/l de Kinetina.
- ✓ Para que el desarrollo de los explantes *in vitro* de *Solanum lycopersicum*, tengan buen comportamiento en el medio de cultivo, es necesario que la asepsia del laboratorio y materiales sea minuciosa para prevenir posibles contaminaciones.
- ✓ Antes de empezar las labores, limpiar y desinfectar el área de trabajo, utilizando guantes, mascarilla, mandil y gorro. Colocar recipientes para separar los residuos orgánicos, inorgánicos, plástico y de vidrio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, N., Aguirre, G., Ávila, T., Pierre, J., Cadima, X., Calle, M., 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos, 1st ed. MAWIL, Cochabamba-Bolivia. <https://doi.org/10.26820/978-9942-787-98-9>
- Álvarez, E., 2018. Cultivo *in vitro* [WWW Document]. URL <http://centa.gob.sv/upload/laboratorios/biotecnologia/2018/CULTIVO%20IN%20VITRO.pdf> (accessed 9.26.19).
- Angarita, M.D.P., 2012. Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum Lycopersicum* CV. P73) e identificación de mutantes de inserción, Universidad Politécnica de Valencia. ed. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Aragón, J., 2019. Determinación del rendimiento económico del cultivo de tomate riñón (*Solanum lycopersicum* L.) bajo invernadero, en el sector de Pilchibuela, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura, 2019. Universidad Técnica de Babahoyo, El Ángel-Carchi-Ecuador.
- Argerich, C., Troilo, L., Rodríguez, M., Izquierdo, J., Strassera, M., Balcaza, L., Dal Santo, S., Miranda, O., Rivero, M., González, G., Iribarren, M., 2010. Buenas Prácticas Agrícolas en la Cadena de Tomate.
- Azofeifa, Á., 2008. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agron. Mesoam. 20, 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Barrueto, L.P., Carvalho, L., 2008. Importance of Abscisic Acid (ABA) in the *In Vitro* Conservation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Chil. J. Agric. Res. 68. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392008000300011>
- Barzola, R., 2017. Estudio agrosocioeconómico de la producción de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) en la zona norte de la provincia de Santa Elena. Universidad Estatal Península de Santa Elena, Santa Elena-La Libertad.
- Borrero, E., 2007. Protocolo para la regeneración de plántulas a partir de explantes de hojas de cinco variedades Ecuatorianas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Universidad San Francisco, Quito.
- Calva, G., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Rev. Digit. Univ. 16.
- Cárdenas, C., Pacheco, J., Laforga, A., 2016. Propagación *in vitro* de *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae) 7, 9. <https://doi.org/10.19053/01217488.v7.n2.2016.4122>
- Castillo, A., 2017. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.
- Cerezo, J., 2017. Fisiología Vegetal.
- Chamorro, A., Villalobos, M., Arroyo, A., 2016. Efecto del ácido abscísico sobre el desarrollo del musgo tolerante a desecación *Bryum ballarderi*. p. 6.

- Contreras, R., 2013. La totipotencia en cultivos de tejido vegetal [WWW Document]. La Guía. URL <https://biologia.laguia2000.com/botanica/la-totipotencia-en-cultivos-de-tejido-vegetales> (accessed 9.25.19).
- Criollo, H., Insuasti, K., Degaldo, W., 2016. Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt.). Rev. Colomb. Cienc. Hortícolas 10, 252–261. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>
- Cueva, J., Lucero, H., 2018. Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la germinación de *Gynoxys verrucosa*. Bionatura 3. <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.04.8>
- Domínguez, M., González, M. de la L., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., Pérez, E., 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave* 16.
- Escobar, H., Lee, R., 2009. Manual de producción de Tomate Bajo Invernadero.
- González, G., 2014. Mejora genética de una variedad tradicional de tomate (Pera de girona) por el método genealógico: Análisis y selección en las generaciones F2 y F3 57.
- Górriz, A., 2019. Morfogénesis en cultivo *in vitro* de cultivares autóctonos de melón. Universidad Politécnica de Valencia, ETSIAMN, Valencia-España.
- Guamán, D., 2018. Desarrollo de un protocolo de establecimiento *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir de meristemos axilares. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Guzmán, A., Corradini, F., Martínez, J., Allende, M., Abarca, P., Felmer, S., Torres, A., 2017. Manual de cultivo del Tomate al aire Libre.
- Hernández, K., Chico, J., 2020. Inducción de brotes y raíces en hipocótilos y cotiledones de *Physalis peruviana* L. utilizando 6-bencilaminopurina y 2,4-diclorofenoxiacético. Rev. Investig. Altoandinas 22, 87–94. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.539>
- Hernández, Y., 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación 31, 13.
- Hoyos, P., Martín, M., 2005. El cultivo de tomate para fresco: situación actual y perspectivas desde el punto de vista técnico y comercial. San Fernando de Henares (Madrid).
- Indacochea, B., Parrales, J., Zhindón, B., Valverde, Y., Álvarez, B., Choez, P., 2019. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos, 1era ed. Mawil Publicaciones de Ecuador, Manabí-Ecuador.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos, I., 2018. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua.
- Jordán, M., Casaretto, J., 2006. Hormonas y Reguladores de Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiol. Veg. 15, 1–28.
- López, L., 2016. Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. INTA, Costa Rica.

- Luna, M., Delgado, A., 2014. Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). redalyc.org, Avances en Investigación Agropecuaria 18, 17.
- Maestu, E., 2018. Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Medina, O., 2013. Propagación *in vitro* y cultivo en invernadero de variedades exóticas de jitomate. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.
- Morales, J., 2016. Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de la semilla de *Solanum caripense Dunal*, para la obtención de plantas libres de bacterias y hongos. Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Ecuador-Quito.
- Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschiand, E., 2011. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Ortiz, E., 2018. Plan de negocio para la producción y exportación de plantas de cultivo *in vitro* destinadas a la agricultura urbana desde Ecuador hacia México DF. UDLA.
- Osuna, P., Saucedo, C., 2011. Propagación *in vitro* de *vid* variedad Globo Rojo, Primera. ed, ICB. Ciudad Juárez, Chihuahua, México.
- Palazón, D., García, S., 2015. Evaluación de líneas de mejora de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) de la Pera con resistencia a virus cultivadas bajo malla. Universidad Miguel Hernández, España.
- Pelacho, A., Closas, L., Sanfeliu, J., 2006. Micropropagación *in vitro* (Investigativo). Universidad de Lleida, España.
- Pequeño, I., Martínez, G., Aguirre, V., Iracheta, L., Mojica, V., Rodríguez, G., Ojeda, M., 2015. Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo 7.
- Perea, M., 2009. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, A. ed. Proceditor Ltda, Colombia-Bogotá.
- Polo, J., 2014. Historia del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales [WWW Document]. Gest. Coop. Proy. URL <https://sites.google.com/a/fca.edu.co/janer-polo/cursos-academicos/biotecnologia-vegetal/historia-del-cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetales> (accessed 9.25.19).
- Ramírez, H., Lentini, Z., Vallego, F., 2009. Evaluación y selección de un protocolo para la regeneración *in vitro* de la variedad de tomate Unapal-Arreboles 58, 29–33.
- Recalde, C., 2007. Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepeta hederacea variegata* Tabacundo – Pedro Moncayo, 2006. Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador-Pichincha.
- Rivas, C.G., 2016. Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetal. Artíc. Téc. INTAGRI México 59, 5.
- Rivera, H., 2010. Manejo del cultivo de tomate Indeterminado Micaela HA-1903.

- Rodríguez, M., Torres, M., 2018. Cultivo *in vitro*: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales 20.
- Santana, J., 2019. Evaluación de cambios morfológicos en explantes *in vitro* de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*), regulados por la edad fisiológica. Universidad Estatal Península de Santa Elena, Santa Elena-La Libertad.
- Sharry, S., Adema, M., Abedini, W., 2015. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* 241.
- Uribe-Moraga, M., Cifuentes, L., 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. Bosque Valdivia 25, 129–135. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002004000100012>
- Varela, A., 2018. Estudio de la producción y comercialización del tomate riñón (*Lycopersicum Esculentum*) en el cantón Pimampiro, de la provincia de Imbabura. Universidad Técnica del Norte, Imbabura.
- Vega, P., Canchignia, H., González, M., Seeger, M., 2016. Revisión bibliográfica: Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cultiv. Trop. 37, 33–40.

ANEXOS

GLOSARIO

MS: Medio de cultivo Murashige y Skoog

M1: Medio de cultivo para germinación

M2: Medio de cultivo para explantes con hormonas vegetales

Explantos: Tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento.

Reguladores de crecimiento: Son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas.

Citocininas: Son un grupo de hormonas vegetales (fitohormonas) que promueven la división y la diferenciación celular, también regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

Auxinas: Son hormonas que participan durante todo el ciclo de vida de las plantas y se distribuyen diferencialmente dentro de los tejidos lo que da lugar a diferentes procesos morfogénicos.

Necrosis: Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Oxidación: Es el oscurecimiento del tejido y generalmente precede a la inhibición del crecimiento y, en los casos graves, a la necrosis y muerte del tejido.

Tabla 1A. Presupuesto de materiales de laboratorio.

Concepto	Cantidad	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Matraz Erlenmeyer 1000 ml	2	25.00	50.00
Matraz Erlenmeyer 500 ml	2	18.00	36.00
Matraz Erlenmeyer 250 ml	4	13.00	52.00
Vasos de precipitación de 250 ml	4	10.00	40.00
Vasos de precipitación 100 ml	4	8.00	32.00
Vasos de precipitación 50 ml	4	2.00	8.00
Probeta 250 ml	2	18.00	36.00
Probeta 50 ml	2	9.00	18.00
Frascos de vidrio 250 ml	100	2.00	200.00
Espátula mango de madera	2	6.00	12.00
Hojas de bisturí #15	50	5.00	250.00
Pinza bayoneta de Jansen	2	7.50	15.00
Mechero de alcohol	1	8.00	8.00
Gasa	1	8.00	8.00
Papel filtro pliego	25	0.50	12.50
Papel aluminio 150 m	1	17.68	17.68
Film plástico rollo	1	3.00	3.00
Papel toalla 150 m	1	8.04	8.04
Cloro 3700 ml	50	2.72	2.72
Alcohol 3700 ml	50	8.93	8.93
Mascarillas 50 unidades	1	2.98	2.98
Guantes 50 pares	2	5.85	11.70
Puntas de pipeta cito test x 500 U	1	8.00	8.00
Mango de bisturí #3	3	2.50	7.50
Varilla agitadora magnética	2	5.00	10.00
Cinta aislante 120 yardas	1	1.60	1.60
Cinta Parafilm 4'' x 125 pies	1	36.80	36.80
Cinta masking	1	1.50	1.50
Cajas Petri	100	35.00	35.00
Subtotal 1			932.95

Tabla 2A. Presupuesto de Insumos de laboratorio.

Concepto	Cantidad	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Agar 454 g	1	93.00	93.00
Sacarosa 1 Kg	1	1.50	1.50
Sucrosa AR 500 g	1	25.00	25.00
Sales M519 50 L	1	28.97	28.97
Vitamina Inositol 500 g	1	219.90	219.90
Vitamina Tiamina HCl 250 g	1	130.00	130.00
Hormona A.N.A. 250 ml	1	9.80	9.80
Hormona Kinetina 10 g	1	100.00	100.00
Agua destilada galón	5	2.50	12.50
Subtotal 2			620.67

Tabla 3A. Presupuesto de equipos de laboratorio.

Concepto	Cantidad	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Autoclave	1	9 800	9 800
Estufa	1	5 953	5 953
Cámara de flujo laminar	1	3 300	3 300
Cámara de crecimiento	1	2 500	2 500
Balanza analítica	1	350	350
Agitador magnético con calefacción	1	400	400
Micropipeta 1000-100ml y de 100-10ml	2	150	300
pH metro digital	1	30	30
Subtotal 3			22 633

Tabla 4A. Presupuesto total del experimento.

Concepto	Costo Total (\$)
Subtotal 1	932.95
Subtotal 2	620.67
Subtotal 3	22 633
TOTAL	24 186.62

Tabla 5A. Resultados semanales de las variables evaluadas durante el establecimiento del cultivo *in vitro* de *S. lycopersicum*.

Tratamientos	Día después de la siembra	Long/plántula	% explantes que responden al MC	% Contaminación	% Oxidación	Prom/brotes*explante	# explantes que forman plantas completas	Prom/# de hojas
T1: MG1M1	5	1.01	100%					
	12	1.31	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	1.69	90%	0.707106781	3.240370349			
	26	1.80	90%	0.707106781	3.240370349	2.30	9.00	3.10
T2: MG1M2	5	0.27	100%					
	12	0.57	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.86	100%	4.527692569	0.707106781			
	26	1,09	100%	5.522680509	0.707106781	1.90	10.00	2.40
T3: MG1M3	5	0.27	100%					
	12	0.49	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.65	100%	0.707106781	0.707106781			
	26	0,76	90%	0.707106781	3.240370349	1.00	4,00	1,40

Tratamientos	Día después de la siembra	Long/plántula	% explantes que responden al MC	% Contaminación	% Oxidación	Prom/brotos*explante	# explantes que forman plantas completas	Prom/# de hojas
T4: MG1M4	5	0.26	100%					
	12	0.47	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.55	100%	0.707106781	0.707106781			
	26	0.63	90%	0.707106781	3.240370349	1.00	4,00	1,40
T5: MG2M1	5	1.17	100%					
	12	1.31	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	1.59	100%	4.527692569	0.707106781			
	26	1,66	100%	5.522680509	0.707106781	3.10	10.00	3.90
T6: MG2M2	5	0.43	100%					
	12	0.79	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	1.00	100%	0.707106781	0.707106781			
	26	1,27	100%	0.707106781	0.707106781	2.00	10.00	3.40
T7: MG2M3	5	0.31	100%					
	12	0.58	100%	4.527692569	0.707106781			
	19	0.71	90%	0.707106781	3.240370349			
	26	0.79	90%	0.707106781	3.240370349	1.10	6,00	1.50

Tratamientos	Día después de la siembra	Long/plántula	% explantes que responden al MC	% Contaminación	% Oxidación	Prom/brotos*explante	# explantes que forman plantas completas	Prom/# de hojas
T8: MG2M4	5	0.30	100%					
	12	0.51	100%	4.527692569	0.707106781			
	19	0.6	80%	0.707106781	4.527692569			
	26	0.66	80%	0.707106781	4.527692569	1.00	10.00	2.00
T9: MG3M1	5	0.94	100%					
	12	1.17	100%	4.527692569	0.707106781			
	19	1.52	70%	0.707106781	5.522680509			
	26	1.55	70%	0.707106781	5.522680509	2.70	10.00	3.90
T10: MG3M2	5	0.24	100%					
	12	0.51	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.73	90%	5.522680509	3.240370349			
	26	0,89	90%	0.707106781	3.240370349	1.60	9.00	3.40
T11: MG3M3	5	0.31	100%					
	12	0.57	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.61	100%	0.707106781	0.707106781			
	26	0,74	90%	0.707106781	3.240370349	1.00	3.00	1.50
T12: MG3M4	5	0.27	100%					
	12	0.48	100%	0.707106781	0.707106781			
	19	0.56	90%	0.707106781	3.240370349			
	26	0.59	90%	0.707106781	3.240370349	1.00	7.00	2.00

Porcentaje de Oxidación o Necrosis

Tratamientos	Día después de la siembra	ESCALA					
		1 (N.O.)	Raíz	2 (O.V)	Raíz	3 (O.M)	Raíz
T1: MG1M1	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	9	9.51	1	3.24	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T2: MG1M2	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	10	10	0	0.71	0	0.71
	26	10	10	0	0.71	0	0.71
T3: MG1M3	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	10	10	0	0.71	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T4: MG1M4	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	10	10	0	0.71	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T5: MG2M1	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	10	10	0	0.71	0	0.71
	26	10	10	0	0.71	0	0.71
T6: MG2M2	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	10	10	0	0.71	0	0.71
	26	10	10	0	0.71	0	0.71
T7: MG2M3	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	9	9.51	1	3.24	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T8: MG2M4	5	10	10	0	0.71	0	0.71
	12	10	10	0	0.71	0	0.71
	19	8	9	2	4.53	0	0.71
	26	8	9	2	4.53	0	0.71

Porcentaje de Oxidación o Necrosis

Tratamientos	Día después de la siembra	ESCALA					
		1 (N.O.)	Raíz	2 (O.V)	Raíz	3 (O.M)	Raíz
T9: MG3M1	5	10	10.00	0	0.71	0	0.71
	12	10	10.00	0	0.71	0	0.71
	19	7	8.40	3	5.52	0	0.71
	26	7	8.40	3	5.52	0	0.71
T10: MG3M2	5	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	12	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	19	9	9.51	1	3.24	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T11: MG3M3	5	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	12	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	19	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71
T12: MG3M4	5	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	12	10	10.02	0	0.71	0	0.71
	19	9	9.51	1	3.24	0	0.71
	26	9	9.51	1	3.24	0	0.71

Tabla 6A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 5).

Análisis de varianza					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13.08	13	1.01	254.78	<0.0001
Repetición	0.0038	2	0.0019	0.48	0.6225
Factor A	0.29	2	0.14	36.54	<0.0001
Factor B	12.58	3	4.19	1061.42	<0.0001
Factor A*Factor B	0.21	6	0.04	8.98	<0.0001
Error	0.42	106	0.004		
Total	13.5	119			

Medias Factor B (M.C.)				
Factor B	Medias	n	E.E.	
MC1	1.04	30	0.01	A
MC2	0.31	30	0.01	B
MC3	0.30	30	0.01	B
MC4	0.28	30	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat Gen)				
Factor A	Medias	n	E.E.	
MG2	0.55	40	0.01	A
MG1	0.45	40	0.01	B
MG3	0.44	40	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat. Gen)*Factor B (M.C.)					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
MG2	MC1	1.17	10	0.02	A
MG1	MC1	1.01	10	0.02	B
MG3	MC1	0.94	10	0.02	C
MG2	MC2	0.43	10	0.02	D
MG3	MC3	0.31	10	0.02	E
MG2	MC3	0.31	10	0.02	E
MG2	MC4	0.30	10	0.02	E F
MG3	MC4	0.27	10	0.02	E F
MG1	MC3	0.27	10	0.02	E F
MG1	MC2	0.27	10	0.02	E F
MG1	MC4	0.26	10	0.02	E F
MG3	MC2	0.24	10	0.02	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 7A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 12).

Análisis de varianza					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12.29	13	0.95	85.35	<0.0001
Repetición	0.08	2	0.04	3.51	0.0334
Factor A	0.28	2	0.14	12.48	<0.0001
Factor B	11.61	3	3.87	349.46	<0.0001
Factor A*Factor B	0.32	6	0.05	4.87	0.0002
Error	1.17	106	0.01		
Total	13.46	119			

Medias Factor B (M.C.)				
Factor B	Medias	n	E.E.	
MC1	1.26	30	0.02	A
MC2	0.63	30	0.02	B
MC3	0.55	30	0.02	C
MC4	0.49	30	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat Gen)				
Factor A	Medias	n	E.E.	
MG2	0.80	40	0.02	A
MG1	0.71	40	0.02	B
MG3	0.69	40	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat. Gen)*Factor B (M.C.)					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
MG2	MC1	1.31	10	0.03	A
MG1	MC1	1.31	10	0.03	A
MG3	MC1	1.18	10	0.03	B
MG2	MC2	0.79	10	0.03	C
MG2	MC3	0.58	10	0.03	D
MG1	MC2	0.57	10	0.03	D
MG3	MC3	0.57	10	0.03	D
MG3	MC2	0.51	10	0.03	D
MG2	MC4	0.51	10	0.03	D
MG1	MC3	0.49	10	0.03	D
MG3	MC4	0.48	10	0.03	D
MG1	MC4	0.47	10	0.03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 8A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 19).

Análisis de varianza					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20.39	13	1.57	135,96	<0.0001
Repetición	0.04	2	0.02	1.54	0.2185
Factor A	0.31	2	0.16	13.44	<0.0001
Factor B	19.75	3	6.58	570.82	<0.0001
Factor A*Factor B	0.29	6	0.05	4.17	0.0008
Error	1.22	106	0.01		
Total	21.61	119			

Medias Factor B (M.C.)				
Factor B	Medias	n	E.E.	
MC1	1.60	30	0.02	A
MC2	0.87	30	0.02	B
MC3	0.66	30	0.02	C
MC4	0.57	30	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat Gen)				
Factor A	Medias	n	E.E.	
MG2	0,98	40	0.02	A
MG1	0.94	40	0.02	A
MG3	0.86	40	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat. Gen)*Factor B (M.C.)					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
MG1	MC1	1.69	10	0.03	A
MG2	MC1	1.60	10	0.03	B
MG3	MC1	1.52	10	0.03	B
MG2	MC2	1.00	10	0.03	C
MG1	MC2	0.86	10	0.03	D
MG3	MC2	0.73	10	0.03	E
MG2	MC3	0.71	10	0.03	E F
MG1	MC3	0.65	10	0.03	E F G
MG3	MC3	0.62	10	0.03	F G
MG2	MC4	0.60	10	0.03	G
MG3	MC4	0.56	10	0.03	G
MG1	MC4	0.55	10	0.03	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 9A. Análisis estadístico de la variable longitud de la plántula (día 26).

Análisis de varianza					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20.40	13	1.57	114.81	<0.0001
Repetición	0.02	2	0.01	0.57	0.5675
Factor A	0.50	2	0.25	18.36	<0.0001
Factor B	19.33	3	6.44	471.42	<0.0001
Factor A*Factor B	0.55	6	0.009	6.74	<0.0001
Error	1.45	106	0.01		
Total	21.85	119			

Medias Factor B (M.C)				
Factor B	Medias	n	E.E.	
MC1	1.67	30	0.02	A
MC2	1.08	30	0.02	B
MC3	0.76	30	0.02	C
MC4	0.63	30	0.02	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)











Medias Factor A (Mat Gen)				
Factor A	Medias	n	E.E.	
MG2	1.09	40	0.02	A
MG1	1.07	40	0.02	A
MG3	0.95	40	0.02	B


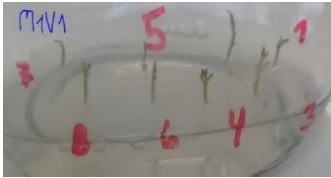





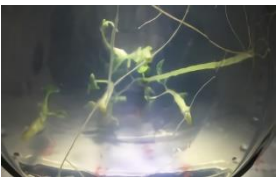

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Medias Factor A (Mat. Gen)*Factor B (M.C.)					
Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
MG1	MC1	1.80	10	0.04	A
MG2	MC1	1.66	10	0.04	B
MG3	MC1	1.55	10	0.04	C
MG2	MC2	1.27	10	0.04	D
MG1	MC2	1.09	10	0.04	E
MG3	MC2	0.89	10	0.04	F
MG2	MC3	0.79	10	0.04	G
MG1	MC3	0.76	10	0.04	G H
MG3	MC3	0.75	10	0.04	G H
MG2	MC4	0.66	10	0.04	H I
MG1	MC4	0.63	10	0.04	I
MG3	MC4	0.59	10	0.04	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 10A. Proceso del ensayo.

Esterilización de materiales	Desinfección de semillas	Pre-germinación de semillas	Destilación	Preparación de hormonas
				
Preparación de medios de cultivo	Siembra de semillas	Plántulas germinadas	Corte de explantes	Siembra de explantes
				

Toma de datos	Desarrollo de explantes			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
				
				

Desarrollo de explantes

Semana 1



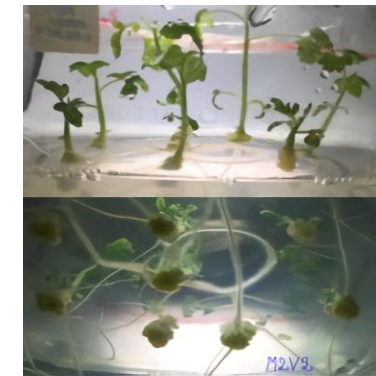
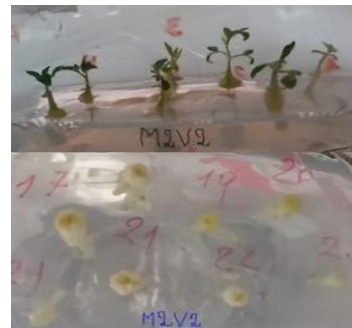
Semana 2





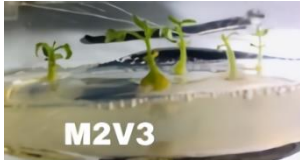
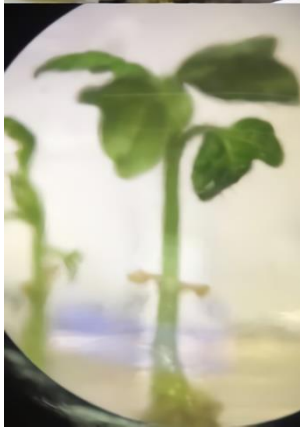



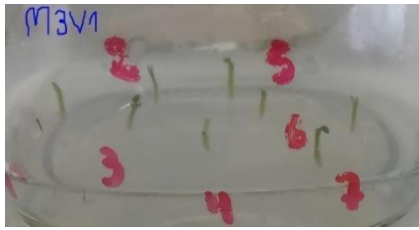



Semana 3



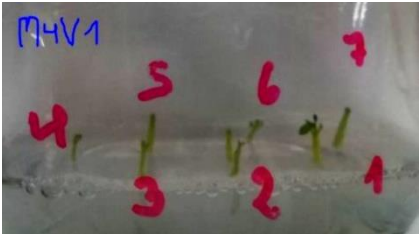

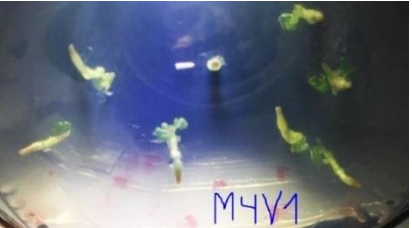
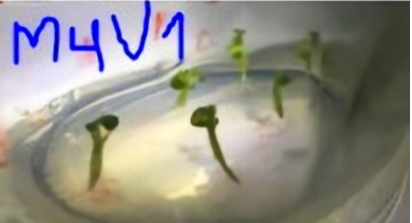
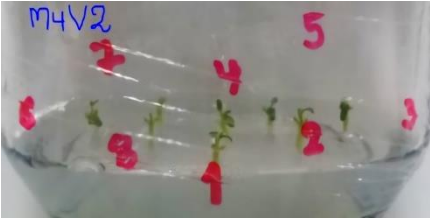


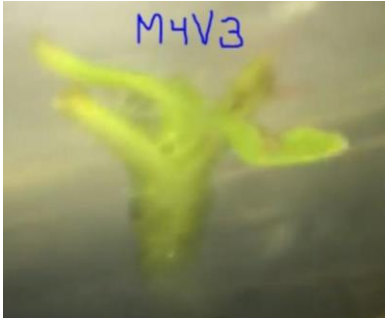
Semana 4



Desarrollo de explantes

Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
 <p>M2V3</p>	 <p>M2V3</p>	 <p>M2V3</p> 	  <p>M2V3</p> 
 <p>M3V1</p>	 <p>M3V2</p>	 <p>M3V1</p>	 <p>M3V2</p>

Desarrollo de explantes

Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
 <p>M4V1</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V1 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are small, green, and appear to be in the early stages of growth.</p>	 <p>M4V1</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V1 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants have grown slightly larger and more distinct than in Week 1.</p>	 <p>M4V1</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V1 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are significantly larger and show more developed root and shoot systems.</p>	 <p>M4V1</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V1 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are very large and show well-developed root and shoot systems, indicating advanced growth.</p>
 <p>M4V2</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V2 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are small and green.</p>	 <p>M4V3</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V3 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are small and green.</p>	 <p>M4V2</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V2 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are small and green.</p>	 <p>M4V3</p> <p>Photograph of a petri dish labeled M4V3 showing eight explants numbered 1 through 8 in red. The explants are very large and show well-developed root and shoot systems, indicating advanced growth.</p>