



**Universidad Estatal Península de Santa Elena**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Carrera de Agropecuaria**

**PRODUCCIÓN DE BROTES MERISTEMÁTICOS A  
PARTIR DE ALTAS CONCENTRACIONES DE  
CITOCININA EN TRES GENOTIPOS DE TOMATE  
(*Solanum lycopersicum*).**

**TRABAJO DE INTEGRACION CURRIULAR**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERA AGROPECUARIA**

**Autor:** Melgar Zambrano Claudia Geanella

La Libertad, 2021



**Universidad Estatal Península de Santa Elena**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Carrera de Agropecuaria**

**PRODUCCIÓN DE BROTES MERISTEMÁTICOS A  
PARTIR DE ALTAS CONCENTRACIONES DE  
CITOCININA EN TRES GENOTIPOS DE TOMATE  
(*Solanum lycopersicum*).**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERA AGROPECUARIA**

**Autor:** Melgar Zambrano Claudia Geanella

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

La Libertad, 2021

## TRIBUNAL DE GRADO



---

Ing. Nadia Quevedo Pino, PhD.  
**DIRECTOR/A DE CARRERA  
DE AGROPECUARIA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



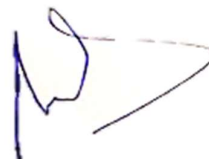
---

Blgo. Javier Soto Valenzuela, MSc.  
**PROFESOR/A ESPECIALISTA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Lourdes Ortega Maldonado, MSc.  
**PROFESOR/A TUTOR/A  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Andrés Drouet Candell, MSc.  
**PROFESOR GUÍA DE LA UIC  
SECRETARIO/A**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por guiarme día a día y permitirme guardar en mi corazón cada momento vivido dentro de esta etapa universitaria.

A mi madre Geomar Zambrano por ser mi ejemplo, por nunca dejarme sola y ser inspiración de mujer luchadora y perseverante.

A mi padre Francisco Melgar por enseñarme el valor de las cosas y que todo se puede lograr con esfuerzo diario.

A mis hermanos Licd. Saudy Melgar, Dannes Melgar y Francisco Melgar por sus palabras de aliento y cariño, a mi mejor amiga Licd. Denisse Morocho por sus ánimos para finalizar este trabajo.

Gracias mi amado Licd. Andrés Centeno por inspirar cosas positivas, por tu amor, ayuda, compañía y paciencia durante todo este proceso.

Gracias a mi mascota Lito por acompañarme en esas madrugadas de desvelo, eres realmente la bendición más bonita del mundo.

A la Universidad y docentes quienes me acompañaron, enseñaron y compartieron sus conocimientos conmigo, gracias a mi tutora Ing. Lourdes Ortega por compartir todo este tiempo de dedicación y empeño. De manera especial agradezco a la Ing. Clotilde Andrade por ser mi maestra en este bello recorrido, por tenerme paciencia y darme entusiasmo a seguir este proceso y no decaer jamás. Muchas gracias.

**Claudia Melgar Zambrano**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con todo mi corazón a mis padres Francisco Melgar y Geomar Zambrano sin duda son los mejores y sin ellos no lo hubiera logrado.

A toda mi familia que de una u otra manera estuvieron pendientes de mí.

A mi abuelito Francisco Melgar que sé que desde el cielo se alegra por este logro.

A mis amigos, compañeros de clases, docentes y tutores que durante todo este proceso me acompañaron.

**Claudia Melgar Zambrano**

## RESUMEN

Se ha demostrado por años el avance de la biotecnología, principalmente en la micropropagación *in vitro* de distintas especies vegetales, por ello se planteó como objetivo evaluar la producción de brotes meristemáticos a partir del uso de altas concentraciones de citocininas en tres genotipos de tomate, se empleó un diseño experimental DCA con arreglo factorial 3x4, evaluando tres materiales genéticos, UPSE-78, UPSE-19 y MICAELA con cuatro concentraciones de citocininas: 0,6mg.l<sup>-1</sup>; 0,7 mg.l<sup>-1</sup>; 0,8 mg.l<sup>-1</sup> y el testigo. Los resultados fueron valorados por p-valores. La mejor respuesta en longitud, producción de brote, número de hojas, contaminación y oxidación fue UPSE-19 en el MC2 con dosis de 0,6 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina, concluyendo que a menor concentración de citocininas mayor respuesta de los explantes.

***Palabras claves:*** *Micropropagación, Meristemático, Citocinina*

## ABSTRACT

The advancement of biotechnology has been demonstrated for years, mainly in the in vitro micropropagation of different plant species, for this reason the objective was to evaluate the production of meristematic shoots from the use of high concentrations of cytokinins in three tomato genotypes. DCA experimental design with a 3x4 factorial arrangement, evaluating three genetic materials, UPSE-78, UPSE-19 and MICAELA with four concentrations of cytokinins: 0.6mg.l<sup>-1</sup>; 0.7 mg.l<sup>-1</sup>; 0.8 mg.l<sup>-1</sup> and the control. The results were valued by p-values. The best response in shoot length, shoot production, number of leaves, contamination and oxidation was UPSE-19 in MC2 using doses of 0.6 mg.l<sup>-1</sup> of kinetin, concluding that the lower the concentration of cytokinins, the greater the response of explants.

**Keywords:** *Micropropagation, Meristematics, Cytokinin*

"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".



---

Claudia Melgar Zambrano



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
1.1. Origen del Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	4
1.2. Importancia de cultivo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) .....	4
1.2.1. Descripción morfológica.....	4
1.2.2. Fisiología del tomate.....	5
1.3. Mejora genética del tomate .....	5
1.3.1. Totipotencialidad celular .....	5
1.4. Cultivos <i>in vitro</i> .....	5
1.5. Factores que influyen en los procesos de cultivo <i>in vitro</i> .....	6
1.5.1. El medio de cultivo .....	6
1.5.2. Elección de explante .....	6
1.5.3. Lugar de trabajo .....	7
1.5.4. El operador.....	7
1.5.5. Material vegetal .....	7
1.5.6. Tipo y estado de lo explantes.....	8
1.6. Problemas de micropropagación .....	8
1.6.1. Contaminación .....	8
1.6.2. Oxidación fenólica.....	9
1.7. Factores físicos.....	9
1.7.1. Luz y temperatura .....	9
1.7.2. Micropropagación.....	9
1.8. Métodos de micropropagación .....	10
1.8.1. Embriogénesis Somática de Células .....	10

1.8.2.	Organogénesis somática .....	10
1.9.	Etapas de la micropropagación .....	11
1.9.1.	Etapas preparativa del material genético.....	11
1.9.2.	Establecimiento del cultivo.....	11
1.9.3.	Multiplicación y elongación de brotes.....	11
1.9.4.	Enraizamiento in vitro .....	12
1.9.5.	Aclimatación del material obtenido in vitro .....	12
1.10.	Producción de tomate <i>in vitro</i> .....	13
1.11.	Uso de reguladores de crecimiento vegetal .....	13
1.11.1.	Citocininas.....	14
1.11.2.	Auxinas .....	14
<b>CAPÍTULO 2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
2.1.	Ubicación y descripción del lugar del experimento.....	15
2.2.	Materiales y equipos .....	15
2.2.1.	Material vegetativo .....	15
2.2.2.	Variedad de Tomate UPSE 78.....	16
2.2.3.	Variedad de Tomate UPSE 19.....	16
2.2.4.	Hibrido de tomate MICAELA.....	17
2.2.5.	Material de Laboratorio .....	18
2.3.	Diseño experimental y tratamientos.....	19
2.3.1.	Tratamientos .....	19
2.3.2.	Diseño experimental .....	19
2.3.3.	Análisis estadístico .....	20
2.3.4.	Delineamiento experimental.....	20
2.4.	Manejo del experimento.....	21
2.4.1.	Limpieza de los equipos y materiales .....	21

2.4.2.	Esterilización de los materiales de laboratorio .....	21
2.4.3.	Esterilización de semillas.....	21
2.4.4.	Pregerminación de semilla.....	22
2.4.5.	Preparación de medio de cultivo para germinación (M1).....	22
2.4.6.	Siembra de semillas .....	23
2.4.7.	Preparación de medio para siembra de explantes (M2).....	23
2.4.8.	Siembra de meristemos apicales .....	24
2.5.	Variables Experimentales.....	24
2.5.1.	Porcentaje de oxidación .....	24
2.5.2.	Porcentaje de contaminación .....	24
2.5.3.	Longitud de brotes .....	25
2.5.4.	Número de brotes por explante.....	25
2.5.5.	Promedio de número de hojas.....	25
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>26</b>
3.1.	Porcentaje de oxidación o necrosis .....	26
3.2.	Porcentaje de contaminación.....	28
3.3.	Longitud de brotes.....	29
3.4.	Número de brote por explante.....	34
3.5.	Promedio de número de hojas .....	35
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>		<b>37</b>
CONCLUSIONES .....		37
RECOMENDACIONES.....		37
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>		<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>41</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características agronómicas des la variedad de tomate UPSE-78.....	16
<b>Tabla 2.</b> Características agronómicas variedad de tomate UPSE-19.....	17
<b>Tabla 3.</b> Características agronómicas MICAELA .....	17
<b>Tabla 4.</b> Material genético y sus concentraciones de hormona .....	19
<b>Tabla 5.</b> Número de tratamientos según los materiales de tomate y concentraciones de citocininas .....	19
<b>Tabla 6.</b> Análisis estadístico .....	20
<b>Tabla 7.</b> Componentes del Medio de germinación (M1).....	22
<b>Tabla 8.</b> Insumos para la preparación de medio para siembra de explantes de tomate (M2).....	23
<b>Tabla 9.</b> ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor A) material genético en tres días evaluados. ....	29
<b>Tabla 10.</b> ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor B) medios de cultivo en tres días evaluados. ....	31
<b>Tabla 11.</b> ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor AxB) material genético por medio de cultivo en tres días evaluados.....	32

## ÍNDICE DE FIGURA

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de oxidación o necrosis evaluado a los 20 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocinina.....	26
<b>Figura 2.</b> Oxidación en explantes de tomate observada en lente 40x a los 20 días de su siembra. ....	26
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de contaminación evaluado a los 15 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.....	28
<b>Figura 4.</b> Longitud de brotes evaluado a los 5 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.....	30
<b>Figura 5.</b> Longitud de brotes evaluado a los 10 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.....	31
<b>Figura 6.</b> Longitud de brotes evaluado a los 15 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.....	33
<b>Figura 7.</b> Número de brotes evaluado a los 20 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.....	34
<b>Figura 8.</b> Número de hojas evaluados a los 20 días después de la siembra, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas. ....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Imagen 1 A.** Materiales para realizar el medio de cultivo
- Imagen 2 A.** Incorporación de la hormona citocinina al medio de cultivo
- Imagen 3 A.** Medio de cultivos con distintas concentraciones de citocinina
- Imagen 4 A.** Siembra de explantes de tomate
- Imagen 5 A.** Tratamientos en la cámara de crecimiento
- Imagen 6 A.** Tratamientos M4V2
- Imagen 7 A.** Obtención de datos de las diferentes variables a los 10 días.
- Imagen 8 A.** Análisis de resultados obtenidos en los cultivos in vitro.

## INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de investigación se realizó la propagación del cultivo *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidos a diferentes concentraciones de citocininas, desarrollando materiales genéticos de manera asexual con características agronómicas deseables, resistentes a estreses bióticos y abióticos, siendo una opción el manejo de cultivos *in vitro* a partir de brotes meristemáticos (Juárez et al., 2015).

Se ha demostrado por años el avance de la biotecnología principalmente en la propagación de distintas especies vegetales, esta tecnología se lleva a cabo en distintos países, donde este sistema de propagación genera una ganancia superior, que tiene como ventaja acortar el tiempo de producción. (Bisang et al., 2009).

Para brotes meristemáticos, en algunas especies, se requiere transferir los brotes apicales (ápices caulinares) a un medio con concentraciones de citocininas. Así mismo, en muchas especies la iniciación de raíces ocurre solamente en la presencia de auxinas que son fitohormonas reguladoras de crecimiento. (Cortes et al., 2019).

En el Ecuador, la producción de tomate se encuentra en el cuarto lugar de importancia de área sembrada con 3.333 hectáreas (INEC, 2002). En el 2017 se produjo un total de 62.675 toneladas métricas de tomates de mesa, y en la provincia de Santa Elena según Quintero et al., (2003), ha subido la siembra de hortalizas pero las semillas empleadas para la siembra son importadas.

Por tanto, la tecnología en la producción de tomate se considera de alto nivel, generalmente con enfoques de reducir los costos a nivel de superficie de producción. Entre los componentes tecnológicos más cambiantes están los relacionados en aspectos nutricionales, estudios en fisiología de las plantas y la biotecnología agrícola utilizada, para crear o modificar organismos vivos (FAO, 2019).

La agricultura actual, tiene como tendencia la búsqueda de bajos costos en la producción de alimentos de primera necesidad, proteger los recursos naturales, donde la aplicación de técnicas biotecnológicas ha favorecido la producción clonal masiva.

### **Problema científico**

¿Será eficiente aplicar la micropropagación *in vitro* que genere brotes meristemáticos a partir de altas concentraciones de citocininas en materiales genéticos de *Solanum lycopersicum*?

### **Objetivo general**

- ✓ Evaluar la producción de brotes meristemáticos a partir del uso de altas concentraciones de citocininas en tres genotipos de (*Solanum lycopersicum*).

### **Objetivos específicos**

- ✓ Determinar las respuestas que generan las altas concentraciones de citocininas en la producción de brotes meristemáticos de *Solanum lycopersicum* obtenidos a partir de micropropagación *in vitro*.
- ✓ Identificar los genotipos de *S. lycopersicum* que presenta mayor desarrollo de brotes ante los tratamientos.
- ✓ Definir ó evaluar la concentración de citocininas que generen un mayor cambio morfológico en los explantes de tomate.



## **Hipótesis**

Existe diferencia en el potencial de brotes meristemáticos obtenidos a partir de la micropropagación *in vitro* de materiales genéticos de tomate *Solanum lycopersicum* utilizando altas concentraciones de citocininas como reguladores de crecimiento.

# **CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1. Origen del Tomate (*Solanum lycopersicum*)**

En México se considera al tomate (*Solanum lycopersicum*) como jitomate donde fue domesticado, pero el origen del mismo es de planicie costera occidental de América del Sur (Bonilla *et al.*, 2014).

Corresponde a la familia *Solanaceae*, en el centro de México se conoce en algunos países como tomate bola, esta definición le dan al tomate cáscara o al tomate verde por otra parte en el norte de México y otras partes del mundo lo denominan tomate (Gutierrez, 1995).

## **1.2. Importancia de cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

El tomate es una de las hortalizas de mayor importancia, en huertos familiares y plantaciones comerciales es decir en todas las regiones del país es la más sembrada (Albornoz *et al.*, 2007).

Según Alfonso *et al.*, (2005) entre las principales ventajas y beneficios que representa su cultivo, se pueden mencionar que produce en corto tiempo (100-110 días); no se necesita una gran extensión de terreno; se adapta a diferentes tipos de suelos; su fruto es objeto de una gran demanda en el mercado, tanto para el consumo directo como para la industria; puede producir buenas ganancias.

### **1.2.1. Descripción morfológica**

La raíz está formada por la raíz principal (corta y débil), numerosas y potentes raíces secundarias, el tallo principal con un eje de 2 a 4cm de grosor en su base, sobre el que se desarrollan las hojas, tallos secundarios (ramificación simpodial) e inflorescencias, la hoja compuesta e imparipinnada con foliolos peciolados, lobulados, con borde dentado y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alterna

sobre el tallo mientras que la flor obtiene características, 5 o más sépalos e igual número de pétalos de color amarillo (Juárez et al., 2015).

### **1.2.2. Fisiología del tomate**

La tomatera es una planta anual de porte arbustivo que se desarrolla de forma rastrera, semirrecta o erecta. Dependiendo de la variedad se considera determinado o indeterminado. Es necesario ambientes cálidos, buen drenaje de suelo e iluminación. Con distintos tipos de suelo es cultivado también en temperaturas y salinidad (Nuez, 1995).

### **1.3. Mejora genética del tomate**

Álvarez y Moya (2003) señala que el tomate (*S. lycopersicum*) ha sido durante muchos años una de las principales hortalizas que se cultivan y comercializan. Su producción hace 20 años se asentaba en algunas variedades foráneas, el clima era un problema por la adaptación y susceptibilidad, por lo que la mejora genética ha estado encaminada a las variedades adaptadas y resistentes.

#### **1.3.1. Totipotencialidad celular**

Segretín, (2006) indica que la totipotencialidad celular es caracterizada por ser un grupo de células vegetales llamadas células meristemáticas, en distintos órganos de las plantas está presente. La potencialidad es una célula de conducción epidérmica. Para generar un organismo completo y un tejido el grado de diferenciación alcanzada por la célula disminuye.

### **1.4. Cultivos *in vitro***

Según Intagri, (2016), los cultivos *in vitro* radica en obtener una porción de planta, ejemplo una hoja, el ápice o algún órgano o segmento de la planta para colocarla en un sustrato estéril llamado medio nutritivo.

El cultivo *in vitro* o más conocido como cultivar en vidrio implica aplicar varias técnicas de manejo vegetal, de la misma manera se aplica técnica para los protoplastos, células, órganos, tejidos. Con variedades de técnicas se podrán obtener plantas sin microbios en medios de cultivos estériles con condiciones ambientales controladas (Murashige y Skoog, 1962).

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

Para la reproducción de plantas en laboratorio con condiciones favorables que conformen el ambiente necesario para las plantas es muy complicado, por esa razón se determinan factores que tengan influencia con el crecimiento y desarrollo para mantener las condiciones controladas (Castillo, 1992).

### **1.5.1. *El medio de cultivo***

Antes de que se realicen procesos de siembra, se necesita poseer medios de cultivos listos con su dosificación correspondiente, sea para explantes, brotes o enraizamiento en recipientes desinfectados y esterilizados. El medio de cultivo es importante ya que en su interior se desarrollan las plantas mediante el cual van a recibir los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo de tejidos, el medio está constituido por sales minerales que contribuyen N, P, K, S, Ca y Mg que son los macronutrientes esenciales, y Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo y Co considerados micronutrientes, la fuente de carbono se la obtiene de la sacarosa además puede ser beneficiado con aminoácidos, vitaminas y hormonas que regulan el crecimiento del material vegetal, también se agrega agar que es un gelificante que ayuda a solidificar el medio (Murashige y Skoog, 1962).

### **1.5.2. *Elección de explante***

Los explantes a seleccionar pueden ser tejidos, células sueltas, granos de polen, protoplastos, esporas o semillas, son considerados como células somáticas experto el ovulo y los granos de polen, el explante a usar debe ser seleccionado dependiendo el

objetivo del trabajo, también depende de la especie y el está en que se encuentra la planta madre (Montoya, 2020)

### **1.5.3. Lugar de trabajo**

El lugar de trabajo en el proceso de siembra es fundamental, por ello la asepsia del mismo cumple un papel importante; por esto, es indispensable el uso de aspersores de alcohol para el espacio de trabajo en un porcentaje mínimo de 70 %, y para el manejo de pinzas y otros implementos requeridos para los cortes vegetativos en un porcentaje del 90%.

En cuanto a la cámara de transferencia es necesario que cuente con gabinete de flujo laminar o aire estéril y que esté suficientemente distante de corrientes de aire; si no es posible contar con este equipamiento se puede utilizar cuartos esterilizados con luz UV pero nunca expuestos directamente a ella (Montoya, 2020).

### **1.5.4. El operador**

El operador es uno de los principales causantes de la contaminación microbiana en las prácticas biotecnológicas en cultivos *in vitro*; por lo que su asepsia es vital desde el lavado de manos con jabón antibacteriano hasta el uso de ropa estéril cuando se manipule la cámara de flujo laminar para evitar agentes contaminantes en el proceso de pre-germinación, siembra de explantes y brotes (Levitus *et al.*, 2010).

### **1.5.5. Material vegetal**

Chávez y Feria, (2012), manifiestan que en la propagación *in vitro* existen dos características para la elección del material, en primer lugar, está el material vegetal utilizado para ejecutar los procesos y técnicas, para dar inicio a un proceso de micropropagación y formar brotes nuevos con partes pequeñas de la planta. En segundo lugar, de una especie obtener un cultivo masivo, así producirá más plantas en

menos tiempo en espacios reducidos, lo que muestra que no solo se puede producir por temporadas sino todo durante toda la época el año.

#### ***1.5.6. Tipo y estado de lo explantes***

Juárez *et al.*, (2015) menciona que, la evolución genética del tomate requiere detallar un método eficaz de micropropagación *in vitro*; sistemas así son afectados por el tipo y edad del explante que se utiliza desde el inicio, también interviene la combinación de hormonas reguladoras que se emplea.

Cruz, (2019) menciona que, cultivando tomate *Micro-Tom* reportó la existencia de algunas limitaciones: 1) sembrar explantes foliares de campo, incrementa la contaminación bacteriana o fúngica en la práctica y 2) ejecución de explantes cotiledonares manipulando así la semilla.

Los explantes deben ser seleccionados por sus características agronómicas y que sean libres de contaminación fúngica y sanos, se selección de acuerdo al tiempo y se trasplanta en medio de multiplicación de brotes (Cancino *et al.*, 2015).

### **1.6. Problemas de micropropagación**

#### ***1.6.1. Contaminación***

En los cultivos *in vitro* los microorganismos reducen resultados positivos. Durante las primeras etapas donde las condiciones del cultivo son más vulnerables, la contaminación bacteriana y fúngica son determinadas de manera visual o por microscopios, también para detectar se realiza un diagnóstico de la planta madre antes de introducir un cultivo *in vitro* (Parrales *et al.*, 2019).

### **1.6.2. Oxidación fenólica**

Hernández y González, (2010) indican que en los procesos *in vitro* las plantas leñosas, en su mayoría los frutales no se determina el oscurecimiento del tejido, este fenómeno llamada necrosis se lleva a cabo por las enzimas de tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se produce cuando el tejido tiene una herida, actuando en los polifenoles y tirosina que a su vez las quinonas que estas son fitotóxicas y pueden polimerizarse, y en consecuencia priva el crecimiento de los explantes.

## **1.7. Factores físicos**

### **1.7.1. Luz y temperatura**

Castillo, (1992) recalca que en el proceso de propagación *in vitro* se debe tener en cuenta los niveles de luz y temperatura idóneos para el manejo de los explantes; generalmente están definidos entre 21 a 23 °C y dependiendo del cultivo el número idóneo de horas de luz.

Huerta, (2014) menciona en su ensayo de tomate (*Solanum lycopersicum*) el proceso de germinación requiere fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad con una luminosidad de 70  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  que proviene de fluorescentes GRO-LUX y una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **1.7.2. Micropropagación**

Orrego *et al.*, (2005) señala que la micropropagación o propagación masiva *in vitro* es la técnica que, mediante el cultivo de tejidos asépticos, ha cobrado gran importancia en las últimas décadas; aunque las investigaciones actuales al respecto son destinadas para aplicarse en el comercio. Específicamente, esta técnica ha resultado benéfica para la horticultura.

Castillo, (2017) indica que, la propagación clonal, es uno de los estudios más corrientes del cultivo *in vitro*, con la utilización de explantes obtenidos de una planta denominada “madre”, donde se consiguen clones (genéticamente iguales).

## **1.8. Métodos de micropropagación**

### **1.8.1. Embriogénesis Somática de Células**

A partir de una célula se da la formación de un embrión, los gametos no son necesarios. Se conoce en la naturaleza como una forma de apomixis que es un fenómeno artificial, en el 1958 se da la descripción por primera vez de la embriogénesis somática. Para la producción masiva de plantas *in vitro* este método es el más eficiente por la naturaleza bipolar del embrión ya que proporciona cortos periodos de tiempo para la multiplicación, la desventaja radica en desconocimiento para regular este proceso siendo un limitado número de especies los cuales se describe una embriogénesis que permite un uso productivo (Freire, 2003).

Las técnicas de embriogénesis somática tienen ventajas en regeneración de plantas, utilizando yemas basales, se da un gran potencial para prevalecer las limitaciones para propagar clonalmente las plantas. Tomando en cuenta que en cultivos *in vitro* si se utiliza el explante y un regulador de crecimiento correcto, es probable obtener resultados positivos (Viñas y Jiménez, 2011).

### **1.8.2. Organogénesis somática**

Ojeda, (1996) establece que, la técnica más utilizada que comprende en desarrollar yemas o meristemos radicales a partir de los explantes, en coníferas da resultados favorables a partir de la estimulación de yemas.

La regeneración involucra cuatro etapas, cada una se maneja por separado:

- a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias
- b) Alargamiento de yemas



- c) Multiplicación de brotes
- d) Enraizamiento

## **1.9. Etapas de la micropropagación**

### **1.9.1. Etapa preparativa del material genético**

Determinando la calidad y la correcta elección de los explantes se reduce los dos problemas primordiales en esta etapa que es la contaminación y la oxidación de los explantes. Los factores que influyen en el comportamiento de los explantes son, la estación en que extrae el material vegetal, el tamaño, los días, tipo de órgano que sirve como explante, la fisiología y el estado sanitario de la planta donante.

Bajo una selección masal se elige la planta para obtener las características agronómicas deseables, luego se define el tipo de explante de acuerdo a su investigación *in vitro*, los materiales deben ser órganos jóvenes ya que tienen buena respuesta que los de materiales adultos (Levitus *et al.*, 2010).

### **1.9.2. Establecimiento del cultivo**

En esta etapa es recomendarle establecer cultivos viables, de acuerdo a la calidad del explante obtendremos el éxito de esta etapa.

Los tejidos meristemáticos jóvenes bien seleccionados llevan protagonismo, para esto se maneja un protocolo como el lavado de los explantes con agua destilada, etanol 70% por un minuto, también aplicar hipoclorito de sodio y por último se enjuagan por tres veces los explantes (Levitus *et al.*, 2010).

### **1.9.3. Multiplicación y elongación de brotes**

Delgado y Hoyos, (2014) indican que la multiplicación influye en el crecimiento y desarrollo de los brotes; para dar a cabo este proceso, se realiza cortes en los brotes,

aproximadamente de 2 cm y se establecen en frascos que contienen medio de cultivo adicionando hormonas vegetales para ayudar a su crecimiento.

#### **1.9.4. Enraizamiento *in vitro***

Gutierrez, (1995) señala de forma *in vitro* en la etapa III o *in vivo* en la etapa IV pueden estimular raíces.

Según García y Sánchez, (2015) indica que para inducir raíces en los explantes se siembra brotes en medios de cultivo que contengan hormonas como son las auxinas (ANA Y AIB), ya se sea solas o combinadas en dosis desde 0 hasta 2mg/lt.

#### **1.9.5. Aclimatación del material obtenido *in vitro***

En la aclimatación las plantas enraizadas son muy sensibles las cuales sufrirán cambios diferentes que permitirán la adaptación, en el momento de extraer los explantes de los frascos, estarán sensibles a las condiciones de invernadero considerando la humedad relativa alta y que los estomas aún no están adaptados para transpirar puesto que estuvieron en condiciones controladas en el laboratorio, por otra parte crecer en condiciones ambientales tan húmedas, a la planta le falta desarrollar la cutícula que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta (Castillo, 1992).

La siguiente lista determina las características de las plantas en condiciones de laboratorio (*in vitro*) y condiciones naturales (*ex vitro*).

##### *In vitro*

- No realiza fotosíntesis
- Crece en condiciones controladas
- Alta humedad relativa
- Estomas no funcionales
- Ausencia de pelos radicales

*In vivo*

- Realiza la fotosíntesis
- Crecimiento en condiciones no controladas
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radicales

#### **1.10. Producción de tomate *in vitro***

Es la producción de un gran número de plantas a partir de especies en las cuales el desarrollo de la planta a partir de semilla es difícil, que está relacionada con la propagación clonal de un gran número de plántulas idénticas genéticamente, la producción de plantas libres de virus y el mejoramiento de cultivos a través de varias técnicas de modificación genética (Gutierrez, 1995).

#### **1.11. Uso de reguladores de crecimiento vegetal**

Según Cortes *et al.*, (2019) los reguladores de crecimiento vegetal son elementos que actúan sobre el desarrollo de las plantas, se activan a concentraciones mínimas entre los reguladores se puede diferenciar entre las producidas por las plantas y aquellas de origen sintético, las que se encuentran de forma natural en las plantas se las llama fitohormonas.

Una aplicación exógena produce una extensa variedad de respuesta y desarrollo en la planta, el crecimiento del tallo es uno de los efectos más evidentes por el alargamiento celular (Alfárez *et al.*, 2013).

### ***1.11.1. Citocininas***

Es el grupo de hormonas vegetales llamadas fitohormonas que promueve la diferenciación celular, controla el crecimiento de brotes y de las raíces también el envejecimiento de las hojas llamada senescencia (Vilchez et al., 2014).

#### ***1.11.1.1. Funciones que cumple la citocinina***

La citocinina tiene como función estimular la división celular, si es combinada con auxinas llegaría a obtener resultados mejores. La inducción de brotes se manifiesta con las altas concentraciones de las mismas e inhiben la formación de raíces, también genera tallos y prolifera yemas laterales (Indacochea, 2019).

#### ***1.11.1.2. Importancia de la citocinina***

Admite aplazar procesos de envejecimiento celular y ayuda al transporte de auxinas, por otro lado ayuda en el fenómeno de la organogénesis (Indacochea, 2019).

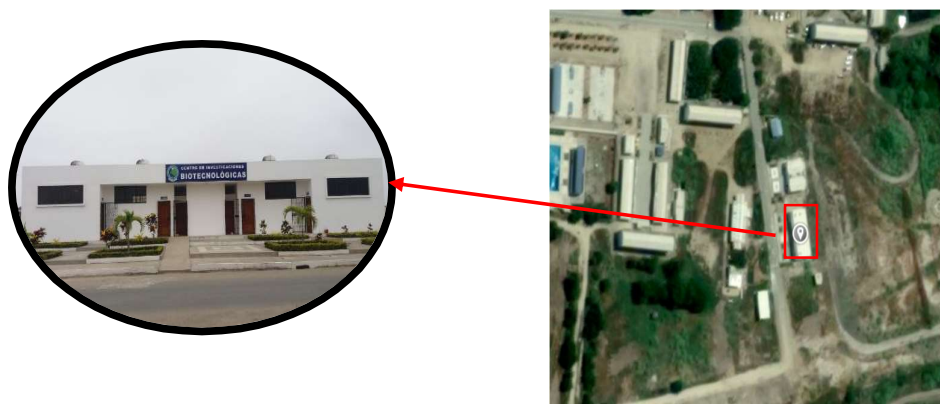
### ***1.11.2. Auxinas***

Son hormonas vegetales que ayudan en la formación de órganos de las plantas y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. La evidencia reciente apunta que existen varias auxinas indólicas naturales en las plantas, el ácido indolacético (IAA) es la forma predominante (Jordán y Casaretto, 2006).

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

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

El presente ensayo de investigación se establecerá en la Universidad Estatal Península de Santa Elena UPSE específicamente en el Laboratorio de Mejoramiento y Micropropagación Vegetal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CEB), que se encuentra ubicada en La Libertad, provincia de Santa Elena, establecimiento ubicado geográficamente a  $2^{\circ}13'55,83''$  latitud sur y  $80^{\circ}52'33,30''$  de longitud oeste, con una altitud de 10 msnm.



**Imagen 1** Laboratorio de mejoramiento y micropropagación vegetal del centro de Investigación Biotecnológicas (CEB)

### 2.2. Materiales y equipos

#### 2.2.1. *Material vegetativo*

(*Solanum lycopersicum* Mill) tolerante a estrés hídrico en la península de Santa Elena ha generado materiales con características agronómicas deseables y tolerancia a estrés abióticos, los materiales utilizado son: UPSE-78, UPSE-19 y el híbrido Micaela.

### 2.2.2. Variedad de Tomate UPSE 78

Línea promisor de tomate tolerante a estrés hídrico, estudiadas durante el año 2013 a 2019 proveniente del híbrido Daniela, logrando que con altas concentraciones de agua de mar germine, las características agronómicas (tabla 1) son:

**Tabla 1.** Características agronómicas des la variedad de tomate UPSE-78

Día de floración	40 días DDT
Altura de planta	1.14 – 1.35 m
Numero de racimos florales	5 a 7
Numero de fruto 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>Prodidiplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo	Moderado

**Elaborado por:** Claudia Melgar

### 2.2.3. Variedad de Tomate UPSE 19

Proveniente del híbrido Acerado, germina en altas concentraciones de agua de mar con pedigrí es decir tolera estrés hídrico, investigado entre los año 2013 al 2019, sus características agronómicas se presentan la tabla 2.

**Tabla 2.** Características agronómicas variedad de tomate UPSE-19

Día de floración	45 días DDT
Altura de planta	1.38 – 1.45 m
Numero de racimos florales	4 a 6
Numero de fruto por racimo	3-5
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>Prodidiplosis longifila</i> y otras plagas que afectan al cultivo	Moderado

**Elaborado por:** Claudia Melgar

#### **2.2.4. Híbrido de tomate MICAELA**

Es un híbrido productivo de la nueva generación de Daniela y Dominique, tomate recomendado para la producción en las regiones de la costa y sierra ecuatoriana ya que es muy ventilado, larga vida y excelente cuajado en frío, sus características agronómicas (tabla 3) son:

**Tabla 3.** Características agronómicas MICAELA

<b>Tipo de crecimiento</b>	<b>Indefinido</b>
Vigor	muy fuerte
forma de fruto	Redondo medio
Peso promedio de fruto	180 – 200 g

**Elaborado por:** Claudia Melgar

### 2.2.5. *Material de Laboratorio*

#### MATERIALES

Matraz Erlenmeyer	250, 500 y 1000 ml
Vasos de precipitación	50, 200 y 500 ml
Probeta	50 y 250 ml
Bisturí	4
Mechero de alcohol	100%
Alcohol	50- 70- 100%
Cloro comercial	50%
Jabón Líquido	
Cajas Petri esterilizadas	
Frascos de vidrio esterilizados	
Espátula de acero	
Papel filtro	
Papel adhesivo transparente	
Papel aluminio	
Varilla agitadora magnética	
Cinta Parafilm	
Cinta blanca	
Agua destilada	

#### INSUMOS

Agar
Sacarosa
Sales de Macro y Micronutrientes MS
Hormona Citocinina: kinetina
Vitamina Inositol
Vitamina T-HCL

#### EQUIPOS

Micropipetas	1000-100ml
Puntas de pipetas	1000-100ml
Balanza analítica	
Peachimetro	
Agitador Magnético	
Cámara de crecimiento	
Cámara de flujo laminar	



Autoclave
Estufa

## 2.3. Diseño experimental y tratamientos

### 2.3.1. Tratamientos

El experimento se analizará mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 3x4, considerando cuatro concentraciones con hormonas y uno sin hormonas con tres materiales genéticos (tabla 4).

**Tabla 4.** Material genético y sus concentraciones de hormona

Material genético	Concentraciones Citocinina
MG1: UPSE-78	Medio 1: M1 (0,0 mg/l)
MG2: UPSE-19	Medio 2: M2 (0,6 mg/l citocinina)
MG3: Híbrido Micaela	Medio 3: M3 (0,7 mg/l citocinina)
	Medio 4: M4 (0,8 mg/l citocinina)

Elaborado por: Claudia Melgar

**Tabla 5.** Número de tratamientos según los materiales de tomate y concentraciones de citocininas

T1: MG1M1	T4: MG2M1	T7: MG3M1	T10: MG4M1
T2: MG1M2	T5: MG2M2	T8: MG3M2	T11: MG4M2
T3: MG1M3	T6: MG2M3	T9: MG3M3	T12: MG4M3

Elaborado por: Claudia Melgar

### 2.3.2. Diseño experimental

El ensayo fue realizado usando tres genotipos y cuatro concentraciones, con tres repeticiones por tratamiento incluido el testigo absoluto. En total 35 unidades experimentales.

### 2.3.3. Análisis estadístico

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

**Tabla 6.** Análisis estadístico

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

Elaborado por: Claudia Melgar

### 2.3.4. Delineamiento experimental

a. Diseño experimental	DCA con arreglo factorial 3x4
b. Tratamientos	12
c. Repeticiones	3
d. Total de unidades experimentales	36
e. Número de semillas por unidad experimental	5
f. Número de frascos por tratamiento	3
g. Total de semillas por tratamiento	15
h. Total de semillas	180

## **2.4. Manejo del experimento**

### ***2.4.1. Limpieza de los equipos y materiales***

Para mantener el espacio y equipos de trabajo totalmente limpio es recomendable ejecutar una limpieza antes y después de realizar las actividades de laboratorio, los equipos a utilizar deben estar bien desinfectados y en buen estado para evitar problemas de contaminación en la esterilización del material vegetal, siembra y manejo de explantes.

### ***2.4.2. Esterilización de los materiales de laboratorio***

La esterilización de los materiales se inicia lavando con una solución de cloro al 70% y enjuagados con abundante agua. Se elimina el exceso de agua, y a continuación, se colocan los materiales de vidrio con papel aluminio en la superficie y se introducen en la estufa a 80°C por 2 horas, el objetivo es eliminar microorganismos que pueden provocar daños como contaminación en el ensayo.

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

Para realizar el proceso de esterilización se inicia lavando la semilla en una caja Petri con jabón líquido, se agita y enjuaga varias veces hasta que se elimine el exceso de detergente y el resto de fungicida o mucílago que posea la semilla, posterior a eso en la cámara de flujo laminar se realiza la desinfección, preparando soluciones con alcohol al 70% donde se deja reposar las semillas lavadas por un minuto, y luego se colocan en una solución con cloro al 5% durante 5 minutos; transcurrido el tiempo se enjuaga con agua destilada con intervalos de 5, 10 y 15 minutos.

#### **2.4.4. Pregerminación de semilla**

En la cámara de flujo laminar se introducen los materiales estériles como, caja Petri, papel filtro, pinzas, agua destilada, gotero y semillas. En la caja Petri se introducen 2 láminas de papel filtro, luego con la pinza colocamos las semillas sobre el papel y con el gotero humedecemos 5 a 7 ml de agua destilada estéril, se sella la caja Petri y se deja por 3 días en oscuridad para que emerja la radícula.

#### **2.4.5. Preparación de medio de cultivo para germinación (M1)**

En la tabla 7 se mencionan los insumos que se utilizaron para la preparación del medio de cultivo para la germinación de semillas de tomate.

**Tabla 7.** Componentes del Medio de germinación (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

Añadir en un vaso de precipitación 500 ml de agua destilada estéril, adicionar 5 g/l de sales, vitaminas y con un agitador disolver, inmediatamente se mide el pH de la solución preparada la cual debe estar en un rango de 5,6 a 5,8. Colocar la solución en un matraz y aforar con 500 ml de agua destilada estéril y añadir el agar.

Mezclar la solución en el termo agitador durante 10 a 15 minutos, posteriormente se trasladó a una autoclave por 45 minutos a 121 grados centígrados y 15 psi de presión.

#### 2.4.6. *Siembra de semillas*

El proceso de siembra se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual debe estar previamente esterilizada, es recomendable limpiar con alcohol; posteriormente se introduce el material a utilizar como: pinzas, mechero de alcohol, papel filtro, papel adherente, frascos con medio solidificado, recipiente con alcohol; todos los materiales fueron previamente esterilizados. Se procede a sembrar tomando las semillas pre germinadas con pinzas, luego se flamea la superficie del frasco para evitar contaminación, se sella con plástico adherente; y luego se trasladan los frascos con semillas pre germinadas a la cámara de crecimiento que mantienen temperaturas de 24 a 26 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

#### 2.4.7. *Preparación de medio para siembra de explantes (M2)*

La preparación del medio de cultivo para siembra de explantes tiene en su composición varios insumos, detallados en la (tabla 8).

**Tabla 8.** Insumos para la preparación de medio para siembra de explantes de tomate (M2)

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)
<b>Fitohormonas</b>	
Kinetina 0,6 a 0,8 mg/L	

\*Solución madre

En un vaso de precipitación se añadió 500 ml de agua destilada estéril, luego se adicionaron las sales, sacarosa, vitaminas y la fitohormona, luego se mide el pH que debe estar entre 5,6 a 5,8, posterior a eso se aforó los 500 ml restantes de agua destilada. Una vez terminado este proceso se colocó en un termo agitador para disolver

todas las partículas, por último se lo colocó en el autoclave a temperatura de 121°C para su esterilización. Antes de dispersarse agregan los antibióticos.

#### ***2.4.8. Siembra de meristemos apicales***

Para elegir los explantes, debe haber transcurrido 15 días desde que se colocó la semilla pre germinada en medio de cultivo M1, los explantes con buenas características morfológicas se obtienen de las plántulas con la ayuda de un bisturí, para esto se procede a cortar el hipocótilo y la mitad de los cotiledones, y con mucho cuidado con la ayuda de la pinza estéril se sembró en el medio de cultivo M2 posterior a esto se flamea el borde del frasco para evitar contaminación, se sella, y se etiqueta con la información correspondiente para trasladarlos a la cámara de crecimiento que mantienen temperaturas de 24 a 26 °C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

### **2.5. Variables Experimentales**

#### ***2.5.1. Porcentaje de oxidación***

Los explantes fueron evaluados a los 20 días después de la siembra en medio de cultivo M2, por la coloración oscura que se observa en el tejido.

#### ***2.5.2. Porcentaje de contaminación***

La contaminación fue evaluada de forma visual a los 15 días después de la siembra de los explantes, se determinó la presencia de hongos en la superficie del medio, al observar variación de color en el medio, detallado en porcentaje.

### ***2.5.3. Longitud de brotes***

La longitud se evaluó a los 5, 10 y 15 días después de la siembra del explante en medio de cultivo M2, usando un calibrador Vernier, medidos desde la base hasta el ápice del explante, valor reflejado en milímetros.

### ***2.5.4. Número de brotes por explante***

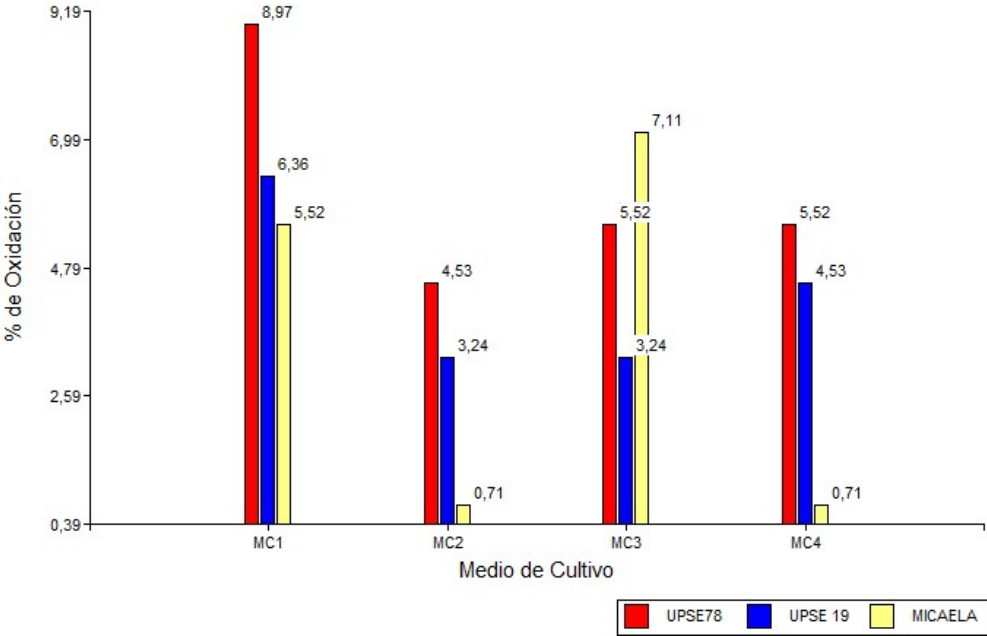
La toma de datos se da a los 20 días después de la siembra del explante en medio de cultivo M2, contabilizando el número de brotes que se presentan por explante.

### ***2.5.5. Promedio de número de hojas***

La variable fue evaluada de manera visual, contabilizando el número de hojas que desarrollan los explantes hasta los 20 días.

# CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. Porcentaje de oxidación o necrosis



**Figura 1.** Porcentaje de oxidación o necrosis evaluado a los 20 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocinina.



**Figura 2.** Oxidación en explantes de tomate observada en lente 40x a los 20 días de su siembra.

La figura 2 muestra la oxidación que se presentó hasta los 20 días de establecimiento del cultivo *in vitro*, mismo que se observó en el microscopio óptico a 40x.

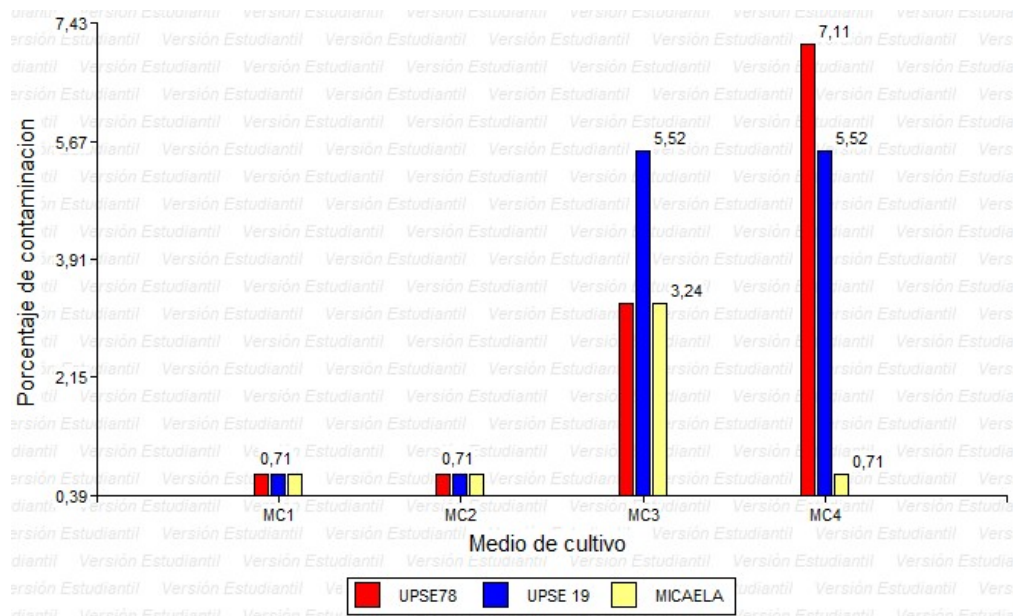


La figura 1 muestra que el genotipo UPSE-78 en el MC1 (medio de cultivo) logró el mayor porcentaje 8,97% de oxidación, seguido del MC3 y MC4 que obtuvieron similar porcentaje 5,52% en cambio el MC2 obtuvo un menor porcentaje 4,53%, por otro lado UPSE-19 en el MC1 alcanzó 6,36% de oxidación, en el MC2 y MC3 el porcentaje fue parecido con un valor de 3,24% y en el MC4 la oxidación llegó a 4,53% mientras que MICAELA en el medio MC2 y MC4 la oxidación fue mínima con un valor de 0,71%, sin embargo en el MC1 y MC3 el porcentaje aumento con valores de 5,52% y 7,11% respectivamente.

Los resultados logrados en la variable porcentaje de oxidación que se expresan en la figura 2; los genotipos UPSE-78, UPSE-19 Y MICAELA en el MC2 (0,6 mg/l citocinina) dieron un porcentaje menor de oxidación 4,53; 3,24 y 0,71% mientras que en el MC1 (testigo) fueron los de mayor oxidación no obstante en general no existió en los tratamientos porcentajes elevados de oxidación o necrosis durante el establecimiento del cultivo hasta el día 20 de la evaluación. Estos resultados tiene semejanza con Azofeifa (2009) quien en su investigación de problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes define que los procesos de oxidación en los cultivos *in vitro* son causados principalmente por la composición del medio de cultivo. Puesto que cada medio de cultivo tiene una concentración distinta de hormona de regulación. También indica que al ser cortados los explantes inician un oscurecimiento en el corte perdiendo el color verde natural, liberando exudados que se conoce son mezclas de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios).

También Cid et al., (2016) indica en su investigación “Estrategias para disminuir la necrosis en la multiplicación y el enraizamiento *in vitro*” que la necrosis según el número de explantes en el frasco aumenta, ya que se reduce el aire por explante y también se agotan los nutrientes y esto genera el aumento de la toxicidad, puesto que en su investigación realizó el ensayo con 5 y 7 explantes por frascos y logró el menor porcentaje de explantes necrosados con 5 explantes por frasco.

### 3.2. Porcentaje de contaminación



**Figura 3.** Porcentaje de contaminación evaluado a los 15 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.

En La figura 3 se observa que UPSE-78 en el MC4 alcanza mayor contaminación 7,11%, seguido del MC3 con 3,24% mientras que MC2 y MC1 el porcentaje bajó a 0,71%, por otro lado UPSE-19 en MC4 y MC3 obtuvieron el mismo valor 5,52% y MC2 y MC1 0,71% de contaminación mientras que Micaela el valor más alto fue en el MC3 con 3,24% y en MC4, MC2 y MC1 la contaminación fue mínima con un valor de 0,71% respectivamente.

Los resultados obtenidos en la variable porcentaje de contaminación expresan en la figura 3 que los genotipos UPSE-78, UPSE-19 Y MICAELA a mayor concentración de citocinina en el medio de cultivo, mayor porcentaje de contaminación, teniendo en cuenta que se manejó temperatura de 23 °C y una humedad relativa de 56% con 12 horas luz y 8 oscuridad sin realizar desinfección al explante, lo obtenido es un contaminante ectófitos es decir se produce en la superficie del medio de cultivo, Estos resultados no coinciden con Tabango (2011) cuando trabajó con las hormonas BAP y

KIN que a los 21 días de evaluación, presentaron pérdidas del 23% de explantes por causa de hongo y otros porcentajes entre contaminados por bacterias, muertos y bacterias/hongos; se considera en la investigación que fue causa de los minutos de desinfección que mantuvieron con el hipoclorito de calcio que manejaron en los explantes.

Por otra parte Acosta *et al.*, (2009) indica que es dificultoso identificar de donde proviene la contaminación pero existen protocolos para reducir la presencia de contaminantes ectófitos siendo los más fáciles de eliminar, los hongos más frecuentes a encontrar a los 15 día del establecimiento del cultivo *in vitro* son: *Fusarium* sp, *Botrydiploidia* sp, *Alternaria* sp y *Aspergillus* sp.

### 3.3. Longitud de brotes

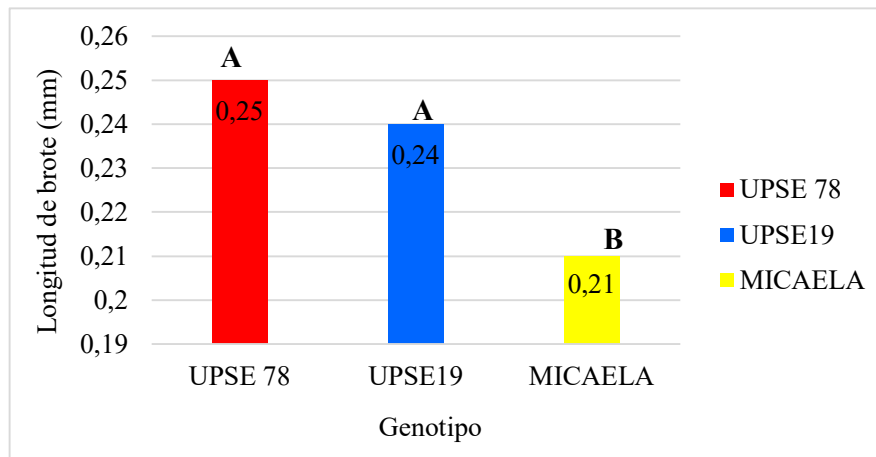
**Tabla 9.** ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor A) material genético en tres días evaluados.

<b>Factor A</b>			
<b>Días evaluados</b>	<b>G.I</b>	<b>F. calculada</b>	<b>P/valores</b>
día 5	2	30,41	< 0,0001 *
día 10	2	0,86	0,4259
día 15	2	0,57	0,5683
<b>CV</b>		8,33; 12,33;12,52	

\*Significativo (0.05)

**Elaborado por:** Claudia Melgar

En la tabla 9 se observa el ANDEVA del factor A en la variable longitud del brote donde los resultados demuestran que en el día 5 existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a p-valores pero en el resto de los días evaluados no existe diferencia significativa. Además, que los coeficientes de variación son aceptables para un ambiente controlado donde se llevó el experimento.



**Figura 4.** Longitud de brotes evaluado a los 5 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.

En la figura 4 se puede notar claramente la diferencia estadística significativa de los genotipos entre UPSE-78, UPSE-19 con MICAELA en función de la variable longitud de brotes con valores de 0,25 y 0,24 mm para UPSE 78 y 19 mientras que para Micaela la longitud fue de 0,21mm.

Los resultados antes mencionados en los cuales se nota que los genotipos promisorios tuvieron un mejor comportamiento en la variable longitud de brotes en comparación con Micaela que teniendo vigor híbrido por ser F1, esto posiblemente se deba a adaptación que han tenido los genotipos promisorios al estrés biótico y abiótico, lo mencionado es semejante a Pozo (2019) quien en su trabajo “Comportamiento agronómico de dos líneas promisorias de tomate *Solanum lycopersicum* tolerantes al estrés hídrico y salinidad”, evaluó el comportamiento agronómico dando como resultado que UPSE 78 destacó obteniendo mayor número de frutos, grados brix y alcanzó un producción de 86,59t.ha<sup>-1</sup>.

También Cancino, (2015) manifiestan que en la micropropagación *in vitro* es importante seleccionar el material genético con características agronómicas deseadas que pueden ser: libres de contaminación fúngica y sanos, pudiendo así obtener resultados favorables en el comportamiento una vez inmersos en el medio de cultivo.

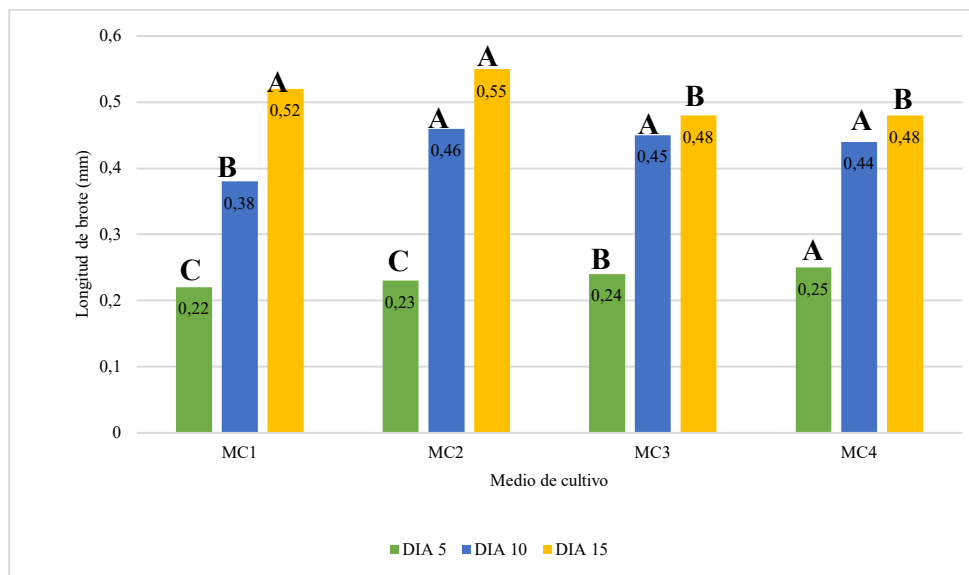
**Tabla 10.** ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor B) medios de cultivo en tres días evaluados.

<b>Factor B</b>			
<b>Días evaluados</b>	<b>G.l</b>	<b>F. calculada</b>	<b>P/valores</b>
día 5	3	12,43	< 0,0001*
día 10	3	14,76	< 0,0001*
día 15	3	8,74	< 0,0001*
<b>CV</b>		8,33; 12,33;12,52	

\*Significativo (0.05)

**Elaborado por:** Claudia Melgar

En la tabla 10 la ANDEVA del factor B en la variable longitud del brote donde los resultados demuestran que en los días 5, 10 y 15 existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a p-valores. Además, que los coeficientes de variación son aceptables para un ambiente controlado donde se llevó el experimento.



**Figura 5.** Longitud de brotes evaluado a los 10 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.

En la figura 5 se observan las diferencias estadísticas significativas de los medios de cultivo en función de los días evaluados, donde se nota que los 15 días de la evaluación se ha obtenido la mayor longitud de brotes con valores 0,52; 0,55; 0,48 y 0,48 mm para MC1, MC2, MC3 y MC4 respectivamente; seguido del día 10 cuyos valores en la longitud de brotes fueron 0,38; 0,44; 0,45 y 0,46 mm para MC1, MC4, MC3 y MC2. Finalmente, al día 5 de la evaluación se obtuvieron los valores más bajos de la longitud que fueron 0,22; 0,23; 0,24 y 0,25mm para los MC1, MC2, MC3 y MC4.

Los resultados demuestran que a medida que se incrementa la concentración de citocinina en el medio de cultivo, se elonga el brote hasta MC2 (0,6 mg/l) a partir del día mencionado, es decir al día 10 y 15 en las concentraciones MC3 y MC4 se inhibe el desarrollo del brote, lo que posiblemente se deba a que a mayor concentración de citocinina mayor oxidación. Lo señalado concuerda con Aucapiña y Lopez Paul, (2016) quienes en su investigación titulada definición de protocolos para el uso de fitohormonas obtuvieron en la concentración 0,5 mg/l de kinetina una mejor tasa de elongamiento de brotes por su crecimiento y desarrollo, además mencionan que cuando se usan concentraciones superiores los resultados son desfavorables.

Mientras Matos *et al.* (2015) en su trabajo con las hormonas ANA 0,1 mg/l<sup>-1</sup> y BA 1 mg/l<sup>-1</sup> obtuvo resultados diferentes con una longitud menor a 10 mm en el cultivo de palmito (chamero) a la sexta semana con 22 a 26 °C , 16 horas luz y 8 de oscuridad.

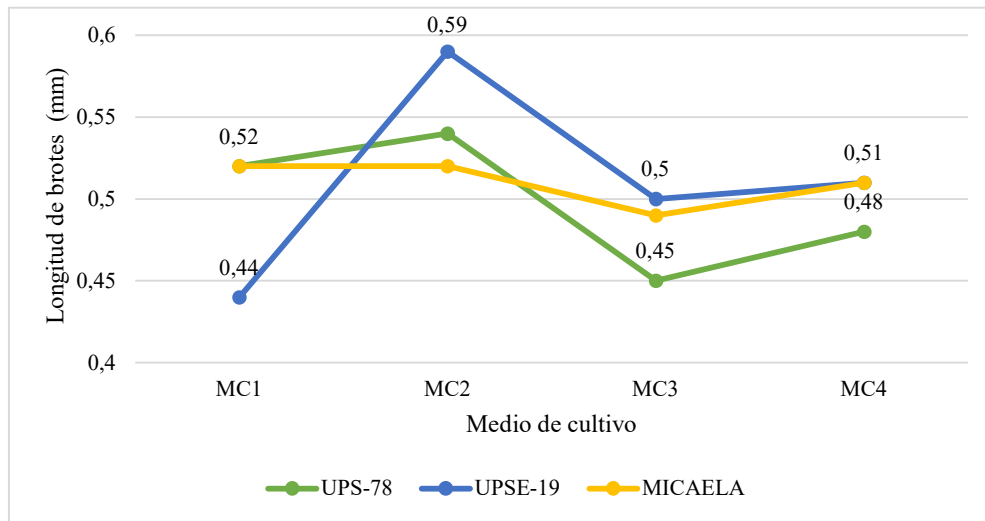
**Tabla 11.** ANDEVA de la variable longitud del brote en (factor AxB) material genético por medio de cultivo en tres días evaluados.

<b>Factor AxB</b>			
<b>Días evaluados</b>	<b>G.l</b>	<b>F. calculada</b>	<b>P/valores</b>
día 5	6	14,78	< 0,0001*
día 10	6	7,48	< 0,0001*
día 15	6	2,47	0,0289
<b>CV</b>		8,33; 12,33;12,52	

\*Significativo (0.05)

**Elaborado por:** Claudia Melgar

En la tabla 11 se observa el ANDEVA del factor AxB en la variable longitud del brote donde los resultados demuestran que en los días 5 y 10 existen diferencias estadísticas significativas de acuerdo a p-valores pero en el día 15 no existe diferencia significativa. Además, que los coeficientes de variación son aceptables para un ambiente controlado donde se llevó el experimento.



**Figura 6.** Longitud de brotes evaluado a los 15 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.

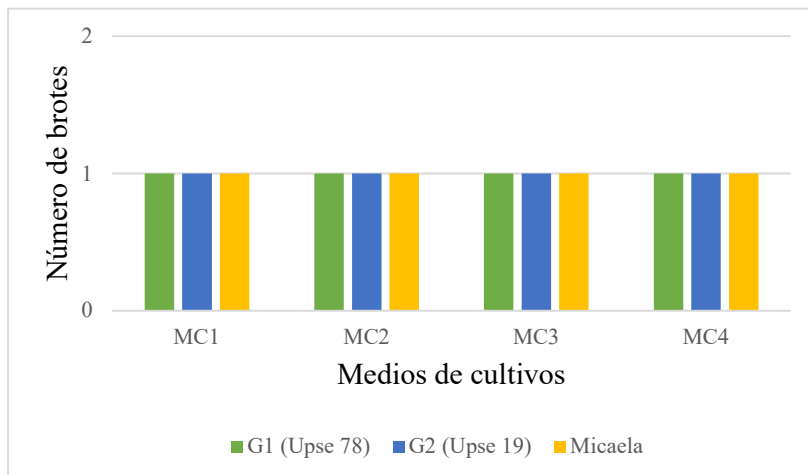
En la figura 6 se presenta la interacción de genotipos x medios de cultivo, donde se encontró que la UPSE-19 respondió mejor en la longitud de brotes iniciando con 0,45 mm en MC1 y continua su desarrollo con MC2 hasta llegar a 0,6 mm donde detiene su desarrollo; mientras MICAELA alcanza una longitud de 0,52 mm y mantiene su desarrollo prácticamente en el resto de los medios, pero en el caso de UPSE-78 se observa incremento significativo de la longitud en MC2 donde su elongación finalmente se detiene.

Estos resultados posiblemente se dan debido a que, a mayor concentración de citocinina mayor oxidación de los explantes, evitando a su vez el proceso de desarrollo. Estos resultados fueron similares a los referidos por Karthik *et al.*, (2011) en *Aloe barbadensis*, quienes empleó un medio de cultivo similar (2,0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP), la

consideraron como la citoquinina más efectiva en la inducción al crecimiento de yemas axilares.

También Yáñez *et al.* (2017) indican en su trabajo que los compuestos fenólicos afecta de manera negativa el tejido vegetal, que manifiesta el ennegrecimiento alrededor del explante y luego al medio, provocando daños, detención, lento crecimiento y muerte del explante.

### 3.4. Número de brote por explante



**Figura 7.** Número de brotes evaluado a los 20 días después de la siembra de explantes, en los genotipos UPSE 78, UPSE19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citoquininas.

En la figura 7 se observa que los genotipos UPSE- 78, UPSE-19 y MICAELA obtuvieron un brote por explante al día veinte de la evaluación en los cuatro medios incluyendo el testigo.

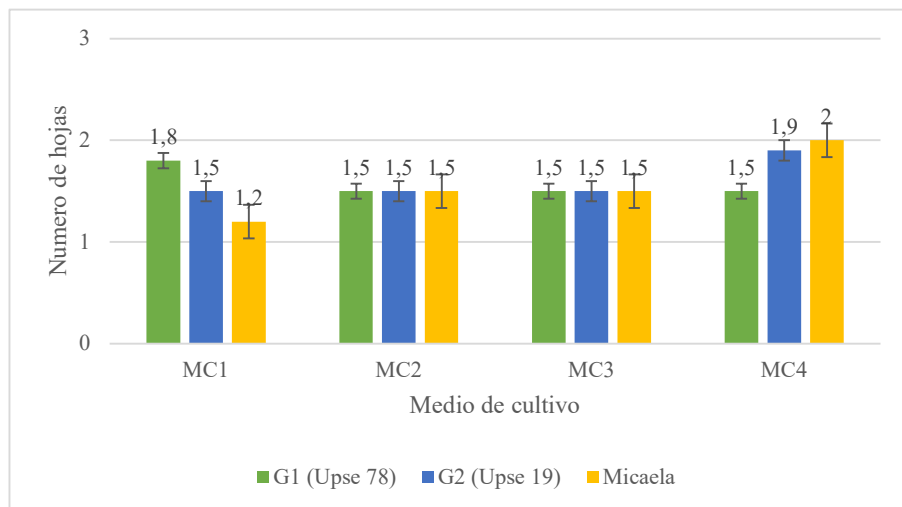
Los resultados antes mencionados demuestran que los genotipos estudiados se comportaron igual en los diferentes medios de cultivos obteniendo un brote para todos los tratamientos esto podría ser por la oxidación generada en los explantes o la reacción que genera el uso de la citoquinina , lo antes mencionado coincide con (Martinez et al., 2012) que indica que al aumentar la concentración de kinetina disminuye el número de brotes por explante a diferencia de la aplicación de BAP, quien en su investigación utilizo  $0,22 \text{ mg/l}^{-1}$  de BAP en el medio de cultivo teniendo un aumento del número de



brotos así mismo en hojas, sin embargo a los 21 días de evaluación notó exudación y pigmentos de color oscuro en los explantes.

Azofeifa (2009) expresa que las especies monocotiledóneas específicamente el sorgo no genera mayor número de brotes por explante por alto nivel de oxidación, para disminuir la proliferación aplicó ácido ascórbico que dio resultados favorables para los explantes.

### 3.5. Promedio de número de hojas



**Figura 8.** Número de hojas evaluados a los 20 días después de la siembra, en los genotipos UPSE 78, UPSE 19 y MICAELA sometidos a distintas concentraciones de citocininas.

La figura 8 muestra que el genotipo MICAELA en el MC4 (medio de cultivo) logró un mayor promedio de 2 hojas, seguido del MC3 y MC2 en donde obtuvieron similares promedios con valores de 1,5 hojas; en cambio el MC1 obtuvo un menor promedio con 1,2 hojas. Por otro lado, UPSE-19 en el MC4 alcanzó 1,9 hojas mientras en el MC1, MC2 y MC3 el número fue similar con 1,5 hojas mientras que UPSE-78 en el testigo MC1 obtuvo 1,8 hojas, en cambio en MC2, MC3 y MC4 logró el mismo número de hojas con un valor de 1,5 respectivamente.

Los resultados demuestran que el mayor número de hojas se consiguió con UPSE-19 y el híbrido MICAELA en el MC4 (0,8 mg/l<sup>-1</sup> KIN) y posiblemente se deba a que es

un genotipo llevados a estrés y vigor híbrido que posee esto no concuerda con Cruzatty *et al.*, (2015) quienes en medios con dosis hormonal citocinina obtuvieron 2,70 hojas mientras que en ausencia de citoquininas 3,60 hojas. Puesto que el mayor número de hojas obtuvo el testigo con un promedio de 4,35 hojas a diferencia del cultivo con hormona que logró 1,99 hojas.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **CONCLUSIONES**

- Las altas concentraciones ( $0,8 \text{ mg/l}^{-1}$ ) de citocinina generaron mayor porcentaje de contaminación y mayor número hojas, pero el crecimiento de brotes se inhibe debido a que a mayor concentración de hormona se observa mayor oxidación.
- El genotipo UPSE-19 fue identificado por generar brotes de  $0,59 \text{ mm}$  de longitud en MC2 con concentración de  $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$  KIN.
- La concentración del MC2 ( $0,6 \text{ mg/l}^{-1}$ ) es considerada la mejor por generar cambios morfológicos en los explantes como mayor longitud de brotes, número de hojas y desarrollo del brote, así mismo se manifestó menor oxidación y contaminación.

### **RECOMENDACIONES**

- Realizar investigaciones con dosis combinadas de citocininas, auxinas y giberelinas para obtener explantes con mejores características fenotípicas.
- Investigar la micropropagación con otras especies vegetales usando citocinina con concentraciones mayores a  $0,8 \text{ mg/l}^{-1}$ .
- Para la germinación es recomendable aplicar agua caliente, así la germinación de la semilla se efectúa en menos días.

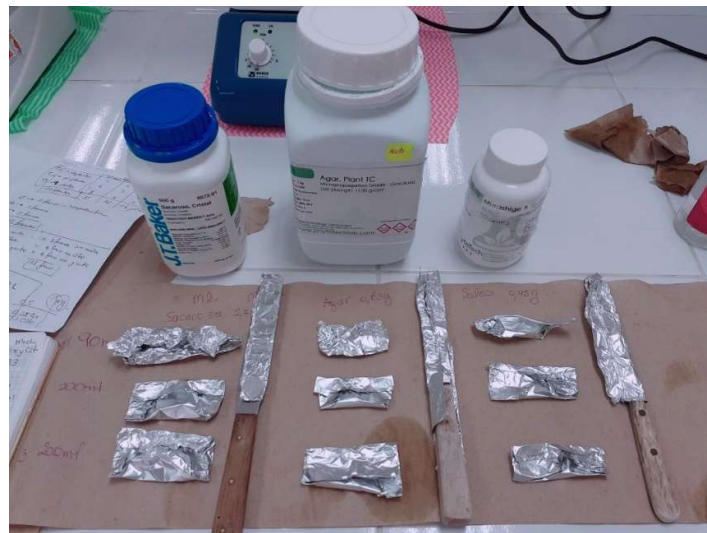
## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Acosta, M., Alvarado-Capó, Y., Cruz-Martín, M., Leiva-Mora, M., Sánchez-García, C., Roque, B., Quiala, E., Chávez, M., Jiménez-Terry, F., O. M. la, Barbón, R., Collado, R., Rodríguez, M., Feria, M.D., Borroto, I., Pérez, M., 2009. Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento in vitro de cinco especies forestales. *Biotechnol. Veg.* 9.
- Albornoz, F., Torres, A., Tapia, M.L., Acevedo, E., 2007. Cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) hidropónico con agua desalinizada y desborrificada en el valle de lluta. *Idesia Arica* 25, 73–80. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292007000200010>
- Alfonso, E.T., Leyva, Á., Hernández, A., 2005. Beneficial microorganisms as efficient biofertilisers for tomato crops (*Lycopersicon esculentum*, Mill) 9.
- Álvarez, M., Moya, C., 2003. Reseña bibliográfica RESULTADOS DE LA MEJORA GENÉTICA DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Y SU INCIDENCIA EN LA PRODUCCIÓN HORTÍCOLA DE CUBA 9.
- Amador-Alfárez, K.A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., Bivián-Castro, E.Y., 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica* 109–131.
- Atares, A., 2014. Universitat Politècnica de València. *Ing. Agua* 18, ix. <https://doi.org/10.4995/ia.2014.3293>
- Aucapiña, C., Lopez, 2016. UPS-QT09895.pdf (Beneficios de protocolo para el uso de fithohormona en el creceiminto de orquideas a nivel in vitro). Universidad Politecnica Salesiana Sede Quito, Universidad Politecnica Salesiana Sede Quito.
- Azofeifa, Á., 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes. *Agron. Mesoam.* 24.
- Bisang, R., Campi, M., Cesa, V., 2009. *Biotechnología y desarrollo* 107.
- Bonilla, O., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala, J.J., Cruz-Izquierdo, S., Reyes-López, D., Hernández-Leal, E., Hernández-Bautista, A., 2014. Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimiento de uso local en Puebla y Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 37, 129–139.
- Cancino, G.O., Quevedo García, E., Villamizar, C.E., Díaz Carvajal, C., 2015. Propagación in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 17, 7–15. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54262>
- Castillo, A., 2017. Propagación de plantas por cultivo in vitro.
- Castillo, A., 1992. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.
- Chávez, M., Feria, M. de, 2012. Aspectos básicos de la propagación in vitro del género *Pinus* por organogénesis. *Biotechnol. Veg.* 12.
- Cid, M., Pina, D., Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., 2016. Estrategias para disminuir la necrosis apical en la multiplicación y el enraizamiento in vitro del Pistacho. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18, 97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61527>

- Cortes, J.S.A., Jovanna, A.G., David, A.C.J., Melida, S.M.R., 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal 21.
- Cruz, A., 2019. Establecimiento De Un Sistema De Micropropagación in Vitro De Tomate (*Solanum Lycopersicum*) CV. Micro-Tom. smbb.com.mx.
- Cruzatty, L.G., Carrasco, J., Carriel, J.M., Murillo, R.L., Osorio, B.G., Olaya, J.C., 2015. Micropropagación in vitro de *Nothofagus alpina* utilizando fitohormonas. *Cienc. Tecnol.* 10.
- Delgado, L., Hoyos, R., 2014. Multiplicación clonal in vivo e in vitro de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. Medellín-Colombia.
- Delgado-García, L.M., Hoyos-Sánchez, R.A., 2015. Multiplicación clonal in vivo e in vitro de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. *Acta Agronómica* 65, 190–196. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n2.42808>
- FAO, 2019. El Estado Mundial de Agricultura y la Alimentación (Sofa) 2004-2005 [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/3/Y5160s/y5160s07.htm> (accessed 9.29.19).
- Freire, M., 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotechnol. Veg.* 3.
- Gutierrez, 1995. Micropropagacion de brotes de tomate (*lycopersicum esculentum* mili.) a partir de plantulas germinadas invitro.
- Hernández, Y., González, M.E., 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultiv. Trop.* 31, 00–00.
- Indacochea, B., 2019. aplicacion-del-cultivo-1.pdf. Universidad Estatal Del Sur De Manabi, Ecuador.
- INEC, 2002. La producción de tomate de mesa.
- Intagri, 2016. Cultivo In Vitro de Células y Tejidos Vegetal | Intagri S.C. [WWW Document]. URL <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal> (accessed 9.30.19).
- Jordán, M., Casaretto, J., 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas 15, 28.
- Juárez, A., de Alba Romenus, K., Zermeño González, A., Ramírez, H., Benavides Mendoza, A., 2015. Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6, 943–954.
- Karthik, C., Barathi, S., D., K., Arulselvi, P., 2011. In vitro propagation of *Aloe barbadensis* Miller, a miracle herb.
- Levitus, D.G., Echenique, D.V., Rubinstein, D.C., Hopp, D.E., 2010. *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal* II 15.
- Martinez, S., Gomez, R., Posada, L., 2012. Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de *Sorghum bicolor* para la formación de callos XIV, núm. 2, julio-diciembre, 2012, pp. 101–110, 104.
- Matos, E., Marcano, M., Azócar, C.J., Mora, A., 2015. Establecimiento y multiplicación in vitro de cinco cultivares de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) colectados en Venezuela. *Bioagro* 27, 121–130.
- Montoya, K., 2020. Producción de brotes de genotipos de tomate *Solanum lycopersicum* a partir de la micropropagación de meristemas apicales. 87.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nuez, F. (corr ), 1995. El Cultivo del tomate. Mundi-Prensa.

- Ojeda, 1996. Inducción de organogenesis y embriogeneis somatica en pinus cemhroides (zucc.) y pinus halepensis (mili);
- Orrego, J.A.E., González, O.T., Sánchez, R.A.H., Kafuri, L.A., 2005. Potencial de propagación in vitro para el tomate de árbol partenocárpico *Cyphomandra betacea* cav. (sendt) 11.
- Parrales, J.C., Zhindón Ganchozo, B.A., Universidad Estatal del Sur de Manabi, Valverde Lucio, Y.A., Universidad Estatal del Sur de Manabi, Álvarez Indacochea, B.V., Universidad Estatal del Sur de Manabi, Choez Indacochea, P.A., Universidad Estatal del Sur de Manabi, 2019. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos, 1st ed. MAWIL. <https://doi.org/10.26820/978-9942-787-98-9>
- Pozo, W.V.P., 2019. Ingeniero agropecuario 120.
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., Espitia, A., 2003. Enraizamiento in vitro de *Dioscorea* sp. Rev. Colomb. Biotecnol. 5, 51–56.
- Segretín, 2006. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales).
- Tabango, A.S.J., 2011. Ingeniera en biotecnología 151.
- Vilchez, J., Martínez, L., Alvarez, C., Albornoz, A., Albany, N., Molina, M., García-Águila, L., 2014. Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro *Psidium guajava* L. Biotecnol. Veg. 14.
- Viñas, M., Jiménez, V.M., 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (*Arecaceae*). Rev. Colomb. Biotecnol. 13, 229–242.
- Yáñez, S., Tafur, V., Rosero, L., 2017. Salvaguarda del germoplasma para manzana emilia (*Malus communis* l. subsp. reineta amarilla de blenheim) por cultivo de tejidos in vitro. GRANJA Rev. Cienc. Vida 26, 52–63.

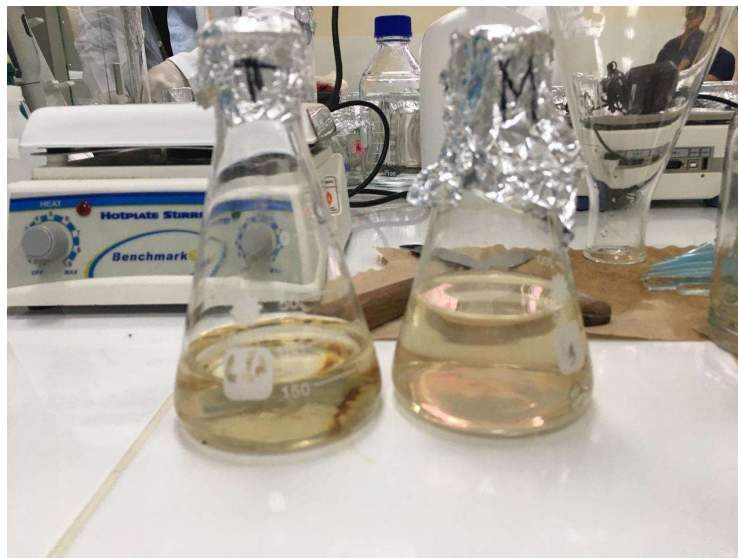
# ANEXOS



*Imagen 2 A. Materiales para realizar el medio de cultivo*



*Imagen 3 A. Incorporación de la hormona citocinina al medio de cultivo*



*Imagen 4 A. Medio de cultivos con distintas concentraciones de citocinina*

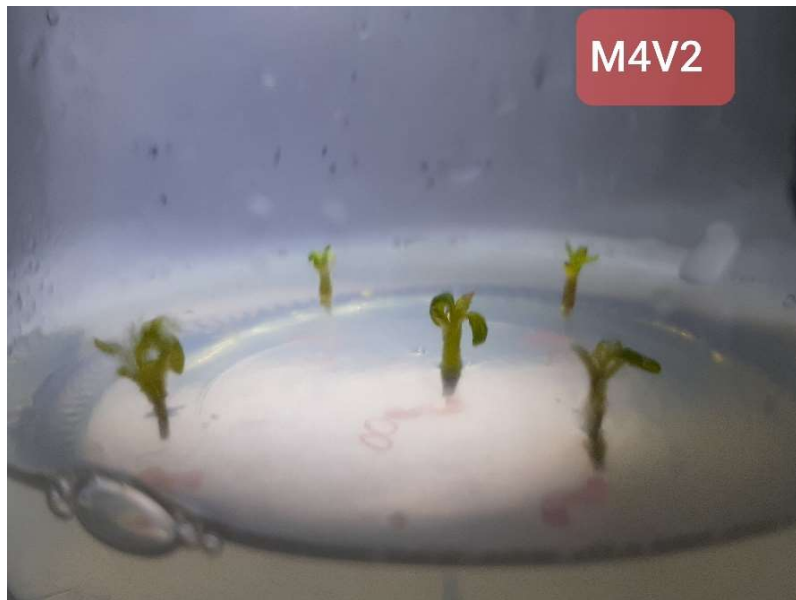




*Imagen 5 A. Siembra de explantes de tomate*



*Imagen 6 A. Tratamientos en la cámara de crecimiento*



*Imagen 7 A. Tratamientos M4V2*



*Imagen 8 A. Obtención de datos de las diferentes variables a los 10 días.*



*Imagen 9 A. Análisis de resultados obtenidos en los cultivos in vitro.*

- **Porcentaje de oxidación o necrosis**

*Día 20*

	UPSE78	UPSE 19	MICAELA
<i>MC1</i>	8,972179222	6,36396103	5,52268051
<i>MC2</i>	4,527692569	3,24037035	0,70710678
<i>MC3</i>	5,522680509	3,24037035	7,1063352
<i>MC4</i>	5,522680509	4,52769257	0,70710678

- **Porcentaje de contaminación**

*DIA 15*

	UPSE78	UPSE 19	MICAELA
<i>MC1</i>	0,70710678	0,70710678	0,70710678
<i>MC2</i>	0,70710678	0,70710678	0,70710678
<i>MC3</i>	3,24037035	5,52268051	3,24037035
<i>MC4</i>	7,10633520	5,52268051	0,70710678

- **Longitud de brotes**

### Análisis Varianza día 5

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R*</i>	<i>R*Aj</i>	<i>CV</i>
<i>Long mm</i>	120	0,67	0,6	8,33

### Cuadro de análisis de la varianza

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P/vaores</i>
<i>Modelo</i>	0,07	20	3, 7E-03	9,88	< 0,0001
<i>Genotipo</i>	0,02	2	0,01	30,41	< 0,0001
<i>Med cultivo</i>	0,01	3	4, 7E-03	12,43	< 0,0001
<i>Rep</i>	4, 1E-03	9	4, 5E-04	1,19	0,3081
<i>Gen*M cultivo</i>	0,03	6	0,01	14,78	< 0,0001
<i>Error</i>	0,04	99	3, 0E-04		
<i>Total</i>	0,11	119			

**Test: Duncan Alfa= 0,05**

**Factor A**

<i>Genotipo</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
UPSE 78	0,25	40	3, 1E-03	A
UPSE 19	0,24	40	3, 1E-03	A
Micaela	0,21	40	3, 1E-03	B

**Análisis Varianza día 10**

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R*</i>	<i>R*Aj</i>	<i>CV</i>
Long mm	120	0,59	0,39	12,33

**Cuadro de análisis de la varianza**

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P/valores</i>
<i>Modelo</i>	0,32	38	0,01	3,02	< 0,0001
<i>Rep</i>	0,01	9	1, 6E-03	0,55	0,8324
<i>Genotipo</i>	4, 9E-03	2	2, 4E-03	0,86	0,4259
<i>Med cultivo</i>	0,12	3	0,04	14,76	< 0,0001
<i>Rep*Genotipo</i>	0,05	18	2, 9E-03	1,04	0,4227
<i>Genotipo*</i>	0,13	6	0,02	7,48	< 0,0001
<i>Med</i>					
<i>Error</i>	0,23	81	2,80E-03		
<i>Total</i>	0,55	119			

**Test: Duncan Alfa= 0,05**

**Factor B día 5**

<i>Med Cultivo</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
4	0,25	30	3, 6E-03	A
3	0,24	30	3, 6E-04	B
2	0,23	30	3, 6E-05	C
1	0,22	30	3, 6E-06	C

**Factor B día 10**

<i>Med Cultivo</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
2	0,46	30	0,01	A
3	0,45	30	0,01	A
4	0,44	30	0,01	A
1	0,38	30	0,01	B

**Factor B día 15**

<i>Med Cultivo</i>	<i>Medias</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>	
2	0,55	30	0,01	A
1	0,52	30	0,01	A
3	0,48	30	0,01	B
4	0,48	30	0,01	B

**Tabla de datos**

<i>MEDIO DE CULTIVOS</i>	<i>DIA 5</i>	<i>DIA 10</i>	<i>DIA 15</i>
<i>MC1</i>	0,22	0,38	0,52
<i>MC2</i>	0,23	0,46	0,55
<i>MC3</i>	0,24	0,45	0,48
<i>MC4</i>	0,25	0,44	0,48

### Análisis Varianza día 15

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>R*</i>	<i>R*Aj</i>	<i>CV</i>
<i>Long mm</i>	120	0,4	0,27	12,52

### Cuadro de análisis de la varianza

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P/vaores</i>
<i>Modelo</i>	0,26	20	0,01	3,24	0,0001
<i>Rep</i>	0,09	9	0,01	2,51	0,0126
<i>Genotipos</i>	4, 6E-03	2	2, 3E-03	0,57	0,5683
<i>Med. Cultivo</i>	0,11	3	0,04	8,74	< 0,0001
<i>Gen*M cultivo</i>	0,06	6	0,01	2,47	0,0289
<i>Error</i>	0,4	99	4, 0E-04		
<i>Total</i>	0,66	119			

### Test: Duncan Alfa= 0,05

<i>Genotipo</i>	<i>Med Cultivo</i>	<i>Media</i>	<i>n</i>	<i>E.E.</i>		
<i>UPSE 19</i>	2	0,59	10	0,02	A	
<i>UPSE 78</i>	2	0,54	10	0,02	A	
<i>MICAELA</i>	1	0,52	10	0,02	B	
<i>MICAELA</i>	2	0,52	10	0,02	B	
<i>UPSE 78</i>	1	0,52	10	0,02	B	
<i>MICAELA</i>	4	0,51	10	0,02	B	C
<i>UPSE 19</i>	1	0,51	10	0,02	B	C
<i>UPSE 19</i>	3	0,5	10	0,02	B	C
<i>MICAELA</i>	3	0,49	10	0,02	B	C D
<i>UPSE 78</i>	4	0,48	10	0,02	B	C D
<i>UPSE 78</i>	3	0,45	10	0,02		C D
<i>UPSE 19</i>	4	0,44	10	0,02		D

**Tabal de datos mm**

Rep	Genotipos	Med Cultivo	mm		
			long dia 5	long dia 10	long dia 15
1	Upse 78	1	0,23552845	0,43136376	0,50785587
2	Upse 78	1	0,24303805	0,41497335	0,47712125
3	Upse 78	1	0,25527251	0,42324587	0,57403127
4	Upse 78	1	0,25042	0,38738983	0,55145
5	Upse 78	1	0,2278867	0,39269695	0,51851394
6	Upse 78	1	0,25527251	0,40993312	0,47275645
7	Upse 78	1	0,26007139	0,38738983	0,49136169
8	Upse 78	1	0,24551267	0,38916608	0,56820172
9	Upse 78	1	0,25527251	0,44715803	0,49415459
10	Upse 78	1	0,24797327	0,41329976	0,54406804
1	Upse 19	1	0,22271647	0,42651126	0,4578819
2	Upse 19	1	0,23044892	0,38021124	0,43136376
3	Upse 19	1	0,21484385	0,40654018	0,43136376
4	Upse 19	1	0,23044892	0,38916608	0,44715803
5	Upse 19	1	0,22530928	0,38021124	0,462398
6	Upse 19	1	0,20951501	0,43136376	0,54406804
7	Upse 19	1	0,24797327	0,41497335	0,5563025
8	Upse 19	1	0,25767857	0,40483372	0,61278386
9	Upse 19	1	0,2764618	0,40823997	0,55145
10	Upse 19	1	0,26245109	0,4440448	0,57634135
1	micaela	1	0,161368	0,34242268	0,44715803
2	micaela	1	0,161368	0,30103	0,42651126
3	micaela	1	0,15533604	0,39794001	0,69019608
4	micaela	1	0,161368	0,29885308	0,46089784
5	micaela	1	0,17318627	0,26951294	0,47712125
6	micaela	1	0,20411998	0,32221929	0,44715803
7	micaela	1	0,19865709	0,29885308	0,50514998
8	micaela	1	0,1931246	0,2787536	0,58883173
9	micaela	1	0,17609126	0,30103	0,49136169
10	micaela	1	0,1903317	0,27184161	0,68124124
1	Upse 78	2	0,25042	0,49136169	0,42975228
2	Upse 78	2	0,26717173	0,51851394	0,51982799
3	Upse 78	2	0,23044892	0,53147892	0,74036269
4	Upse 78	2	0,24551267	0,47712125	0,44715803
5	Upse 78	2	0,20139712	0,36172784	0,5797836
6	Upse 78	2	0,25527251	0,34242268	0,51851394
7	Upse 78	2	0,23044892	0,36172784	0,41497335
8	Upse 78	2	0,2787536	0,47712125	0,55266822
9	Upse 78	2	0,25285303	0,36172784	0,54406804



10	Upse 78	2	0,24797327	0,51851394	0,65321251
1	Upse 19	2	0,25527251	0,42651126	0,69019608
2	Upse 19	2	0,24303805	0,39794001	0,55145
3	Upse 19	2	0,23044892	0,34242268	0,49136169
4	Upse 19	2	0,23552845	0,47712125	0,51851394
5	Upse 19	2	0,25767857	0,50514998	0,56820172
6	Upse 19	2	0,24303805	0,41497335	0,60205999
7	Upse 19	2	0,25285303	0,462398	0,62324929
8	Upse 19	2	0,25042	0,47712125	0,54406804
9	Upse 19	2	0,23299611	0,50514998	0,65321251
10	Upse 19	2	0,24797327	0,47712125	0,62324929
1	micaela	2	0,161368	0,41497335	0,44715803
2	micaela	2	0,15533604	0,43136376	0,50514998
3	micaela	2	0,1931246	0,462398	0,462398
4	micaela	2	0,17609126	0,38021124	0,43136376
5	micaela	2	0,18469143	0,50514998	0,53147892
6	micaela	2	0,1931246	0,49136169	0,56820172
7	micaela	2	0,17897695	0,5563025	0,59106461
8	micaela	2	0,20951501	0,38021124	0,44715803
9	micaela	2	0,20139712	0,49136169	0,51851394
10	micaela	2	0,22530928	0,65321251	0,69897
1	Upse 78	3	0,27184161	0,38021124	0,43136376
2	Upse 78	3	0,22271647	0,34242268	0,40823997
3	Upse 78	3	0,20139712	0,38021124	0,41497335
4	Upse 78	3	0,28103337	0,49136169	0,49136169
5	Upse 78	3	0,24797327	0,36172784	0,44090908
6	Upse 78	3	0,26245109	0,39794001	0,39794001
7	Upse 78	3	0,25042	0,47712125	0,47712125
8	Upse 78	3	0,22530928	0,41497335	0,5797836
9	Upse 78	3	0,2764618	0,43136376	0,43136376
10	Upse 78	3	0,23044892	0,40823997	0,41497335
1	Upse 19	3	0,22271647	0,42651126	0,40823997
2	Upse 19	3	0,26481782	0,54406804	0,54406804
3	Upse 19	3	0,23044892	0,39794001	0,43136376
4	Upse 19	3	0,23044892	0,54406804	0,5797836
5	Upse 19	3	0,24303805	0,56820172	0,56820172
6	Upse 19	3	0,27184161	0,47712125	0,44715803
7	Upse 19	3	0,23552845	0,39794001	0,47712125
8	Upse 19	3	0,21748394	0,462398	0,5563025
9	Upse 19	3	0,25527251	0,49136169	0,462398
10	Upse 19	3	0,23552845	0,47712125	0,56820172
1	micaela	3	0,24303805	0,39794001	0,39794001
2	micaela	3	0,27184161	0,39794001	0,44715803
3	micaela	3	0,22010809	0,38021124	0,42651126

4	micaela	3	0,22530928	0,51851394	0,47712125
5	micaela	3	0,22271647	0,47712125	0,47712125
6	micaela	3	0,2121876	0,5563025	0,5797836
7	micaela	3	0,21748394	0,47712125	0,47712125
8	micaela	3	0,20139712	0,47712125	0,53147892
9	micaela	3	0,25042	0,42324587	0,53147892
10	micaela	3	0,20411998	0,4440448	0,5563025
1	Upse 78	4	0,23552845	0,39794001	0,462398
2	Upse 78	4	0,2787536	0,462398	0,5797836
3	Upse 78	4	0,23299611	0,47712125	0,5563025
4	Upse 78	4	0,2764618	0,44715803	0,462398
5	Upse 78	4	0,22010809	0,41497335	0,462398
6	Upse 78	4	0,20411998	0,44715803	0,4440448
7	Upse 78	4	0,22530928	0,41497335	0,44715803
8	Upse 78	4	0,26245109	0,39794001	0,39794001
9	Upse 78	4	0,22530928	0,38021124	0,462398
10	Upse 78	4	0,24303805	0,43136376	0,50514998
1	Upse 19	4	0,25767857	0,39794001	0,43136376
2	Upse 19	4	0,23552845	0,462398	0,38021124
3	Upse 19	4	0,25042	0,39794001	0,39794001
4	Upse 19	4	0,23552845	0,36172784	0,38916608
5	Upse 19	4	0,21748394	0,38021124	0,38916608
6	Upse 19	4	0,24797327	0,49136169	0,53147892
7	Upse 19	4	0,23044892	0,32221929	0,50514998
8	Upse 19	4	0,26717173	0,462398	0,50514998
9	Upse 19	4	0,21748394	0,39794001	0,39794001
10	Upse 19	4	0,26245109	0,47712125	0,47712125
1	micaela	4	0,26245109	0,54406804	0,52374647
2	micaela	4	0,24797327	0,44715803	0,50514998
3	micaela	4	0,25285303	0,44715803	0,49136169
4	micaela	4	0,27415785	0,47567119	0,462398
5	micaela	4	0,2787536	0,47712125	0,47712125
6	micaela	4	0,25285303	0,54406804	0,54406804
7	micaela	4	0,27415785	0,47712125	0,50514998
8	micaela	4	0,25767857	0,50514998	0,51851394
9	micaela	4	0,29666519	0,53147892	0,53147892
10	micaela	4	0,24551267	0,44715803	0,51851394

Número por	G1 (Upse 78)    G2 (Upse 19)    Micaela			de brote explante
MC1	1	1	1	
MC2	1	1	1	
MC3	1	1	1	
MC4	1	1	1	

### Promedio de número de hojas

	G1 (Upse 78)	G2 (Upse 19)	Micaela
MC1	1,8	1,5	1,2
MC2	1,5	1,5	1,5
MC3	1,5	1,5	1,5
MC4	1,5	1,9	2

### Presupuesto del proyecto

Concepto	Cantidad	Costo unitario US\$	Costo total US\$
<b>MATERIALES</b>			
Matraz Erlenmeyer 1000 ml	2	25	50
Matraz Erlenmeyer 500 ml	2	18	36
Matraz Erlenmeyer 250 ml	4	13	52
Vasos de precipitación de 250 ml	4	10	40
Vasos de precipitación 100 ml	4	8	32
Vasos de precipitación 50 ml	4	2	8
Probeta 250 ml	2	18	36
Probeta 50 ml	2	9	18

<i>Frascos de vidrio 250 ml</i>	100	2	200
<i>Espátula mango de madera</i>	2	6	12
<i>Hojas de bisturí #15</i>	50	5	250
<i>Pinza bayoneta de Jansen</i>	2	7,5	15
<i>Mechero de alcohol</i>	1	8	8
<i>Gasa</i>	1	8	8
<i>Papel filtro pliego</i>	25	0,5	12,5
<i>Papel aluminio 150 m</i>	1	17,68	17,68
<i>Film plástico rollo</i>	1	3	3
<i>Papel toalla 150 m</i>	1	8,04	8,04
<i>Cloro 3700 ml</i>	50	2,72	2,72
<i>Alcohol 3700 ml</i>	50	8,93	8,93
<i>Mascarillas 50 unidades</i>	1	2,98	2,98
<i>Guantes 50 pares</i>	2	5,85	11,7
<i>Puntas de pipeta cito test x 500 U</i>	1	8	8
<i>Mango de bisturí #3</i>	3	2,5	7,5
<i>Varilla agitadora magnética</i>	2	5	10
<i>Cinta aislante 120 yardas</i>	1	1,6	1,6
<i>Cinta Parafilm 4'' x 125 pies</i>	1	36,8	36,8
<i>Cinta masking</i>	1	1,5	1,5
<i>Cajas Petri</i>	100	35	35
<b>INSUMOS</b>			
<i>Bacto agar 454 g</i>	1	93	93
<i>Sacarosa 1 Kg</i>	1	1,5	1,5
<i>Sucrosa AR 500 g</i>	1	25	25
<i>Sales M519 50 L</i>	1	28,97	28,97
<i>Vitamina Inositol 500 g</i>	1	219,9	219,9
<i>Vitamina Tiamina HCl 250 g</i>	1	130	130
<i>Hormona A.N.A. 250 ml</i>	1	9,8	9,8
<i>Hormona Kinetina 10 g</i>	1	100	100
<i>Agua destilada galón</i>	5	2,5	12,5

**EQUIPOS**

<i>Autoclave</i>	1	9800	9800
<i>Estufa</i>	1	5953	5953
<i>Cámara de flujo laminar</i>	1	3300	3300
<i>Cámara de crecimiento</i>	1	2500	2500
<i>Balanza analítica</i>	1	350	350
<i>Agitador magnético con calefacción</i>	1	400	400
<i>Micropipeta 1000-100 ml y de 100-10 ml</i>	2	150	300
<i>pH metro digital</i>	1	30	30
<b>TOTAL</b>			<b>24,186,62</b>