

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

Efecto del Ácido Naftalenacético (ANA) y la Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) *in vitro*


Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Agrónoma

Autora:

Marcia Fernanda Villa Villa

Directora:

Lourdes Elizabeth Díaz Granda

ORCID:  0000-0003-0983-723X

Cuenca, Ecuador

2023-03-24

Resumen

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es un frutal de importancia comercial en Ecuador, especialmente en provincias de la Sierra ecuatoriana. La propagación se realiza por métodos tradicionales, lo cual genera inconvenientes en el desarrollo y producción de la planta. Esto permite buscar métodos eficientes para obtener plantas sanas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido Naftalenacético (ANA) y la Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) *in vitro*. Para esto se seleccionó plantas jóvenes y se aplicó nueve tratamientos T1= 0 ppm ANA+0 ppm BAP, T2= 0 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T3= 0.5 ppm ANA+0 ppm BAP, T4= 0.25 ppm ANA+0.13 ppm BAP, T5= 0.5 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T6= 0.75 ppm ANA+0.38 ppm BAP, T7= 0.13 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T8= 0.25 ppm ANA+0.5 ppm BAP y T9= 0.38 ppm ANA+0.75 ppm BAP, en medio de cultivo Phytamax 75% y solidificado con 7.5 g/L de agar-agar. La unidad experimental estuvo compuesta por un micro-esqueje al cual se aplicó un tratamiento. Las variables a medir fueron número de hojas, longitud de raíz (mm), longitud de brote (mm) durante los 90 días, biomasa del brote y raíz a los 90 días. Además, se registró el engrosamiento del micro-esqueje por cada tratamiento. Para el análisis de datos se utilizó las variables longitud de brote y número de hojas. El tratamiento dos con 0.5 ppm BAP favoreció la longitud del brote (4.5mm), a diferencia de la combinación de ANA+BAP que promovió el 60% de engrosamiento del micro-esqueje sin presencia de brotes.

Palabras clave: tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav., propagación, micro-esquejes, *in vitro*

Abstract

Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) is a fruit tree of commercial importance in Ecuador, especially in the provinces of the Ecuadorian highlands. Propagation is carried out by traditional methods, which generates inconveniences in the development and production of the plant. It allows looking for efficient methods to obtain healthy plants. The objective of this study was to evaluate the effect of Naftaleneacetic acid (NAA) and Benzylaminopurine (BAP) on the development of micro-scions of tree tomatoes (*Solanum betaceum* Cav.) in vitro. For this, young plants were selected, and nine treatments were applied, which were T1= 0 ppm ANA+0 ppm BAP, T2= 0 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T3= 0.5 ppm ANA+0 ppm BAP, T4= 0.25 ppm ANA+0.13 ppm BAP, T5= 0.5 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T6= 0.75 ppm ANA+0.38 ppm BAP, T7= 0.13 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T8= 0.25 ppm ANA+0.5 ppm BAP and T9= 0.38 ppm ANA+0.75 ppm BAP, on Phytamax 75% culture medium and solidified with 7.5 g/L agar-agar. The experimental unit consisted of a micro-shoot to which one treatment was applied. The variables to be measured were leaf number, root length (mm), shoot length (mm) during the 90 days, shoot and root biomass at 90 days. In addition, micro-shoot thickening was recorded for each treatment. The variables shoot length and number of leaves were used for data analysis. Treatment two with 0.5 ppm BAP favored shoot length (4.5 mm), in contrast to the ANA+BAP combination that promoted 60% shoot thickening without the presence of shoots.

Keywords: tree tomato, *Solanum betaceum* Cav., propagation, micro-scions, *in vitro*

Índice de Contenido

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	12
Objetivos	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos específicos	14
Revisión bibliográfica	15
3.1. Descripción general del cultivo	15
3.1.1. Origen	15
3.1.2. Descripción botánica.....	15
3.1.3. Propagación	16
3.2. Importancia del cultivo en el Ecuador	16
3.3. Problemática del cultivo y enfermedades	16
3.4. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	17
3.4.1. Tipos de cultivo <i>in vitro</i>	18
3.4.2. Cultivo de segmentos nodales o micro-esquejes	19
3.4.3. Fases o etapas del cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	20
3.4.4. Problemas en el cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	20
3.4.5. Condiciones ambientales de cultivo y asepsia	21
3.5. Medio de cultivo	21
3.5.1. Composición del medio de cultivo.....	22
Materiales y métodos	23
4.1. Ubicación del lugar de la investigación	23
4.2. Materiales	24
4.2.1. Material vegetal	24
4.2.2. Materiales físicos	24
4.2.3. Materiales químicos	24
4.2.4. Materiales de laboratorio	24
4.2.5. Equipos	25
4.3. Métodos	25
4.3.1. Metodología para el objetivo específico uno: Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de ANA y BAP en el desarrollo de micro-esquejes <i>in vitro</i>	25
4.3.1.1. Protocolo de desinfección de materiales y equipos	25

4.3.1.2.	Preparación del medio de cultivo.....	25
4.3.1.3.	Recolección del material vegetal	29
4.3.1.4.	Protocolo de desinfección del material vegetal.....	30
4.3.1.5.	Protocolo de siembra de los micro-esquejes	31
4.3.2.	Metodología para el objetivo específico dos: Medir el efecto de ANA y BAP en el crecimiento aéreo y radicular de micro-esquejes de <i>Solanum betaceum</i> Cav.	32
4.3.3.	Diseño experimental	33
4.3.4.	Análisis estadístico	34
Resultados y discusión		35
5.1.	Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes <i>in vitro</i>	35
5.2.	Medir el efecto de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en el crecimiento aéreo y radicular de micro-esquejes de <i>Solanum betaceum</i> Cav.	38
Conclusiones		42
Recomendaciones		43
Referencias		44
Anexos		49

Índice de figuras

Figura 1. Cultivo de micro-esqueje individual y múltiple.....	19
Figura 2. Longitud de plántula para realizar la extracción de micro-esquejes.	30
Figura 3. Longitud del micro-esqueje.....	30
Figura 4. Micro-esqueje de tomate de árbol.....	31
Figura 5. Descripción de las variables longitud de brote y raíz en tomate de árbol.	32
Figura 6. Características del micro-esqueje. A. Sin cambios. B. Engrosamiento.....	36
Figura 7. Brote a partir de un micro-esqueje	39
Figura 8. Brote con hojas pequeñas y en roseta.	41

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos de micronutrientes y hierro.	26
Tabla 2. Compuestos de macronutrientes y vitaminas del medio de cultivo Phytamax.....	27
Tabla 3. Tratamientos para la determinación de concentraciones de ANA y BAP para propagación <i>in vitro</i> de micro-esquejes de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>).....	28
Tabla 4. Aleatorización de tratamientos.....	33
Tabla 5. Prueba de normalidad y homocedasticidad para las variables longitud de brote y número de hojas.	35

Índice de gráficos

Gráfico 1. Comportamiento de los micro-esquejes de <i>Solanum betaceum</i> en los nueve tratamientos que contienen ANA y BAP.	35
Gráfico 2. Efecto de ANA y BAP en el crecimiento de longitudinal (mm) de micro-esquejes de tomate de árbol.	38
Gráfico 3. Comportamiento de la variable número de hojas en micro-esquejes de tomate de árbol.	40

Índice de anexos

Anexo A. Composición de medios básicos para el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.	49
Anexo B. Material vegetal usado en la investigación.	50
Anexo C. Preparación de soluciones de micronutrientes y reguladores de crecimiento.	50
Anexo D. Medición de pH y Conductividad eléctrica del medio de cultivo Phytamax... ..	51
Anexo E. Materiales al interior de la cámara de flujo laminar.	51
Anexo F. Desinfección del material vegetal.	51
Anexo G. Extracción de micro-esquejes.	52
Anexo H. Ubicación de tratamientos en el cuarto de crecimiento.	52
Anexo I. Desarrollo de la yema del micro-esqueje.	52

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad de Cuenca, al personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por compartir sus mejores conocimientos y el apoyo brindado en todo este camino recorrido para poder hacer posible esta investigación.

A mi familia por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida, por todo el trabajo y esfuerzo que han hecho por mí, gracias por enseñarme que con esfuerzo, sacrificio y perseverancia todo es posible.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios que me permitió llegar hasta aquí, gracias señor por bendecirme y darme fuerza en todo momento sin importar la situación siempre sentí tu presencia.

A mis padres por la confianza, el apoyo, la paciencia que me han tenido siempre y por el sacrificio depositado en mí.

Introducción

El tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav., es una planta nativa de América del Sur que se ha ido extendiendo por la parte subtropical del mundo, representando una gran importancia en la producción comercial de países como Colombia, Ecuador, Perú, Sudáfrica, India y Nueva Zelanda (Estévez, 2019).

En Ecuador el cultivo de *S. betaceum* se encuentra distribuido en las provincias de Tungurahua, Chimborazo, Azuay, Pichincha, Cotopaxi, Carchi, Bolívar, Cañar, Loja e Imbabura entre pequeños y medianos productores con un precio promedio a nivel de productor de 0.79 USD/Kg (Cangás, 2019).

Según los datos del INEC y MAG (2021) hasta el año 2020, el cultivo tuvo una productividad de 10 605 toneladas de fruta fresca en una superficie cosechada de 1 044 ha (SIPA, 2020), de los cuales en el 2018 se exportó 20 000 kg de fruta a España, Holanda, Bélgica, Francia, Emiratos Árabes Unidos, Italia, Suiza y Alemania (Diario El Comercio, 2019) debido al alto valor nutricional de la fruta (Padilla et al., 2017).

La especie tiene un importante potencial de exportación en la región andina del Ecuador y tiene una alta demanda a nivel mundial (Villares et al., 2018) por el papel que desempeña en la alimentación de la población, además de que representa una alternativa productiva frente a las nuevas tendencias del mercado nacional e internacional al ser un fruto exótico andino (Buono et al., 2019).

Sin embargo, en la actualidad se presentan inconvenientes en la producción del cultivo debido a la pérdida de calidad del fruto por los cruzamientos naturales que se producen, lo cual provoca el rechazo de la fruta en el mercado internacional (Waweru et al., 2011), la difusión de patógenos que pueden destruir las plántulas en etapas iniciales de desarrollo por el uso de métodos tradicionales de propagación (semillas y esquejes) (Moreno et al., 2020) y el tiempo prolongado para obtener plantas en producción, es decir, las plantas obtenidas por semilla tardan 18 meses en producir fruto a diferencia de las plantas provenientes de esquejes que favorecen a una producción temprana (Salazar, 2020).

Para llevar a cabo la micropropagación de *S. betaceum* Cav. recomiendan la combinación de auxina y citoquinina para generar plantas completas en periodos de tiempo cortos (Salazar, 2020) debido que las auxinas estimulan la elongación celular y la formación de raíces (Garay et al., 2014), por otra parte las citoquininas regulan la proliferación y diferenciación celular (Kieber & Schaller, 2018), además de permitir la generación de brotes (Müller & Sheen, 2007), lo cual favorece los procesos de desarrollo de las plantas.

De acuerdo a lo antes mencionado, la propagación *in vitro* de plantas favorece la obtención

de material vegetal en forma masiva, económica, rentable y en cualquier época del año (Copatti et al., 2016) a partir de cualquier explante mediante la aplicación de un estimulante, en relación a las plantas obtenidas por métodos tradicionales de propagación. Es así que en este proyecto se planteó evaluar el desarrollo y/o crecimiento de micro-esquejes de tomate de árbol por medio de la aplicación de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético y bencilaminopurina en un medio de cultivo determinado.

Objetivos

2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto del ácido Naftalenacético (ANA) y la Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de Ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes *in vitro*.
- Medir el efecto de ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en el crecimiento aéreo y radicular de micro-esquejes de *Solanum betaceum Cav.*

Revisión bibliográfica

3.1. Descripción general del cultivo

3.1.1. Origen

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), también conocido como tamarillo, tomate sacha, tomate yunca, tomatillo, tomate de árbol, “Tomate lima”, “Tomate montaña” o “Tomate La Paz” (Padilla et al., 2017), es originario de América del Sur, principalmente de Colombia, Perú, Chile, Ecuador y Bolivia (Wang & Zhu, 2020).

En Ecuador, el cultivo de tomate de árbol se encuentra principalmente en las provincias de Azuay, Cañar, Carchi, Chimborazo, Bolívar, Imbabura, Loja, Pichincha y Tungurahua (Villares et al., 2018) registrando rendimientos de 10.15 t/ha de fruta (SIPA, 2020).

Esta especie fue descrita por primera vez en 1801 por Cavanilles con el nombre de *Solanum betaceum* y posteriormente en 1845 fue transferida al género *Cyphomandra* por Sendtner (Feicán et al., 2017), sin embargo, luego de trabajos investigativos realizados por Bohs en 1995 nuevamente cambió al género *Solanum*, el cual se mantiene en la actualidad (Simões, 2016).

3.1.2. Descripción botánica

Es un árbol pequeño, perenne, semileñoso, que alcanza una altura de 2 a 3 metros (m) formando una copa extendida (Moreno et al., 2020); las raíces son pivotantes y profundas cuando la reproducción se realiza por semilla, mientras que cuando se hace por estaca son ramificadas y superficiales (Prohens & Nuez, 2001).

El árbol forma un solo tallo que a una altura de 1.1 a 1.8 m se divide en dos o tres ramas principales, en donde mediante un peciolo de 4 a 8 cm de longitud están unidas hojas simples, alternas, lobuladas, de 15 a 30 centímetros (cm) de largo y 10 a 20 cm de ancho, que desprenden un aroma característico (Buono et al., 2019).

Las flores son pequeñas, hermafroditas de color rosado, dispuestas en una inflorescencia que lleva de 10 a 14 flores en las bifurcaciones de las ramas (Guimarães et al., 1996), su fruto es una baya de forma ovoide, de color verde cuando está inmaduro y cuando madura la cáscara es de color rojo, naranja o morado, tiene sabor ligeramente amargo, agrio y astringente según la variedad (Osorio et al., 2012).

En el fruto se encuentran aproximadamente 200 semillas, las cuales son planas y circulares, miden de 2 a 4 milímetros (mm) y están cubiertas por un arilo de diferente color de acuerdo a la variedad (Acosta et al., 2016).

3.1.3. Propagación

La propagación de *Solanum betaceum* se puede llevar a cabo mediante semillas, esquejes o injertos en especies compatibles (Simões, 2016). El método de propagación dependerá de la finalidad que requiera el productor o investigador, debido que las plantas provenientes de semillas tardan de 12 a 14 meses para iniciar la producción luego del trasplante, mientras que las plantas derivadas de estacas tardan entre 8 y 10 meses (Buono et al., 2019).

La propagación asexual también se puede realizar mediante las técnicas de propagación *in vitro* por medio de brotes axilares, organogénesis y embriogénesis somática (Simões, 2016) permitiendo obtener varias plántulas idénticas entre sí a partir de una planta madre (Muñoz, 2012).

3.2. Importancia del cultivo en el Ecuador

El tomate de árbol es considerada una planta de importancia económica, mencionando que la mayor producción comercial se encuentra en Colombia, Perú y Ecuador (Ramírez & Kallarackal, 2019) debido al potencial medicinal, alimenticio que provee la planta y el fruto, mismo que es rico en fibra, vitaminas, potasio y tiene una alta actividad antioxidante (Moreno et al., 2020), por lo cual se ha generado un incremento en el consumo de mercados frutícolas locales y extranjeros (Acosta et al., 2016), generando así motivación para el estudio e investigación de este producto agrícola.

En Ecuador el cultivo se encuentra distribuido entre medianos y pequeños productores, quienes llevan a cabo el cultivo sin condiciones técnicas de manejo que favorecen la calidad y rendimiento de la planta (Padilla et al., 2017), sin embargo hasta el 2 020 se ha generado una producción de 10 605 t de fruta fresca en una superficie cosechada de 1 044 ha en las zonas productoras de Imbabura, Tungurahua, Carchi, Chimborazo, Azuay, Pichincha, Sucumbíos, Napo y Loja (SIPA, 2020)

También se menciona que el cultivo de *S. betaceum* se encuentra en huertos familiares en provincias de la Sierra (Ramírez & Kallarackal, 2019), en donde se llevan a cabo prácticas culturales tradicionales que generan desafíos por las condiciones climáticas y de manejo (Tandazo et al., 2017), por lo cual realizar investigación sobre la producción de plantas sanas de esta especie mediante el uso de técnicas *in vitro* resulta favorable para proveer de material vegetal de calidad y buen rendimiento permitiendo que la fruta se introduzca en el mercado.

3.3. Problemática del cultivo y enfermedades

En el país, la producción de *S. betaceum* se ve afectada por varios factores entre ellos la difusión y susceptibilidad a plagas y enfermedades (Villares et al., 2018), en donde por datos generados por el INEC se pierden 123 ha de superficie cultivada (SIPA, 2020); entre los cuales

se encuentra *Colletotrichum acutatum* Simmonds (Antracnosis), enfermedad conocida como “ojo de pollo” (Salazar, 2020).

Además se considera la falta de diferenciación entre variedades, lo cual se generan limitantes en la expansión del cultivo y en la exportación de la fruta (Viera et al., 2016).

El cultivo de *S. betaceum* se puede ver afectado por hongos que provocan defoliación, manchas húmedas en el tallo y hojas, también es afectado por insectos que intervienen en hojas, tallo y fruto, como es el caso de la mosca de la fruta, pulgones que afectan la formación de los brotes, reducen el crecimiento vegetativo y enroscado de las hojas (Feicán et al., 2017), además de nematodos que se encuentran en el suelo o en las semillas que no fueron desinfectadas correctamente y por virus que provocan deformación o cambio de coloración en frutos (Julião, 2019).

Por lo cual los agricultores utilizan grandes cantidades de agroquímicos para el control de enfermedades, generando un costo elevado en la producción, además disminuye la polinización y ocasionan daños en la salud de productores así como de consumidores; de tal manera se encamina al uso de la biotecnología y el aprovechamiento de los cultivares con resistencia genética a enfermedades, mencionando el cultivar “Anaranjado Puntón” como uno de ellos (Viera et al., 2016).

3.4. Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* es la ciencia del cultivo de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre en medios artificiales (George et al., 2008), además es un método de propagación asexual que se lleva a cabo desde principios del siglo XX a partir de la definición de totipotencia vegetal dada por Haberlandt (Aguirre et al., 2016) lo cual surge como un aporte al desarrollo de una nueva agricultura.

Este cultivo permite el crecimiento aséptico de un segmento inicial de tejido o denominado explante (González, 2007), éstos pueden ser ápices, primordios, segmentos de tallo, anteras o polen genéticamente idénticas a la planta madre, se inocula en recipientes de vidrio o plástico con medios de cultivo nutritivos y se mantienen en condiciones controladas de luz y temperatura (Abdelnour & Vincent, 1994) para regenerar y multiplicar de manera eficaz en relación a la propagación convencional que necesita mayor espacio y tiempo para la producción de plantas (Aguirre et al., 2016).

En los últimos años el uso del cultivo de tejidos *in vitro* se ha extendido rápidamente por su utilidad en la investigación, conservación, mejora y multiplicación de varias especies como hortalizas, frutales, ornamentales y forestales de interés alimenticio, medicinal o económico para el ser humano (Sharry et al., 2020), una especie es *Solanum betaceum*, el cual presenta

problemas radiculares y en la etapa de fructificación por el ataque de nematodos y hongos (Julião, 2019).

A raíz de lo antes mencionado se han llevado a cabo diferentes métodos de propagación, en donde Chacón et al. (2014) desarrollaron un protocolo de micropropagación usando estacas, en donde emplearon diferentes concentraciones de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ para la desinfección, seguidamente en la multiplicación y enraizamiento utilizaron ácido giberélico (AG_3), 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA), AIB como reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones, de igual forma las sales Murashige y Skoog (MS) (1962) y gelificantes.

Así mismo, Copatti et al. (2016) utilizaron micro-esquejes de *S. betaceum* para su multiplicación, con el fin de obtener brotes y raíces mediante la aplicación combinada del ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0 y 0.1 mg/L y BAP de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L, estos reguladores de crecimiento fueron aplicados en medio de cultivo MS.

Por otra parte Criollo et al. (2016) regeneraron *S. betaceum* a partir de hipocotilos utilizando un medio basal MS suplementado con 3% de sacarosa, 0.5 mg/L de AG_3 , auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) en diferentes dosis, combinadas con 1.0 mg/L y 3.0 mg/L de BAP, de igual manera Villa et al. (2014) mencionan concentraciones entre 1 mg/L a 4.0 mg/L de auxinas (ANA, IBA) y 2 a 3 mg/L de BAP en medio de cultivo MS para la obtener brotes a partir de entrenudos y yemas laterales.

Por tal motivo en la actualidad el uso del cultivo de tejidos vegetales forma parte de los países en desarrollo debido a que genera la propagación masiva y en corto tiempo de variedades sobresalientes, eliminación de patógenos, manipulación genética y conservación de germoplasma (Sharry et al., 2020).

3.4.1. Tipos de cultivo *in vitro*

De acuerdo a Castillo (2013) existen diferentes métodos para realizar la propagación vegetativa *in vitro* o denominada micropropagación, por lo cual menciona que se puede realizar a partir de la multiplicación de yemas existentes o por la formación de brotes adventicios y embriones somáticos adventicios mediante:

- a) cultivo de células desorganizadas
- b) cultivo de origen unicelular
- c) cultivo de órganos

De tal manera que dentro del cultivo de órganos George et al. (2008) menciona la siguiente clasificación:

- Cultivo de meristemas
- Cultivo de yemas
- Cultivo de segmentos nodales
- Cultivo de embriones
- Cultivo de raíces aisladas

De la anterior clasificación este estudio se concentra en el cultivo de segmentos nodales o micro-esquejes.

3.4.2. Cultivo de segmentos nodales o micro-esquejes

El cultivo de micro-esquejes es una de las técnicas *in vitro* que permiten propagar diferentes especies de plantas a partir de yemas axilares que se encuentran en un trozo de brote (explante) (George et al., 2008), es decir un micro-esqueje es una porción vegetal que contienen un meristemo preexistente (yema axilar) el cual permite la formación de un tallo con hojas a partir de alguna estimulación sobre un medio de cultivo nutritivo (Ramírez et al., 2009) como se muestra en la figura 1.

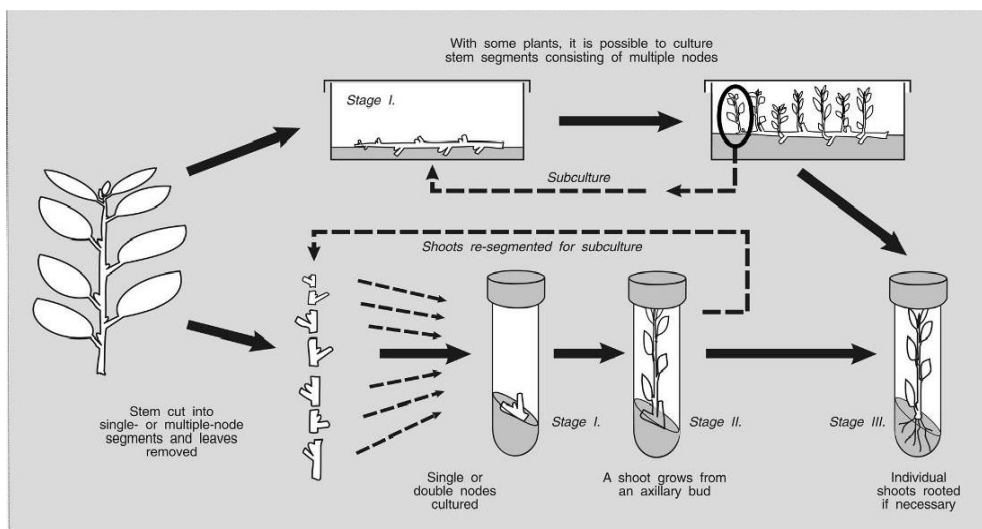


Figura 1. Cultivo de micro-esqueje individual y múltiple.

Fuente: George et al. (2008)

Así mismo es una técnica sencilla, con varias ventajas, entre ellas se menciona que no permite mutaciones (Ramírez et al., 2009), permite obtener una producción de calidad y rendimiento uniforme, favorece una producción rápida (Morales et al., 2016), además es esencial para conservar la genética de una especie y permite el desarrollo de plantas libres de patógenos que son transmitidos mediante los métodos tradicionales de propagación (Miranda, 2014).

De acuerdo a estudios realizados con micro-esquejes de tomate de árbol Villa et al. (2014) mencionan que el explante adecuado para la generación de nuevos brotes y enraizamiento *in*

in vitro en micro-esquejes de la especie en estudio es el extraído de plantas jóvenes y nudos bien desarrollados debido a que responde de manera óptima.

Así mismo, Tonietto et al. (2001) acotan que el tamaño del micro-esqueje varía desde milímetros a centímetros, de acuerdo al interés de estudio, al mismo tiempo Chacón et al. (2014) sugieren utilizar micro-esquejes de 2 a 4 cm de longitud que contienen una o dos yemas axilares visibles, también Pereira et al. (2014) propone una longitud de 1 cm para el explante e inocular en posición vertical que permita la regeneración de una planta completa.

3.4.3. Fases o etapas del cultivo de tejidos *in vitro*

Al paso del tiempo las etapas del cultivo de tejidos *in vitro* han permitido favorecer el manejo de la planta madre, las características del explante utilizado, las condiciones ambientales al interior del envase y el trasplante (Castillo, 2013).

3.4.3.1. Etapa de selección y preparación del material vegetal

En esta etapa se recomienda seleccionar material vegetal sano para determinar el éxito de la propagación del genotipo, así mismo es necesario tomar en cuenta la edad fisiológica del explante ya que las yemas axilares o meristemas apicales de plantas jóvenes tienen mejor respuesta que los provenientes de plantas maduras (Castillo, 2013).

También se debe recolectar el material vegetal en épocas secas para prevenir contaminación, así como el tamaño del explante para la supervivencia y regeneración además de la baja contaminación en explantes pequeños.

3.4.3.2. Etapa de establecimiento *in vitro*

Se realiza el cultivo *in vitro* de explantes en un medio de cultivo nutritivo para su desarrollo sin la presencia de microorganismos que perjudiquen al explante, por lo cual se emplean agentes esterilizantes, además al momento de realizar el corte al explante se liberan fenoles por lo cual se adiciona al medio antioxidantes o carbón activo para evitar el cambio de coloración (Castillo, 2013).

3.4.4. Problemas en el cultivo de tejidos *in vitro*

En el cultivo de tejidos *in vitro* se pueden presentar algunos problemas dependiendo la variedad o especie que se manipule, así también la procedencia de la planta madre en donde se encuentran fuentes de contaminación al interior o superficie del explante, además de microorganismos que se encuentran en el aire (Aguirre et al., 2016).

Uno de los problemas es la oxidación del tejido vegetal generando daño e inhibición del crecimiento, necrosis y posterior muerte del tejido debido a la estimulación de los compuestos fenólicos de las células cultivadas (Sharry et al., 2020).

De igual manera Sharry et al. (2020) acota que la falta de respuesta del cultivo es otro inconveniente debido a factores como: la pérdida e inactivación de la morfogénesis por mecanismos que regulan la información genética a causa de los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para la diferenciación, por otra parte las condiciones de luz, temperatura, humedad y fase gaseosa bajo las cuales se desarrolla el cultivo.

Así mismo Suárez (2020) menciona que se presentan otro tipo de problemas al aplicar el cultivo de tejidos *in vitro*, lo cual ocasiona resultados desfavorables en la práctica al momento de replicar protocolos mencionados en la literatura debido al equipamiento, áreas del laboratorio, tipos de envases, método de preparación de medios de cultivo, entre otros aspectos.

3.4.5. Condiciones ambientales de cultivo y asepsia

Las condiciones de asepsia para establecer un cultivo de tejidos *in vitro* son de importancia para generar un ambiente inocuo necesario para el desarrollo de los explantes con el control de la temperatura, fotoperiodo, humedad atmosférica e intensidad lumínica (Sharry et al., 2020).

Sharry et al. (2020) menciona que estas condiciones se llevan a cabo mediante el uso de cuartos acondicionados a una temperatura constante de 25 a 28 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, el flujo de aire debe ser constante y uniforme, irradiación de lámparas fluorescentes entre 50 y 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, lámparas incandescentes de 1000 y 4000 lux de iluminación y la humedad atmosférica entre 80 y 90%.

Para garantizar un ambiente de esterilidad y asepsia en el cultivo *in vitro* se debe lavar el material vegetal de inicio con detergente y separar de residuos de tierra con el fin de reducir posibles fuentes de contaminación (Sharry et al., 2020), así también se debe emplear materiales y equipos esterilizados mediante el uso de calor seco o húmedo, además de la previa desinfección de la cámara de flujo laminar con etanol al 70 % y el ingreso de materiales y envases al interior del aire estéril (Aguirre et al., 2016).

3.5. Medio de cultivo

El medio de cultivo es fundamental para el desarrollo del cultivo *in vitro* y está conformado por agua, una fuente de carbono, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, azúcares, agentes gelificantes, hormonas y reguladores del crecimiento (Sharry et al., 2020).

La composición del medio de cultivo depende de las necesidades de cada especie, sin embargo se puede utilizar un medio basal o Murashige & Skoog (MS) ya que es el más utilizado para la regeneración de plantas (Aguirre et al., 2016).

3.5.1. Composición del medio de cultivo

Es un factor importante debido a que estimula la diferenciación y el crecimiento de tejidos vegetales para lograr una respuesta morfológica deseada, dichos componentes se detallan a continuación:

3.5.1.1. Macroelementos

Son esenciales para el crecimiento del tejido vegetal por la intervención en la conservación del equilibrio iónico en las plantas (Aguirre et al., 2016), estos elementos son el fósforo necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, el nitrógeno forma parte de la célula, potasio, calcio, magnesio y azufre (Sharry et al., 2020).

3.5.1.2. Microelementos

Son necesarios en pequeñas cantidades para una adecuada actividad metabólica de las células y para el funcionamiento de enzimas (Sharry et al., 2020), entre los microelementos se encuentra el hierro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno, de los cuatro últimos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de cloroplastos (Suárez, 2020).

3.5.1.3. Vitaminas

Son requeridas en pequeñas cantidades, las cuales son utilizadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y estimulan procesos de crecimiento específicos en el tejido (Aguirre et al., 2016), entre las esenciales se encuentra la tiamina, misma que es imprescindible para el crecimiento de las células vegetales, el myo-inositol estimula el crecimiento y la división celular (Suárez, 2020), el ácido nicotínico, la piridoxina interviene en las reacciones de energía por lo cual estimula el crecimiento vegetal (Sharry et al., 2020).

3.5.1.4. Reguladores de crecimiento

Son compuestos sintéticos que se aplican al medio de cultivo en pequeñas concentraciones para estimular el crecimiento y desarrollo del explante (Suárez, 2020). Los reguladores de crecimiento se dividen en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno.

3.5.1.4.1. Auxinas

Se transportan polarmente a través del floema desde los ápices, por lo cual estimulan el agrandamiento y alargamiento celular, además promueven la división celular con la adición de citoquininas para dar origen al primordio de raíz lateral (Sharry et al., 2020). Así también controlan la velocidad y elongación celular en tallos jóvenes, incrementan la extensibilidad de la pared celular, son responsables del fototropismo y gravitropismo positivo de las raíces (Aguirre et al., 2016).

Suárez (2020) menciona que las auxinas más usadas en el cultivo de tejidos son el ácido indolbutírico (IBA) y el Ácido naftalenacético (ANA).

a. *Ácido naftalenacético (ANA)*

Es una auxina esencial para el enraizamiento de micro-esquejes en concentraciones adecuadas debido a que en exceso puede provocar daño en las células (Hernández et al., 2004), lo cual se lleva a cabo mediante experimentos dosis/respuesta (Sharry et al., 2020).

3.5.1.4.2. Citoquininas

Estimulan la división celular en los tejidos vegetales, aumentan el vigor de la planta y la tasa fotosintética y son sintetizadas en las zonas meristemáticas de las raíces y en los órganos aéreos desde donde son transportadas a las yemas apicales y axilares (Suárez, 2020). Además estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo el apical, por lo que se recomienda mantener un equilibrio con las auxinas para favorecer el desarrollo de yemas axilares, así también estimulan la formación de raíces y tallos en combinación con las auxinas (Aguirre et al., 2016).

Suárez (2020) menciona que la citoquinina más utilizada en el cultivo in vitro es la bencilaminopurina (BAP), especialmente para la multiplicación de meristemas preexistentes y organogénesis.

a. *Bencilaminopurina*

Favorece el desarrollo de nuevas hojas y yemas axilares permitiendo la multiplicación vegetativa (Llorente, 2002) en concentraciones de 0.01 a 1 mg/L (Sharry et al., 2020).

3.5.1.5. Agentes gelatinizantes

El agar-agar es el agente solidificante más utilizado, proviene de algas rojas, se solubiliza en agua hirviendo (100 °C) y se solidifica a 45 °C (Sharry et al., 2020). También forma geles transparentes que no reaccionan con los componentes del medio de cultivo y la concentración recomendada es de 8 g/L con la finalidad de sostener al explante y permitir el flujo de nutrientes del medio hacia los tejidos (Suárez, 2020).

Materiales y métodos

4.1. Ubicación del lugar de la investigación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el Campus Yanuncay de la Universidad de Cuenca, el mismo que cuenta con equipos necesarios para realizar la investigación, ubicado en la provincia del Azuay, cantón Cuenca a una altitud de 2567 m.s.n.m. y coordenadas 2°55'13.2" S 79°01'31.6" O. El laboratorio cuenta con una temperatura de 20 °C y humedad de 50%.

4.2. Materiales

4.2.1. Material vegetal

El material vegetal se obtuvo en un vivero ubicado en la parroquia San Joaquín, cantón Cuenca, provincia del Azuay, consistió en seleccionar 18 plántulas de tres meses de edad con una altura de 17 centímetros que presenten características morfológicas adecuadas como: vigorosidad, sin presencia de patógenos y uniformidad.

4.2.2. Materiales físicos

- Etiquetas
- Libreta de campo
- Fundas plásticas

4.2.3. Materiales químicos

- Ácido clorhídrico (HCl 0.5N)
- Detergente
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Hidróxido de sodio (NaOH 0.1N)
- Agar
- Propamocarb 40%
- Agua destilada
- Sacarosa
- Alcohol 70% y 90%
- Sales Phytamax
- Bencilamino purina (BAP)

4.2.4. Materiales de laboratorio

- Bisturíes
- Mecheros
- Cajas Petri
- Papel aluminio
- Cepillo de cerdas suaves
- Papel film
- Cofia
- Pinzas
- Cubre boca
- Pipetas
- Frascos ámbar
- Probetas
- Gradillas
- Puntas para micropipeta
- Guantes
- Tubos de ensayo
- Mandil
- Varillas
- Mango de bisturí largo (hoja #11)
- Vasos de precipitación

- Matraz de Erlenmeyer

4.2.5. Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cocineta
- Conductímetro
- Micropipeta
- pH metro
- Plancha agitadora
- Refrigeradora

4.3. Métodos

4.3.1. **Metodología para el objetivo específico uno:** Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de ANA y BAP en el desarrollo de micro-esquejes *in vitro*.

Para llevar a cabo el objetivo se realizó diferentes protocolos metodológicos descritos por Sharry et al. (2020) que se detallan a continuación:

4.3.1.1. Protocolo de desinfección de materiales y equipos

Se utilizó alcohol al 90% para desinfectar las paredes de la cámara de flujo laminar y el área de trabajo para prevenir contaminantes en el proceso de cultivo *in vitro*, así también para la desinfección de tubos se realizó un lavado con detergente y luego se colocó en un recipiente de tapa con cloro al 5% durante 24 horas, después se realizó el secado y colocación en las gradillas para el etiquetado correspondiente a cada tratamiento.

La vidriería se lavó con detergente para retirar cualquier residuo contenido en los mismos, luego se procedió a secar y para el ingreso a la cámara de flujo laminar de las cajas Petri al igual que otros materiales, se aplicó alcohol al 70%, después se realizó un flameado con alcohol 90% al interior de la cámara.

Para la desinfección de pinzas, mangos de bisturíes se utilizó el autoclave durante 40 minutos a 150 atmósferas, esto se colocó en conjunto con el medio de cultivo, después los bisturíes fueron expuestos al rojo vivo para evitar el paso de algún contaminante a los explantes.

4.3.1.2. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó la formulación de sales Phytamax al 75% con macronutrientes, micronutrientes y vitaminas conformado por 0.75 mg/L de tiamina, 0.375 mg/L de piridoxina, 0.375 mg/L de ácido nicotínico, 0.75 mg/L de myo-inositol, 7 g/L de agar y 30 g de sacarosa con la adición

del regulador de crecimiento vegetal ANA y BAP a diferentes concentraciones (0.13, 0.25, 0.38, 0.50, 0.75 ppm).

La elaboración del medio de cultivo se realizó en diferentes fases, partiendo de la elaboración de soluciones madre de los micronutrientes, agrupados de acuerdo a la compatibilidad, disolución de macronutrientes y vitaminas. De tal manera se procedió a pesar los compuestos que se detalla en la Tabla 1 y disolver en agua destilada, se preparó 1000 ml de solución concentrada de sulfato de: manganeso (SO_4Mn) y sulfato de zinc (SO_4Zn); yoduro de potasio (IK); ácido bórico (Bo_4H_3) y molibdato de sodio (MoO_4Na), pertenecientes a micronutrientes del grupo 1. De la misma manera se procedió a realizar una solución de micronutrientes del grupo 2: sulfato cúprico (SO_4Cu) y clorhidrato de cobalto (ClCo) y con los compuestos de hierro que constan sulfato ferroso (SO_4Fe) y EDTA, seguidamente se conservó en refrigeración hasta su uso.

Tabla 1. Compuestos de micronutrientes y hierro.

Grupos	Sales	100%	75%
		mg/L	mg/L
Micronutrientes Grupo 1	Sulfato de manganeso	8.45	6.3375
	Sulfato de zinc	5.3	3.975
	Yoduro de potasio	0.415	0.31125
	Ácido bórico	3.1	2.325
	Molibdato de sodio	0.125	0.09375
Micronutrientes Grupo 2	Sulfato cúprico	0.0125	0.009375
	Clorhidrato de cobalto	0.0125	0.009375

Hierro	Sulfato ferroso	27.85	20.8875
	EDTA	37.24	27.93

Después se realizó la disolución de los macronutrientes en forma individual, partiendo de nitratos, fosfatos y cloruros que se detallan en la tabla 2, cada uno disuelto en 20 ml de agua destilada, estas diluciones se colocó en una probeta de 1000 ml, después se añadió el volumen de la alícuota de las soluciones de micronutrientes refrigerados partiendo con 5 ml de SO_4Mn y SO_4Zn , 2 ml de IK, 0.5 ml de Bo_4H_3 y MoO_4Na , 0.5 ml de SO_4Cu y ClCo . De la misma manera se procedió a extraer 10 ml de la solución SO_4Fe y EDTA.

Así mismo, las vitaminas fueron disueltas en 20 ml de agua destilada cada una (Tabla 2), posterior a ello se colocó en la probeta, luego se disolvió los 10 g/L de sacarosa y se procedió a aforar a 1000 ml con agua destilada. Después se realizó la homogenización de la mezcla, se fraccionó en 9 matraces Erlenmeyer para proceder a colocar las concentraciones de ANA y BAP. Por último se colocó etiquetas de diferente color para diferenciar los tratamientos.

Tabla 2. Compuestos de macronutrientes y vitaminas del medio de cultivo Phytamax.

Grupos	Sales	100%	75%
		mg/L	mg/L
Macronutrientes Grupo 1	Nitrato de amonio	825	618.75
	Nitrato de potasio	950	712.5
	Clorhidrato de calcio	166	124.5
	Fosfato de potasio monobásico	85	63.75
Macronutrientes Grupo 2	Sulfato de magnesio	90.35	67.7625

Vitaminas	Tiamina	1	0.75
	Piridoxina	0.5	0.375
	Ácido nicotínico	0.5	0.375
	Myo-inositol	100	100

Para los reguladores de crecimiento se elaboró soluciones stock de ANA al 0.5 mg/L y BAP a 0.5 mg/L en un volumen de 10 ml y 25 ml respectivamente, a partir de las cuales se determinó el volumen de alícuota para cada concentración. Por consiguiente para la distribución de los tratamientos se partió de las concentraciones recomendadas por Chacón et al. (2014) y Criollo et al. (2016), que corresponden a ANA 0.5 ppm y BAP 0.25 ppm respectivamente. A partir de estas concentraciones se establecieron cuatro concentraciones por regulador de crecimiento, donde se colocó el 50% más y el 50% menos de la concentración recomendada por Chacón et al. (2014) y Criollo et al. (2016).

Es decir, las concentraciones empleadas para ANA son 0, 0.25, 0.5, 0.75 ppm y las concentraciones de BAP son 0, 0.13, 0.25 y 0.38 ppm, a partir de las cuales se establecieron los tratamientos para llevar a cabo la investigación.

Se planteó 9 tratamientos con 5 repeticiones, cada tratamiento compuesto por 5 unidades experimentales. Cada unidad experimental consta de un micro-esqueje. El tratamiento 1 (T1) es el testigo, el cual está exento de ANA y BAP, los tratamientos 2 (T2) y 3 (T3) contienen las concentraciones recomendadas por Chacón et al. (2014) y Criollo et al. (2016), mientras que los tratamientos 4 (T4), 5 (T5), 6 (T6), 7 (T7), 8 (T8) y 9 (T9) muestran las concentraciones combinadas (ANA+BAP) a probar en la investigación. Los tratamientos se detallan en la Tabla 3. Se utilizaron 45 micro-esquejes en la investigación.

Tabla 3. Tratamientos para la determinación de concentraciones de ANA y BAP para propagación *in vitro* de micro-esquejes de tomate de árbol (*Solanum betaceum*).

Tratamientos	ANA (ppm)	BAP (ppm)
T1	0	0
T2	0	0.25

T3	0.5	0
T4	0.25	0.13
T5	0.5	0.25
T6	0.75	0.38
T7	0.13	0.25
T8	0.25	0.5
T9	0.38	0.75

Posteriormente se midió el pH y la conductividad eléctrica (CE), esto es indispensable para la solubilidad de sales, asimilación de los reguladores de crecimiento y la dureza del medio lo cual favorece el desarrollo del explante (Suárez, 2020). El pH se estabilizó a 5.55 con HCl y la CE en 2.24 mS/cm, luego se añadió el agar a la mezcla de cada tratamiento para obtener las sales Phytamax. Por consiguiente se colocó 10 ml de medio Phytamax en cada tubo de ensayo, posteriormente se colocó una tapa de papel aluminio y papel film en cada tubo, para luego ser colocados en fundas plásticas y llevados al autoclave durante 45 minutos a 150 atm y una temperatura de 121°C.

Por último, los tubos estériles antes de que solidifiquen se colocaron al interior de la cámara de flujo laminar de manera inclinada para formar un estilo flauta y facilitar la inoculación del micro-esqueje.

4.3.1.3. Recolección del material vegetal

Se seleccionó el material vegetal que visualmente presentaba mejor apariencia, vigorosidad, ausencia de plagas y enfermedades. La longitud de las plántulas fue 17 centímetros (Figura 2) tomada desde la base del tallo hasta el ápice y con una edad aproximada de tres meses desde la germinación, con la finalidad de uniformizarlas.



Figura 2. Longitud de plántula para realizar la extracción de micro-esquejes.

El material vegetativo seleccionado fue llevado al laboratorio para su posterior desinfección, cabe mencionar que la plántula contiene siete yemas, a partir de la cual se extraerán micro-esquejes de aproximadamente un centímetro (Figura 3), en donde se encontrará una yema axilar visible para la posterior inoculación *in vitro*.



Figura 3. Longitud del micro-esqueje.

4.3.1.4. Protocolo de desinfección del material vegetal

Para la desinfección del material vegetal se procedió según el protocolo sugerido por Chacón et al. (2014), en donde cada plántula se retiró del sustrato y se lavó con agua de chorro para retirar residuos, después se retiró las hojas dejando un pequeño segmento de peciolo para evitar daños en la yema durante el proceso de desinfección. A continuación se realizó un lavado con 10 ml/L de detergente durante 5 minutos y un enjuague con agua destilada.

Luego se sometió a una inmersión de 2 minutos en una solución de 10 ml/L de un biodesinfectante (Kilol) en 1 L de agua, se realizó un enjuague con agua destilada para seguidamente sumergir en una solución fungicida (Preferred) de 1 cm³/L durante 2 minutos y después se enjuagó con agua destilada al interior de la cámara de flujo laminar.

Posteriormente se retiró la raíz mediante un corte preciso con el bisturí estéril y se colocó el tallo sobre una caja Petri esterilizada, a partir del cual se extrajeron los micro-esquejes para la respectiva inoculación.

4.3.1.5. Protocolo de siembra de los micro-esquejes

Después de la desinfección las plántulas fueron llevadas a la cámara de flujo laminar en donde se extrajo la raíz y se procedió a realizar cortes precisos para obtener los micro-esquejes de aproximadamente 1 cm (Figura 4) de acuerdo a lo recomendado por Rieche & Sigarroa (2011) y Zurita et al. (2014) debido a que facilita la regeneración de órganos. Para prevenir contaminación cruzada entre cada explante se expuso al bisturí al rojo vivo y para cada planta se utilizó una caja Petri previamente flameada con alcohol 96%.



Figura 4. Micro-esqueje de tomate de árbol.

Luego de la extracción los micro-esquejes, seguidamente se sujetó el tubo con medio de cultivo con la mano izquierda, se flameó al retirar la tapa, y con la pinza en la mano derecha se sujetó al micro-esqueje para ser inoculado en el centro del tubo con medio Phytamax 75%, por consiguiente, se realizó el flameado del tubo y la tapa, se procedió a sellar con papel film y colocar en la gradilla para su posterior ubicación en el cuarto de crecimiento.

Los nueve tratamientos fueron colocados en un cuarto adecuado para el crecimiento de los explantes, el área cuenta con una temperatura que oscila entre 20 a 25 °C, humedad 50-60%, después los micro-esquejes se ubicaron en una percha para ser expuestos a un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 de oscuridad total, a partir de lo cual se procedió a tomar los datos diariamente durante 90 días, mediante visualizaciones y con el uso del estéreomicroscopio.

Después los datos tomados diariamente de cada micro-esqueje fueron ingresados a una base de datos que contiene los días y el código de las variables para un mejor análisis, en donde el 1 corresponde a sin cambios, el 2 yema hinchada, 3 explosión de yema, 4 micro-esqueje hinchado, 5 hojas, 6 raíz y 7 micro-esqueje muerto.

4.3.2. **Metodología para el objetivo específico dos:** Medir el efecto de ANA y BAP en el crecimiento aéreo y radicular de micro-esquejes de *Solanum betaceum* Cav.

Para realizar el análisis de los datos y cumplir con este objetivo se parte de la metodología del objetivo uno, en donde se observó los micro-esquejes de cada tratamiento desde el día uno después de la siembra hasta el día 90. Aquí, se consideraron las variables de respuesta a partir del desarrollo morfológico de los micro-esquejes a la longitud del brote y de raíces, el número de hojas por brote y la biomasa tanto de la parte aérea (brote) como radicular, ya que en un estudio de Calva & Pérez (2005) mencionan que tanto el crecimiento radicular como aéreo del micro-esqueje favorece un desenvolvimiento rápido en la transferencia a invernadero.

Para evaluar la longitud del brote se midió la altura de cada vitro planta desde la base del brote hacia el ápice (Figura 5) y la variable longitud de la raíz se consideró desde la base del brote hasta el ápice radicular, dichas longitudes fueron tomadas con regla a través de un estereomicroscopio y se determinó la altura promedio expresada en milímetros (mm).

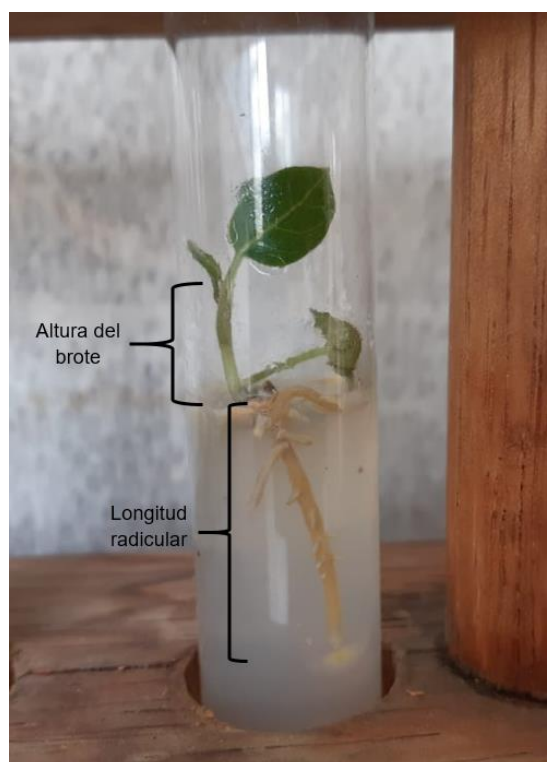


Figura 5. Descripción de las variables longitud de brote y raíz en tomate de árbol.

También se registró el número de hojas por brote de cada tratamiento mediante la estimación visual. Después se realizó el cálculo de la biomasa aérea considerada desde la base del brote hacia el ápice, a través de una balanza expresada en miligramos (mg), así mismo se planteó cuantificar la biomasa radicular extraída desde el cuello de la raíz. Se efectuó el test de

Shapiro-Wilk para examinar la presencia o ausencia de normalidad en los datos obtenidos de las variables que fueron evaluadas.

4.3.3. Diseño experimental

En esta investigación se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), donde se evaluó cuatro concentraciones de auxina (ANA) y citoquinina (BAP). Se utilizó un tubo de ensayo de 2 cm de diámetro y 15 cm de alto, cada tubo contiene 10 ml de medio de cultivo Phytamax 75% y un explante proveniente de segmentos de tallo. Estos explantes provienen de plantas jóvenes que incluyen una yema axilar, por lo cual se tuvo un total de 45 tubos de ensayo que contienen un micro-esqueje. En la tabla 4 se observa la aleatorización de los tratamientos con las 5 repeticiones respectivas y por ende la ubicación en el cuarto de crecimiento.

Tabla 4. Aleatorización de tratamientos.

Tratamientos	ANA (ppm)	BAP (ppm)
T5R5	0.5	0.25
T4R2	0.25	0.13
T2R1	0	0.25
T8R5	0.25	0.5
T9R3	0.38	0.75
T3R3	0.5	0
T9R1	0.38	0.75
T1R3	0	0
T5R3	0.5	0.25
T6R2	0.75	0.38
T5R4	0.5	0.25
T9R4	0.38	0.75
T4R5	0.25	0.13
T2R2	0	0.25
T5R1	0.5	0.25
T7R4	0.13	0.25
T3R2	0.5	0
T7R3	0.13	0.25
T8R4	0.25	0.5
T1R5	0	0
T6R5	0.75	0.38
T3R5	0.5	0

T4R3	0.25	0.13
T9R2	0.38	0.75
T2R3	0	0.25
T8R2	0.25	0.5
T4R1	0.25	0.13
T1R4	0	0
T1R2	0	0
T5R2	0.5	0.25
T4R4	0.25	0.13
T3R1	0.5	0
T7R1	0.13	0.25
T7R5	0.13	0.25
T2R4	0	0.25
T6R4	0.75	0.38
T6R3	0.75	0.38
T3R4	0.5	0
T8R1	0.25	0.5
T8R3	0.25	0.5
T6R1	0.75	0.38
T7R2	0.13	0.25
T2R5	0	0.25
T1R1	0	0
T9R5	0.38	0.75

4.3.4. Análisis estadístico

Para cada variable se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar si existe la presencia o ausencia de normalidad y pruebas de uniformidad de varianzas mediante test de Levene. Los datos de las variables longitud de brotes y número de hojas, fueron analizados en el software Excel, mientras que para las variables longitud de raíz, biomasa radicular y biomasa aérea no se realizó ningún análisis por la falta de respuesta de los micro-esquejes. Al no cumplir las variables con los supuestos de normalidad y uniformidad de varianzas se realizó estadística descriptiva con las variables longitud de brote y número de hojas.

Resultados y discusión

En la presente investigación se evaluaron diferentes variables con la finalidad de responder los distintos objetivos. Se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para determinar si los datos se ajustan a una curva normal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Prueba de normalidad y homocedasticidad para las variables longitud de brote y número de hojas.

Variable	n	Normalidad (p>0.05)	Homocedasticidad (p>0.05)
Longitud de brote	5	4.08e-14	0.02299
Número de hojas	5	3.728e-14	0.03646

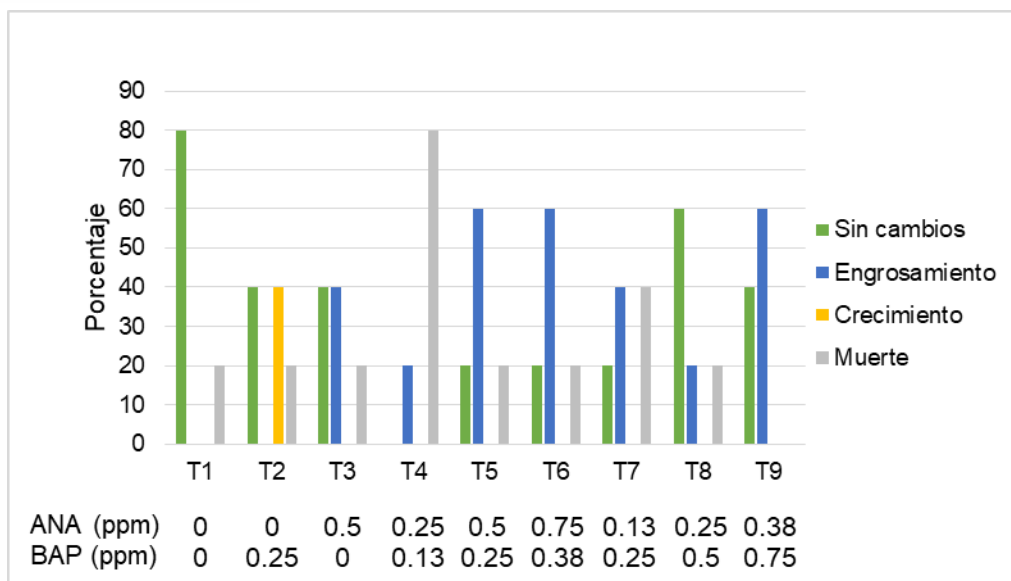
n=tamaño de la muestra

En la tabla se observa el valor de p para normalidad y homocedasticidad de varianzas, los resultados obtenidos en las variables longitud de brote y número de hojas no tienen normalidad por el valor superior a 0.05 de p. A partir de lo cual se realizó estadística descriptiva con los resultados obtenidos en las variables longitud de brote (mm) y número de hojas.

5.1. Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de Ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo de micro-esquejes *in vitro*

En respuesta al objetivo uno se tomó en cuenta aspectos cualitativos del micro-esqueje como sin cambios, crecimiento, engrosamiento y muerte, expresadas en porcentaje. Se evaluó el comportamiento en los nueve tratamientos con diferentes concentraciones de ANA y BAP, T1= 0 ppm ANA+0 ppm BAP, T2= 0 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T3= 0.5 ppm ANA+0 ppm BAP, T4= 0.25 ppm ANA+0.13 ppm BAP, T5= 0.5 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T6= 0.75 ppm ANA+0.38 ppm BAP, T7= 0.13 ppm ANA+0.25 ppm BAP, T8= 0.25 ppm ANA+0.5 ppm BAP y T9= 0.38 ppm ANA+0.75 ppm BAP, en un período de 15 días durante 90 días de evaluación, esto se puede evidenciar en el Gráfico 1.

Gráfico 1. Comportamiento de los micro-esquejes de *Solanum betaceum* en los nueve tratamientos que contienen ANA y BAP.



En el gráfico 1 se indica que el T1 (control) no generó cambios en el micro-esqueje (Figura 6A) con un porcentaje de 80%, seguido del T8 con un 60%, mientras que en el T2, T3 y T9 se muestra un 40% de micro-esquejes sin cambios, y en menor porcentaje de esta cualidad se encuentra en los tratamientos T5, T6 y T7 con un 20% de explantes, resultado que no es favorable para el desarrollo de micro-esquejes, debido a que los reguladores de crecimiento en cultivos *in vitro* estimulan la formación de órganos, alargamiento y división celular (Espinosa et al., 2005), ya sea de forma individual o combinada, siendo esta de manera equilibrada porque en exceso puede inhibir el crecimiento y división celular (Chacón et al., 2014).

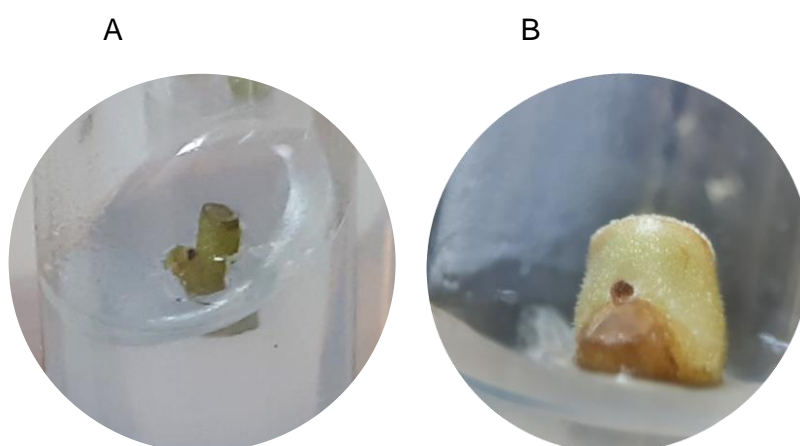


Figura 6. Características del micro-esqueje. A. Sin cambios. B. Engrosamiento.

Para el aspecto cualitativo engrosamiento del micro-esqueje (Figura 6B), hubo mayor presencia en los tratamientos T5, T6 y T9 con un 60% de micro-esquejes engrosados a los quince días después de la siembra, seguidos de T3 y T7 con el 40% de engrosamiento, el T4 y T8 con el 20%, mientras que el tratamiento control y el T2 no presentan engrosamiento en

los micro-esquejes. Sin embargo, en el T2 se manifestó un 40% de crecimiento del micro-esqueje. Esto se debe a que los reguladores de crecimiento influyen de diferentes maneras en la regeneración *in vitro*, así como entre especies por la capacidad de producir sustancias de crecimiento endógenas (Kahia et al., 2015). De tal manera, Cárdenas (2016) menciona que las auxinas y citoquininas favorecen la formación de callo y el desarrollo de procesos organogénicos al promover procesos de división celular y activación enzimática, así mismo, Aguirre et al. (2016) acota que al no existir un equilibrio entre ANA y BAP se inhibe el crecimiento de yemas. Además Sanchez (2018) en una investigación realizada en segmentos nodales del genotipo *Rupestris* du Lot obtuvo engrosamiento y deformaciones basales en altas concentraciones de auxina (0.5 mg/L IBA), lo cual generó inconveniente en la absorción de nutrientes por el micro-esqueje. Este estudio se relaciona con los resultados obtenidos en los T5 y T6, que contienen concentraciones de 0.5 y 0.75 ppm de ANA.

También se consideró la muerte de los micro-esquejes en las diferentes concentraciones de ANA y BAP, manifestándose el mayor porcentaje de muerte (80%) en el T4 (0.25 ppm ANA+0.13 ppm BAP), seguido de T7 (0.13 ppm ANA+0.25 ppm BAP) con el 40% de micro-esquejes muertos, mientras que en menor porcentaje se evidenció en el T1 (0 ppm ANA+0 ppm BAP), T2 (0 ppm ANA+0.25 ppm BAP), T3 (0.5 ppm ANA+0 ppm BAP), T5 (0.5 ppm ANA+0.25 ppm BAP), T6 (0.75 ppm ANA+0.38 ppm BAP) y T8 (0.25 ppm ANA+0.5 ppm BAP), con un 20%. Chacón et al. (2014) y Sharry et al. (2020) mencionan que la degradación de los micro-esquejes se debería a la activación de compuestos fenólicos de las células por el uso de desinfectantes químicos al momento de eliminar contaminantes microbiológicos en el proceso de preparación del explante. Así también, Aguirre et al. (2016) manifiesta que al momento de realizar el corte para la extracción del explante se da un daño en el tejido lo cual conlleva a la oxidación de compuestos fenólicos liberados por las células dañadas.

Espinosa et al. (2005) en un estudio realizado para la multiplicación de micro-esquejes de tomate de árbol partenocárpico, evidenció un porcentaje de degeneración del 37% de explantes, entre los cuales consideró la contaminación bacteriana, fúngica y la oxidación fenólica. Así también, Jacinto, (2018) obtuvo el 31.11% de muerte en vitroplantas debido al daño celular al extraer los explantes en *Rosa sp.* var. Freedom. Esto se refleja con el porcentaje de degradación (20%) obtenido en la mayor parte de tratamientos de esta investigación.

La respuesta del material vegetal es diversa frente al estímulo de los reguladores de crecimiento, debido a que cada especie y órganos tienen diferentes habilidades para reconocer, absorber, transportar y metabolizar sustancias de crecimiento endógenas (Kahia et al., 2015). También se ve influenciada por la edad del explante, la concentración de los

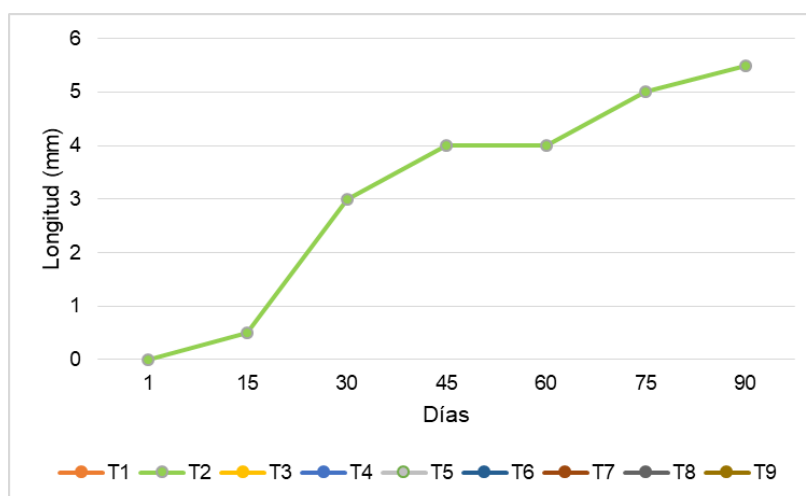
reguladores de crecimiento, el tamaño de inoculación (Chacón et al., 2014). En esta investigación, los explantes al provenir de plantas de madurez homogénea y de la misma variedad, se inocularon e incubaron en las mismas condiciones experimentales, lo cual se relaciona con los explantes de partida usados por Criollo et al. (2016), en la regeneración *in vitro* de tomate de árbol, mediante hipocotilos de plántulas de seis semanas. Así mismo, Kahia et al. (2015) usó hipocotilos, hojas y raíces de plantas de la misma especie germinadas *in vitro* durante dos meses. Por otra parte, Corredoira et al. (2011) emplearon mini estacas de brotes juveniles de *Alnus glutinosa*, esto debido a que la edad de la planta afecta la capacidad regenerativa de la misma, ya que mientras más se acerca al estado adulto esta capacidad disminuye o se pierde.

5.2. Medir el efecto de ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en el crecimiento aéreo y radicular de micro-esquejes de *Solanum betaceum* Cav.

Para las variables dependientes longitud de brote y número de hojas se realizó las pruebas de normalidad y homocedasticidad de varianzas (Tabla 5). Mientras que para las variables longitud de raíz, biomasa del brote y radicular al no obtener respuesta de los reguladores de crecimiento no se realizó ningún análisis estadístico.

Para evaluar el efecto de ANA y BAP en el crecimiento aéreo de los micro-esquejes se aplicó estadística descriptiva mediante los promedios de los datos obtenidos durante 90 días. Se evaluó el comportamiento de la longitud expresada en milímetros a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días en los tratamientos que generaron datos de longitud, como se muestra en el gráfico 2.

Gráfico 2. Efecto de ANA y BAP en el crecimiento de longitudinal (mm) de micro-esquejes de tomate de árbol.



En el gráfico 2 se observa que el tratamiento 2 (0 ppm ANA + 0.25 ppm BAP) presentó crecimiento longitudinal de 0.5 mm a los 15 días después de la siembra (Figura 7), el

crecimiento fue progresivo hasta el día 45 en donde se mantuvo hasta el día 60, después nuevamente incrementó la longitud (5.5 mm) hasta el día 90 que finalizó la toma de datos. Mientras que el tratamiento control y los siete tratamientos restantes no se evidenció diferenciación de la yema y crecimiento aéreo en los micro-esquejes. Resultados similares obtuvieron Chacón et al. (2014), luego de 45 días al aplicar 0.25 mg/L BAP en hipocotilos de tomate de árbol suplementado a un medio MS generó un promedio de 3.56 brotes, esto probablemente porque la citoquinina está asociada a la estimulación de yemas laterales mediante la activación enzimática y división celular que produce, sin embargo, Espinosa et al. (2005) han reportado que la combinación auxina/citoquinina favorece la brotación en tomate de árbol en concentraciones 0.19 y 0.17 mg/L respectivamente, lo cual se descarta en esta investigación ya que el T4, T5, T6, T7, T8 y T9 no generaron diferenciación de yema y posterior brotación. Por otro lado, Criollo et al. (2016) al aplicar ANA al medio de cultivo inhibió la formación de brotes de tomate árbol a partir de hipocotilos.

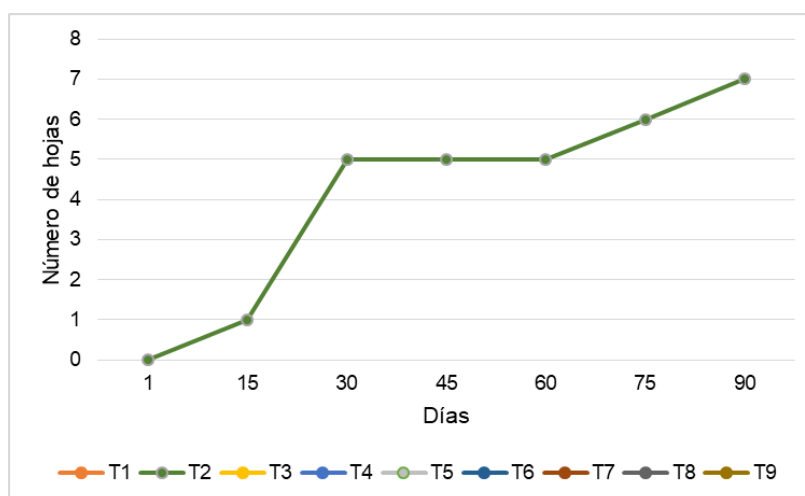


Figura 7. Brote a partir de un micro-esqueje

Además, se observó que los entrenudos se mantuvieron pequeños, esto se corrobora con Sigarroa & García (2011) debido a que se presentó un desarrollo en microestacas de *Rubus glaucus* Benth. variedad sin espinas pero no se produjo elongación al aplicar 1 mg/L de BAP. Por otra parte, Sharry et al. (2020), menciona que para el crecimiento de brotes es necesario la presencia de auxinas endógenas en el medio de cultivo debido a que en yemas menores a 0,4 mm no es suficiente la producción de auxinas obteniendo yemas poco desarrolladas, lo cual se evidenció en el T2 por el nulo contenido de ANA. Jacinto (2018) acota que al aplicar 0.1 mg ANA y 2.5 mg BAP se obtienen plantas de mayor altura (40 mm) debido a que la interacción entre auxina-citoquinina favorece el crecimiento de explante, al igual, Zurita et al. (2014), en yemas axilares de *Tilia mexicana* obtuvo una altura promedio 2.11 cm al aplicar 0.25 mg/L ANA combinada con 1 mg/L BAP.

Consecuentemente se evaluó la variable número de hojas hasta el día 90, se representó el comportamiento en un gráfico de líneas en períodos de 15 días, donde se observó que en el tratamiento 2 (0 ppm ANA + 0.25 ppm BAP) a los 15 días ya se presentó una hoja, 30 días después incrementó a 5 hojas, lo cual se mantuvo hasta el día 60. Posteriormente el número de hojas incrementó a 7 hojas por brote a los 90 días de evaluación. Sin embargo este proceso no tuvo efecto en los demás tratamientos.

Gráfico 3. Comportamiento de la variable número de hojas en micro-esquejes de tomate de árbol.



Copatti et al. (2016) en un estudio realizado en la propagación de tomate de árbol, al aplicar 1 mg/L de BAP obtuvieron el mayor número de hojas (10), sin la presencia de auxinas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la investigación, al aplicar 0.25 BAP generó un promedio de 7 hojas por micro-esqueje, sin embargo en el mismo estudio, se menciona que para obtener un mejor resultado para brotación se recomienda aplicar 0.75 mg/L BAP y 0.1 mg/L de ANA. Por el contrario, Criollo et al. (2016) cita que para generar una planta completa es necesario refrescar los explantes en medios libres de reguladores de crecimiento, ya que las citoquininas en altas concentraciones inhiben la formación de raíces. Por lo tanto, la presencia de los reguladores de crecimiento es un factor determinante para el crecimiento y desarrollo de explantes *in vitro*.

La variable longitud de raíz al no generar respuesta ante la presencia de ANA y BAP no se realizaron pruebas estadísticas, sin embargo, Arena et al. (1994) menciona que los brotes con entrenudos alargados y folíolos expandidos son características importantes para favorecer el enraizamiento, caso que no ocurrió con los brotes obtenidos en el T2 (Figura 8), ya que éstos tuvieron entrenudos cortos, los folíolos pequeños y en roseta, por lo cual se puede mencionar que inhibió o generó dificultad al proceso de enraizar. Esto consecuentemente no permitió obtener datos para realizar la variable biomasa.



Figura 8. Brote con hojas pequeñas y en roseta.

De acuerdo con Corredoira et al. (2011) el porcentaje de azúcar y las auxinas influyen en la obtención de raíces debido a que el explante requiere de abundante energía para activar la división mitótica y producir raíces, por lo cual recomienda añadir 30 g/L de sacarosa al medio de cultivo, esto concuerda con la cantidad de sacarosa añadida al medio de cultivo Phytamax 75%, sin embargo en esta investigación no se evidenció formación de raíces.

En este caso, no hubo una inferencia fiable de la respuesta a los diferentes tratamientos, por lo tanto, no se puede deducir una concentración óptima de los reguladores de crecimiento para obtener plántulas completas que permitan su transferencia a invernadero.

Conclusiones

Los micro-esquejes de tomate de árbol en concentraciones combinadas de ANA y BAP no favorecieron significativamente el crecimiento aéreo y radicular.

Los reguladores de crecimiento en los micro-esquejes causaron engrosamiento en la mayor parte de los explantes y en menor proporción la degradación.

El efecto de BAP únicamente se dio en la concentración de 0.25 ppm ya que permitió el crecimiento del brote y la formación de hojas en el micro-esqueje. Sin embargo, ninguna de las concentraciones de ANA y BAP formaron raíz, por lo que se abre la posibilidad a seguir explorando en la concentración óptima para generar plantas completas a partir de micro-esquejes de *Solanum betaceum*.

Recomendaciones

Para futuras investigaciones se recomienda seguir realizando experimentos con la concentración 0.25 ppm de BAP ya que permitió el desarrollo de brotes.

Propiciar las condiciones de laboratorio mencionadas en otros estudios para llevar a cabo investigaciones que requieren de factores ambientales controlados.

Para contrarrestar el efecto de oxidación se recomienda adicionar antioxidantes al medio de cultivo como el ácido ascórbico, ácido cítrico, carbón activado.

Se recomienda realizar un protocolo de desinfección para el material vegetal antes de llevar a cabo la propagación de explantes *in vitro*, para obtener una mejor respuesta de reguladores de crecimiento.

Referencias

- Abdelnour, A., & Vincent, J. (1994). Conceptos Basicos del cultivo de tejidos vegetales. In *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)*.
- Acosta, P. G., Riofrío, T., Rojas, J., Vilanova, S., Plazas, M., & Prohens, J. (2016). Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*, 199, 216–223.
- Aguirre, G., Baudoin, J. P., & Leigue, L. (2016). *Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos*. Universidad Mayor de San Simón.
- Arena, M. E., Caso, O. H., & Perelman, P. E. (1994). Enraizamiento *in vitro* de los portainjertos de ciruelo Mariana GF 8/1, Mirabolano B y San Julián GF 655/2. *Agriscientia*, 11, 61–67.
- Buono, S., Abdo, G., Hamity, V., Ansonaud, G., & Ferreyra, M. (2019). El tomate árbol de las yungas. Cultivo, potencialidades e importancia. *Rwanda*, 24, 58–66.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16.
- Cangás, C. (2019). “Eficacia de la aplicación de fitohormonas y fosfitos, en el cuajado, rendimiento y calidad del fruto, en el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav), Cantón Montúfar.” Universidad Politécnica Estatal de Carchi.
- Cárdenas, C. A. (2016). Propagación *in vitro* de *Solanum dolichosepalum* (Solanaceae). *Ciencia En Desarrollo*, 7(2), 9–22.
- Castillo, M. (2013). *Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés*. Universidad de Alicante.
- Chacón, R., Flores, D., Alvarado, L., Schmidt, A., & Alvarado, C. (2014). Cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(506), 45.
- Copatti, A., Loy, F., Cruz, J. G., & Schwartz, C. D. (2016). Reguladores vegetais na propagação *in vitro* de Tamarileiro (*Solanum betaceum*). *Revista Da 13ª Jornada de Pós Graduação e Pesquisa Congrega 2016*, 10.
- Corredoira, E., Janeiro, L., & San José, M. (2011). Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación del aliso con vistas a su conservación. *Recursos Rurais*, 49–57.

- Criollo, H., Insuasti, K., & Degaldo, W. (2016). Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252–261.
- Diario El Comercio. (2019, September 19). *Ecuador envía 600 kilos de tomate de árbol por primer vez a EE.UU.*
- Espinosa, J. A., Trillos, O., Hoyos, R. A., Afanador, L., & Correa, G. (2005). Potencial de propagación *in vitro* para el tomate de árbol partenocárpico *Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 58(1), 2685–2695.
- Estévez, M. (2019). *Evaluación de diferentes medios de cultivo para la germinación in vitro de semilla de cultivares de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. Universidad Central del Ecuador.
- Feicán, C. G., Encalada, C., & Becerril, C. (2017). Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Agroproductividad*, 9, 78–86.
- Garay, A., Sánchez, M. de la P., García, B., Álvarez, E., & Gutiérrez, C. (2014). La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB*, 33(1), 13–22.
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1 The Background. In *Plant Propagation by Tissue Culture*.
- González, H. (2007). *Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal Piper oradendron Trel. & Standl., para el Informe de tesis Presentado por Hernán Perla González Para optar al título de Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Pl.* 1–46.
- Guimarães, M., Tomé, M., & Cruz, G. (1996). *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (Tamarillo). *Árboles IV*, 35, 120–137.
- Hernández, R. J., Aramendiz, H., & Cardona, C. E. (2004). Influencia del ácido indolbutírico y ácido naftalenoacético sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Temas Agrarios*, 5–13.
- Jacinto, M. (2018). *Evaluación de tres niveles de auxinas y citoquininas para la obtención de plantas madre de rosa (Rosa sp.) variedad freedom en condiciones in vitro*. Universidad Mayor de San Andrés.
- Julião, M. (2019). *Morphological and physiological evaluation of Tamarillo (Solanum betaceum Cav.) somatic embryogenesis-derived plants*. Universidad de Coimbra.

- Kahia, J., Sallah, P. K., Diby, L., Kouame, C., Kirika, M., Niyitegeka, S., & Asiimwe, T. (2015). A novel regeneration system for tamarillo (*Cyphomandra betacea*) via organogenesis from hypocotyl, leaf, and root explants. *HortScience*, *50*(9), 1375–1378.
- Kieber, J., & Schaller, E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development at a Glance*, *145*(4), 1–7.
- Llorente, B. E. (2002). *Cultivo de células y tejidos vegetales: generalidades*.
- Miranda, O. (2014). *Evaluación y selección in vitro de materiales promisorios de tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.), resistentes/tolerantes a la antracnosis (Colletotrichum spp)*. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).
- Morales, M. E., Espinosa, C., & Garza, R. A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, 351–410.
- Moreno, C., Molina, J., Ortiz, J., Peñafiel, C., & Moreno, R. (2020). Cadena de valor en la red de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Ecuador. *Agronomía Mesoamericana*, *31*, 13–29.
- Müller, B., & Sheen, J. (2007). Cytokinin signaling pathway. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, *2007*(407), 1–3.
- Muñoz de Malajovich, M. A. (2012). Biotecnología. In *Universidad Nacional de Quilmes* (2a edición).
- Osorio, C., Hurtado, N., Dawid, C., Hofmann, T., Heredia-Mira, F. J., & Morales, A. L. (2012). Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chemistry*, *132*(4), 1915–1921.
- Padilla, F., Soria, N., Oleas, A., Rueda, D., Manjunatha, B., Kundapur, R. R., Maddela, N. R., & Rajeswari, B. (2017). The effects of pesticides on morphology, viability, and germination of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) and Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) pollen grains. *3 Biotech*, *7*(3), 1–12.
- Pereira, M. D. O., Navroski, M. C., Rejane, L., Reiniger, S., Silva, D., Missio, F. D. F., & Tonett, E. L. (2014). *Establecimiento in vitro de segmentos caulinares de araucária (Araucaria angustifolia)*.
- Prohens, J., & Nuez, F. (2001). The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): A review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review*, *1*(2), 43–68.
- Ramírez, F., & Kallarackal, J. (2019). Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) reproductive

- physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 248(January), 206–215.
- Ramírez, M., Vargas, T. E., & De García, E. (2009). Cultivo de microesquejes de parchita (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(2), 327–332.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*.
- Salazar, K. (2020). *Establecimiento de un protocolo de propagación in vitro a partir de dos explantes de Solanum betaceum*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
- Sanchez, E. (2018). *Desarrollo De Un Sistema Para La Microinjertación in Vitro De Vid (Vitis Vinifera L.)*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2020). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. *Plantas de Probeta*, 241.
- Sigarroa, A. K., & García, C. L. (2011). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. *Acta Agronómica*, 60(4), 347–354.
- Simoes Pedrosa, A. C. (2016). *Genetic variability analysis of Tamarillo (Solanum betaceum Cav.) and optimization of micropropagation conditions*. University of Coimbra.
- SIPA. (2020). *Cifras Agroproductivas*. Sistema de Información Pública Agropecuaria. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Suárez, I. (2020). Cultivo De Tejidos Vegetales. In *Fondo editorial, Universidad de Cordoba*.
- Tandazo, J. V., Ruiz, M. X., Rojas, J. R., Capa, E. D., Prohens, J., Alejandro, J. D., & Acosta, P. G. (2017). The impact of an extreme climatic disturbance and different fertilization treatments on plant development, phenology, and yield of two cultivar groups of *Solanum betaceum* Cav. *PLoS ONE*, 12(12), 1–18.
- Tonietto, A., Fortes, G. R. D. L., & Silva, J. B. Da. (2001). Enraizamento De Miniestacas De Ameixeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(3), 643–646.
- Viera Arroyo, W. F., Sotomayor Correa, A. V., Tamba Sandoval, M. V., Vásquez Castillo, W. A., Martínez, A., Viteri Díaz, P. F., & Ron, L. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). *Acta Agronómica*, 65(3), 304–311.

- Villa, R., Arbeláez, L., Quinceno, M., & Pineda, P. (2014). Ensayos preliminares para el establecimiento in vitro de frutales de clima frio (tomate de árbol. uchuva) en la Granja Bengala. *IV Encuentro Regional de Semilleros de Investigación: Eje Cafetero y Valle Del Cauca.*, 2148–2155.
- Villares, M., Sanchez, M., Viera, W., Soria, N., Sotomayor, A., Yanez, D., & Martinez, E. (2018). Caracterización morfológica de frutos de tomate de arbol (*Solanum betaceum* Cav.) de una poblacion segregante. *Revista de Investigación Talentos*, V(1), 9–19.
- Wang, S., & Zhu, F. (2020). Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. *Trends in Food Science and Technology*, 95(May 2019), 45–58.
- Waweru, B., Ishimwe, R., Kajuga, J., Kagiraneza, B., & Yao, P. (2011). *In vitro* Plant Regeneration of *Cyphomandra betacea* through Nodal Culture. *Rwanda Journal*, 24(0), 58–66.
- Zurita, W., Gómez, E., Atrián, E., Hernández, A., Granados, M., García, J., Salgado, R., & Sánchez, N. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica*, 129–144.

Anexos

Anexo A. Composición de medios básicos para el cultivo *in vitro* de tejidos.

Componentes	Concentraciones (mg/L)			
	MS	B5	N6	Wh
NH₄NO₃	1650	-	-	-
KNO₃	1900	2500	2830	80
KH₂PO₄	170	-	400	-
CaCl₂·2H₂O	440	150	166	-
MgSO₄·7H₂O	370	250	185	737
(NH₄)₂SO₄	-	134	463	-
Ca(NO₃)₂·4H₂O	-	-	-	288
NaH₂PO₄·H₂O	-	150	-	19
KCl	-	-	-	65
Na₂SO₄	-	-	-	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H₃BO₃	6.20	3.00	1.60	1.50
MnSO₄·H₂O	-	10.00	-	-
MnSO₄·4H₂O	22.30	-	4.40	6.65
ZnSO₄·7H₂O	8.60	2.00	1.50	2.67
Na₂MoO₄·2H₂O	0.25	0.25	-	-
H₂MoO₄	-	-	-	0.001
CuSO₄·5H₂O	0.025	0.025	-	0.01
Fe₂(SO₄)₃	-	-	-	2.50
FeSO₄·7H₂O	27.80	27.80	27.85	-
Na₂EDTA	37.30	37.30	37.25	-
CoCl₂·6H₂O	0.025	0.025	-	-
Glicina	2.00	-	2.00	3.00
Tiamina-HCl	0.10	10.00	1.00	0.10

Piridoxina-HCl	0.50	1.00	0.50	0.10
Ácido nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Mioinositol	100.00	100.00	-	100.00
Sacarosa	30000	20000	50000	20000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

Fuente: Roca & Mroginski (1991)

Anexo B. Material vegetal usado en la investigación.



Anexo C. Preparación de soluciones de micronutrientes y reguladores de crecimiento.



Anexo D. Medición de pH y Conductividad eléctrica del medio de cultivo Phytamax.



Anexo E. Materiales al interior de la cámara de flujo laminar.



Anexo F. Desinfección del material vegetal.



Anexo G. Extracción de micro-esquejes.



Anexo H. Ubicación de tratamientos en el cuarto de crecimiento.



Anexo I. Desarrollo de la yema del micro-esqueje.

