

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Regeneración *in-vitro* de naranjilla (*Solanum quitoense*) a partir de  
explantes de yemas apicales, hipocotilos y peciolo**

**Proyecto de Investigación**

**Miguel Alejandro Orellana Carrión**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

**Venancio Arahana PhD, María Mercedes Cobo MS**

Trabajo de titulación de pregrado presentado como requisito  
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 22 de diciembre de 2017

# UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

## HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Regeneración *in-vitro* de naranjilla (*Solanum quitoense*) a partir de explantes de yemas apicales, hipocotilos y peciolo**

**Miguel Alejandro Orellana Carrión**

Calificación: xxxxx

Nombre del profesor, Título Académico: María Mercedes Cobo, MS

Firma del Profesor: -----

Quito, 22 de diciembre de 2017

**© Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombre: Miguel Alejandro Orellana Carrión

Código de estudiante: 00109233

C. I.: 1720800265

Lugar, Fecha: Quito, 22 de diciembre de 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

Desde un comienzo, quisiera agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, por todo el apoyo desde el comienzo hasta el final de mi formación académica. También, a mi novia, María José Baquero, por ser un aporte incondicional. Por otro lado, quisiera nombrar a mi director de tesis Venancio Arahana por su conocimiento y sabiduría que fueron indispensables para la culminación del mismo. De la misma manera, a mi co-directora María Mercedes Cobo por toda su paciencia y excelencia durante el proceso de corrección escrita de este documento. A María Lourdes Torres por constantemente exigirle a uno a realizar los proyectos con una alta calidad. También, agradecer al Chanceller Grant de la USFQ por otorgar los fondos necesarios para la realización de este proyecto. Finalmente, a personas externas a este trabajo como a los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, al INIAP por otorgar los frutos de naranjilla y a Danny Navarrete por su apoyo en el diseño estadístico de este trabajo.

## RESUMEN

La naranjilla o lulo (*Solanum quitoense*) es una planta frutal nativa de la región tropical andina que tiene un alto aprecio dentro del mercado culinario por el exótico sabor de su fruta y su alto contenido nutricional de hierro, niacina, ácido cítrico y pectina. Al igual que la mayoría de frutales, esta especie es susceptible a enfermedades causadas por nematodos, insectos, virus y hongos, lo que ocasiona grandes pérdidas de este cultivo. El desarrollo de nuevas estrategias de propagación vegetativa fomentaría el crecimiento de plantas con mejor desempeño agrícola. El objetivo de este estudio fue estandarizar protocolos de regeneración *in vitro* de naranjilla a partir de tres tipos de tejidos vegetales: yemas apicales, hipocotilos y peciolos. Para ello, los explantes vegetales fueron obtenidos de plantas *in vitro* y cultivados en medio basal Murashige & Skoog (MS) suplementado con varias combinaciones hormonales. En cada ensayo, la regeneración de brotes fue evaluada en base a cuatro parámetros: número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas. En el caso de yemas apicales, el mejor medio de cultivo fue MS con 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA para todas las variables analizadas. Por otro lado, los hipocotilos rectos (3 semanas de edad) demostraron ser estadísticamente superiores a los hipocotilos curvos (2 semanas de edad). El mejor medio de cultivo para éstos fue el medio MS con 0.01 mg L<sup>-1</sup> ANA, 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y 5.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. En peciolos, los del tercio superior de la planta fueron significativamente mejores a los del tercio inferior de la misma. El mejor medio de cultivo para estos explantes fue un medio MS con 0.02 mg L<sup>-1</sup> ANA, 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y 3.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Adicionalmente, utilizando un análisis factorial para peciolos, se observó que la hormona GA<sub>3</sub> puede ser un elemento clave en el desarrollo de número de brotes, mientras que la hormona ANA promueve un mayor desarrollo en el tamaño de brotes y hojas. Finalmente, mediante una prueba T, se determinó que los peciolos generan un mayor número de brotes y hojas, mientras que las yemas apicales desarrollan retoños y hojas con un mayor tamaño. En este estudio se establecieron protocolos de regeneración *in vitro* de plantas de naranjilla a partir de diferentes tipos de tejidos vegetales, los cuales pueden ser utilizados para la eficiente micropropagación vegetativa y conservación de este valioso recurso biológico.

*Palabras clave:* cultivo *in vitro*, explante, BAP, ANA, GA<sub>3</sub>, propagación vegetativa.

## ABSTRACT

Naranjilla or lulo (*Solanum quitoense*) is a native plant from the tropical region of the Andes. It is highly appreciated in the local market for its exotic flavor and high nutritional contents of iron, niacin, citric acid, and pectin. Like most fruit plants, this species is vulnerable to many diseases caused by nematodes, insects, fungus and virus, resulting in important economical losses. The development of vegetative plant propagation strategies could promote the growth of plants with enhanced agricultural performance. The objective of this study was to establish *in vitro* protocols for the regeneration of naranjilla plants from three explant types: shoot tips, hypocotyls, and petioles. Vegetative explants were obtained from *in vitro* plants and cultivated in Murashige & Skoog (MS) basal medium supplemented with different hormone combinations. For each assay, shoot regeneration was evaluated regarding four parameters: number and size of shoots and number and size of leaves. For shoot tips, the best culture medium was MS supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA for all the analyzed variables. On the other hand, straight hypocotyls (3 weeks old) were significantly superior to curved ones (2 weeks old). The best culture medium for straight hypocotyls was MS with 0.01 mg L<sup>-1</sup> NAA, 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and 5.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Petioles from the upper third of the plant were statistically superior to those from the bottom third in all of the measured variables. The best culture medium for these explants was MS supplemented with 0.02 mg L<sup>-1</sup>, 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> and 3.5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Also, with the results of a factorial analysis using petioles as explants, it was observed that the hormone GA<sub>3</sub> could play a key role in the development of a greater number of shoots and leaves, while NAA promotes the growth of shoots and leaves. Finally, it was determined through a T-test that petioles produce a higher number of shoots and leaves in comparison with the other explants, whereas shoot tips produce shoots and leaves of greater length. This study established efficient *in vitro* protocols for the regeneration of naranjilla using different types of tissue which could be used in the micropropagation and conservation of this important biological resource.

*Key words:* *in vitro* culture, explants, BAP, NAA, GA<sub>3</sub>, and vegetative propagation.

## Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>1.1. La naranjilla</b>	<b>11</b>
1.1.1. Generalidades	11
1.1.2. Taxonomía	11
1.1.3. Descripción morfológica	12
1.1.3.1. Tallo	12
1.1.3.2. Flor	12
1.1.3.3. Frutos	12
1.1.5. Variedades cultivadas de naranjilla	13
1.1.6. Especies silvestres relacionadas con la naranjilla	14
1.1.7. Importancia de la naranjilla en la agricultura	14
1.1.8. Principales enfermedades que afectan a la naranjilla	15
1.1.8.1. Hongos	15
1.1.8.2. Bacterias	15
1.1.8.3. Virus	15
1.1.8.4. Nematodos	15
1.1.8.5. Insectos	16
1.1.9. Cultivo de naranjilla en el Ecuador y el mundo	16
<b>1.2. Cultivo in-vitro de la naranjilla</b>	<b>17</b>
1.2.1. Técnicas de propagación in vitro a través de tejidos vegetales	17
1.2.2. Función de los reguladores de crecimiento vegetales	18
1.2.3. Medios de cultivo	19
1.2.4. Estudios de propagación in vitro de la naranjilla y sus parientes	19
<b>2. Objetivos</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo General	22
2.2. Objetivos específicos	22
<b>3. Justificación</b>	<b>22</b>
<b>4. Área de estudio</b>	<b>23</b>
<b>5. Materiales</b>	<b>24</b>
5.1. Material vegetal	24
5.2. Desinfección de semillas	24
5.3. Germinación de semillas in vitro	24
5.4. Subcultivo	24
5.5. Ensayos de organogénesis	24
5.6. Ensayos de elongación y enraizamiento de retoños	25
5.7. Aclimatación de plántulas	25
<b>6. Metodología</b>	<b>25</b>
6.1. Material vegetal	25
6.2. Germinación in vitro de semillas de naranjilla	25
6.3. Brotación de yemas apicales	25
6.4. Regeneración de brotes a partir de hipocotilos	26
6.5. Regeneración de brotes a partir de peciolo	26
6.6. Elongación y enraizamiento de brotes de naranjilla	26
6.7. Aclimatación de plántulas de naranjilla	27
6.8. Diseño experimental y análisis de datos	27
<b>7. Resultados</b>	<b>28</b>
7.1. Brotación de yemas apicales	28

7.2.	Regeneración de brotes a partir de hipocotilos .....	28
7.3.	Regeneración de brotes a partir de peciolo.....	29
7.4.	Comparación del desempeño entre explantes estudiados .....	32
7.5.	Elongación y enraizamiento de brotes.....	32
7.6.	Aclimatación de plantas .....	32
8.	Discusión.....	32
8.1.	Brotación a partir de yemas apicales .....	32
8.2.	Regeneración de brotes a partir de hipocotilos .....	34
8.3.	Regeneración de brotes a partir de peciolo .....	35
8.4.	Comparación del desempeño entre explantes .....	37
9.	Conclusiones.....	39
10.	Recomendaciones.....	40
11.	Referencias .....	41
12.	Tablas .....	48
13.	Figuras.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efecto de diferentes concentraciones de ANA en la brotación de yemas apicales de naranjilla bajo los parámetros analizados.....	48
Tabla 2: Valores de significancia P producto del análisis de varianza para el experimento de crecimiento de brotes a partir de explantes de yemas apicales.....	48
Tabla 3: Efecto de la edad de los hipocotilos en la regeneración de plantas de naranjilla en los cuatro parámetros analizados.....	48
Tabla 4: Valores de significancia P entre la comparación de explantes de hipocotilos rectos y curvos.....	49
Tabla 5: Efecto de diferentes combinaciones de hormonas ANA, GA3 y BAP bajo los parámetros analizados mediante explantes de hipocotilos. ....	49
Tabla 6: Valores de significancia P para las diferentes combinaciones hormonales del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de hipocotilos rectos y curvos.....	50
Tabla 7: Efecto del origen de los peciolo, en relación a su ubicación en el tercio superior o inferior de la plántula, en la regeneración de plantas de naranjilla en los cuatro parámetros analizados. ....	50
Tabla 8: Valores de significancia P entre la comparación de explantes de peciolo del tercio superior e inferior de la planta. ....	50
Tabla 9: Valores de significancia P del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo del tercio superior e inferior de la planta.....	51
Tabla 10: Efecto de diferentes combinaciones de hormonas ANA, GA3 y BAP bajo los parámetros analizados mediante explantes de peciolo del tercio superior de la planta ...	52
Tabla 11: Valores de significancia P la interacción entre las diferentes hormonas con respecto a la parte de la planta de explantes de peciolo para las cuatro variables estudiadas producto del diseño estadístico factorial general.....	53
Tabla 12: Valores de significancia P para las distintas interacciones resultantes de un diseño factorial para las variables número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas. ....	53
Tabla 13: Diferencias entre el desempeño global de todas las combinaciones hormonales de cada tipo de explante de naranjilla utilizadas bajo los cuatro parámetros analizados.....	53
Tabla 14: Comparación del porcentaje de supervivencia de plantas de Naranjilla de explantes de peciolo de hojas del tercio superior e inferior de la planta. ....	54
Tabla 15: Tabla comparativa del porcentaje de supervivencia de plantas de naranjilla en aclimatación por combinación de hormonas entre explantes de hipocotilos curvos y rectos .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diseño de los medios con diferentes concentraciones de la hormona auxina ANA para el ensayo de brotación de yemas apicales.....	55
Figura 2: Diseño de los medios con explantes de hipocotilos de dos y tres semanas (curvo y recto respectivamente) con diferentes concentraciones de las hormonas ANA, GA <sub>3</sub> y BAP. ....	55
Figura 3: Diseño de los medios con peciolo de la parte superior e inferior de la planta con diferentes concentraciones de las hormonas auxina ANA, giberelina GA <sub>3</sub> y citoquinina BAP. ....	55
Figura 4: Preparación y montaje de invernaderos caseros para la aclimatación de plántulas provenientes de la brotación en los diferentes explantes estudiados.....	56
Figura 5: Gráfico sobre la comparación de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo de la parte superior (imágenes de la derecha) e inferior (imágenes de la izquierda) de la planta frente a diferentes combinaciones de ANA (parte superior, segundo nivel), GA <sub>3</sub> (parte superior, primer nivel) y BAP (izquierda).....	56
Figura 6: Gráfico de interacción entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA <sub>3</sub> ” y “BAP” para la variable “número de brotes” del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo.....	57
Figura 7: Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente; sin interacción) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA <sub>3</sub> ” y “BAP” para la variable “tamaño de brotes” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo.....	58
Figura 8: Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA <sub>3</sub> ” y “BAP” para la variable “tamaño de hojas” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo.....	58
Figura 9: Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente; sin interacción) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA <sub>3</sub> ” y “BAP” para la variable “número de hojas” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo.....	59
Figura 10: Fotografías del desempeño de regeneración de brotes de los explantes de cada experimento analizado en este estudio.. ....	60

# 1. Introducción

## 1.1. La naranjilla

### 1.1.1. Generalidades

La naranjilla (*Solanum quitoense*) es una especie característica de los andes sudamericanos y de latitudes amazónicas (Pastrana, 1998). Específicamente, es originaria de las vertientes oriental y occidental de los andes de Perú, Ecuador y Colombia. El cultivo se localiza en países como Chile, México y especialmente en Perú, Ecuador, Colombia, Panamá, Costa Rica y Honduras (Sowell & Shiverly, 2012). Se la cultiva en zonas sub-tropicales con un índice alto de humedad (Pastrana, 1998). Se han registrado variedades locales como: agria, dulce, baeza, septentrional y bola (Sowell & Shiverly, 2012). El clima donde crece la naranjilla se caracteriza por ser cálido y sub cálido húmedo con temperaturas entre 17 a 26 grados centígrados (Jiménez, 1982). Sin embargo, los autores Valarezo y Samaniego (1982) identifican como temperatura óptima de crecimiento de la naranjilla, 20 grados centígrados. La precipitación requerida varía entre 1800 a 4000 mm, con una humedad relativa aproximada de 78% (Rodríguez, 1986), siendo 2500 mm la precipitación óptima (Valarezo & Samaniego, 2017). Un factor importante para considerar su cultivo es la altitud. La naranjilla es una especie que prefiere crecer entre 600 y 2000 metros sobre el nivel del mar (Samaniego, 1982). Adicionalmente, Jiménez (1982) describe que la altitud que produce un mejor rendimiento del cultivo es entre 1000 a 1400 metros sobre el nivel del mar. El suelo se caracteriza por ser rico en materia orgánica, profundo y bien drenado. Su potencial hidrógeno varía entre 5.3 y 6 (Rodríguez, 1986). Adicionalmente, su cultivo se junta con diferentes tipos de plantas agrícolas como el plátano (*Musa paradisiaca*), yuca (*Manihot esculenta*) o guaba (*Inga feuilleei*), prolongando la vida media de la naranjilla y su supervivencia a plagas (Valarezo & Samaniego, 1982).

### 1.1.2. Taxonomía

La naranjilla es un miembro de la familia de las Solanaceae, del género *Solanum* y pertenece al grupo de las Lasiocarpas (Revelo & Sandoval, 2003). Su posición taxonómica completa es la siguiente (Morales, 2016):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *quitoense*

### **1.1.3. Descripción morfológica**

#### **1.1.3.1. Tallo**

El tallo es ramificado, semileñoso, cilíndrico y presenta tricomas (vellos). Puede crecer de forma erecta (Heiser, 1985). Según la variedad, puede presentar o no espinas (Revelo & Sandoval, 2003). Las ramas son fibrosas con un diámetro aproximado de 5 a 7 cm. Éstas tienen un aspecto leñoso cuando la planta está en una fase madura, pueden presentar espinas y tricomas (NEIVA, 2006).

#### **1.1.3.2. Flor**

La naranjilla posee flores pentámeras con cinco sépalos, 5 estambres y 5 pétalos de manera simétrica, y en ellas confluyen los dos sexos (Revelo & Sandoval, 2003). Los pétalos son generalmente de color blanco (Schultes & Cuatrecasas, 2007). Por la longitud del pistilo, pueden ser de pistilo largo, medio y corto, pero la única variedad fértil es precisamente la de flor con pistilo largo. Su fertilización se produce de manera cruzada, es decir que su polinización tiene lugar por efecto del viento o por acción de organismos polinizadores como los insectos (NEIVA, 2006).

#### **1.1.3.3. Frutos**

Los frutos son bayas globosas de cuatro a ocho centímetros de diámetro y pueden variar su peso de 70 a 100 gramos. Su cubierta, está poblada de tricomas (pelos) los cuales se pierden conforme el fruto va madurando (Heiser, 1972). El fruto presenta una cubierta de

color amarillento-anaranjado fuerte. Sin embargo, su pulpa es de color verde claro y puede presentar hasta 800 semillas lisas, redondas y de tamaño pequeño (Revelo & Sandoval, 2003).

#### **1.1.4. Composición química de los frutos**

En base a estudios sobre la composición química de la pulpa de frutos de naranjilla realizado por Acosta *et al.* (2009), se reporta que el contenido de humedad tiene un aproximado de 85.8 y 92.5 g 100g<sup>-1</sup>; proteína entre 0.107-0.6 g 100g<sup>-1</sup>; grasa 0.1-0.24 g 100g<sup>-1</sup>; carbohidratos totales 5.7 g 100g<sup>-1</sup>; fibra 0.3-0.46 g 100g<sup>-1</sup>; azúcares 2.51 g 100g<sup>-1</sup>; valor energético de 23 kcal 100g<sup>-1</sup>; pH 3.3 y total sólidos solubles 8° Brix. Por otro lado, los mismos autores describen la presencia de carotenoides tanto para la fruta, pulpa y jugo con 33.3 µg g<sup>-1</sup>, 7.2 µg g<sup>-1</sup> y 4.6 µg g<sup>-1</sup> respectivamente. También, en un estudio realizado por NEIVA (2006), se encontró que el contenido nutricional de la naranjilla consiste de 87% agua, 0.74 % proteína, 0.17 % lípidos, 8% carbohidratos, 2.6% fibra, 34.2 mg de Calcio, 1.19 mg de Hierro, 29.4% vitamina C y 1.28% pectina.

#### **1.1.5. Variedades cultivadas de naranjilla**

Hasta la actualidad se han descrito tres tipos de naranjilla: variedad “agria” (*Solanum quitoense* Lam var. *quitoense*), variedad baeza dulce (*Solanum quitoense* Lam var. *quitoense*) y la variedad “espinosa” (*Solanum quitoense* Lam var. *septentrionale*). La primera se caracteriza por poseer un fruto esférico, achatado, de color amarillo rojizo y con un diámetro entre 5 a 7 cm de longitud. La epidermis del fruto es relativamente fina y su sabor es notablemente agridulce (Rodriguez & Camacho, 1992). La segunda consiste en una morfología similar a la variedad agria, pero su diferencia radica en los frutos que son notoriamente más grandes al tener un diámetro mayor a 7 cm de longitud y la base del pedúnculo al nivel de su unión con el propio fruto es más desarrollada. También se caracteriza por tener la epidermis más gruesa, sabor del fruto más dulce (Revelo & Sandoval, 2003). La tercera variedad se la conoce por poseer espinas, especialmente en el tallo, ramas y hojas. Su fruto es totalmente esférico, posee un color rojizo y su diámetro es de aproximadamente 4 centímetros de longitud, siendo la variedad con el fruto más pequeño (Rodriguez & Camacho, 1992).

### 1.1.6. Especies silvestres relacionadas con la naranjilla

Rodríguez y Camacho (1992) describen las siguientes especies silvestres relacionadas con la naranjilla: *S. hirsutissimum* (huevo de tigre), *S. tequilense* (uvilla), *S. mamosum* (ubre de vaca), *S. tapiro* (jíbara morada), *S. grandiflorum* (huevo de perro) y *S. cocona* (jíbara amarilla). Por otro lado, Whalen *et. al* (1981) identificaron a la naranjilla como miembro de la Sección Lasiocarpa. Esta contiene doce especies descritas, las cuales se las presentan de la siguiente manera: *S. stramonifolium*, *S. sessiliflorum*, *S. repandum*, *S. hyporhodium*, *S. vertissimum*, *S. felinum*, *S. pectinatum*, *S. candidum*, *S. lasiocarpum*, *S. quitoense*, *S. hirtum* y *S. pseudolulo*.

### 1.1.7. Importancia de la naranjilla en la agricultura

La naranjilla posee frutos de gran sabor y aporte nutricional (Rodríguez & Camacho, 1992). Es semi-domesticada, y se la considera a nivel regional como un cultivo menor, debido a que no es industrializada y es cultivada únicamente por pequeños productores agrícolas. Es cultivada en aproximadamente diez mil hectáreas y contribuye a la canasta económica de más o menos siete mil familias en el Ecuador (Sowell & Shiverly, 2012). Por otro lado, la demanda interna del producto se dirige en pequeñas proporciones a pequeños vendedores o industrias que generan productos elaborados, por lo que su destino mayoritario se orienta a un mercado internacional (Chong & Andrade, 2001).

En cuestiones de la calidad del fruto, se conoce que la variedad común produce frutos con un mayor valor comercial, debido a su buena aceptación en el mercado por la alta cantidad y calidad de jugo que genera, mientras que las variedades híbridas generan frutos con menor producción de jugo, por lo que perjudica su aceptación en el mercado local e internacional (Ochoa *et al.*, 2000). Por otro lado, se sabe que los híbridos de naranjilla producto del cruzamiento de la variedad común (*S. quitoense*) con variedades silvestres o parientes cercanos (*S. sessiliflorum*) generan una mayor resistencia a factores abióticos y bióticos que las propias variedades comunes de naranjilla (Clements *et al.*, 2016). Sin embargo, los pequeños agricultores prefieren utilizar variedades comunes por su mayor rendimiento (Showell & Shiverly, 2012).

### **1.1.8. Principales enfermedades que afectan a la naranjilla**

#### **1.1.8.1. Hongos**

Dentro de este tipo de patógenos, el más común es el hongo *Fusarium sp.* conocido coloquialmente como “mal seco” (Revelo & Sandoval, 2003). Otro agente causal de enfermedades en naranjilla es *Colletotrichum gloeosporioides*, mejor conocido como “pudrición de fruto” (Padilla *et al.*, 1982). También, *Phytophthora sp.*, o conocido comúnmente como “tizón tardío”. Finalmente, *Sclerotinia sclerotiorum* o “pudrición húmeda” es un hongo propio del suelo por lo tanto es un patógeno oportunista. (Navarro, 1988).

Como consecuencia de la infección, este tipo de patógenos atacan varios tejidos de la planta como hojas, peciolo, tallos, ramas y corteza (Castañeda, 1992; Tamayo, 2001). Las plantas infectadas por estos microorganismos presentan síntomas en sus hojas inferiores, las cuales muestran un color amarillento y posteriormente café, que termina “secando” la hoja hasta que se cae. También ataca los tallos que sostienen los frutos (Padilla *et al.* 1982).

#### **1.1.8.2. Bacterias**

*Pseudomonas solanacearum* y la bacteria *Erwinia sp.* son los principales patógenos bacterianos de la planta y estos son capaces de infectar tejidos vegetales como raíces y tallos, generando una condición de podredumbre mal oliente que puede causar la muerte de la planta. (Revelo & Sandoval, 2003).

#### **1.1.8.3. Virus**

El principal virus que genera grandes pérdidas en la naranjilla se lo conoce como “virus de la hoja pequeña” o también conocido como el virus del moisaco. Este patógeno es transmitido por vectores como los pulgones (*Myzus persicae* y *Aphis gossypii*) o moscas blancas del género *Bermisia sp.* Los síntomas se presentan como contracciones y amarillamiento de las hojas y posteriormente causa una disminución del tamaño de la misma planta y sus frutos. El virus infecta primero las hojas más jóvenes y posteriormente se difunde por toda la planta, generando un acortamiento de tallos y peciolo (Tamayo, 2001).

#### **1.1.8.4. Nematodos**

Los nematodos que actúan como parásitos de plantas generan un importante impacto económico en cultivos agrícolas generando pérdidas de hasta \$157 billones por año en todo el mundo (Escudero & López-Llorca, 2012). Las principales especies que infectan el sistema radicular son las siguientes: *Tylenchus sp.* (nematodo del suelo), *Meloidogyne incognita* (nematodo del nudo radicular), *Trichodorus sp.* (nematodo de la raíz de escoba), *Aphelenchus sp.* (nematodo del suelo), *Helicotylenchus sp.* (nematodo espiral), *Tylenchorhynchus sp.* (nematodo del raquitismo), *Xiphinema sp.* (nematodo de daga), *Paratylenchus sp.* (nematodo lesionador), *Hemicyclio sp.* (nematodo de vaina) (NEIVA, 2006). De todas las especies reportadas anteriormente, Revelo y Sandoval (2003) reportaron que el nematodo del nudo o *Meloidogyne incognita* es el más virulento, ya que tiene una mayor tasa de reproducción que sus parientes cercanos. Esta plaga es responsable del 70% de las pérdidas de cultivos de naranjilla.

#### **1.1.8.5. Insectos**

La plaga más importante de *S. quitoense* es el pasador de fruto o *Neoleucinodes elegantis* (Jijón, 1982). La consecuencia de una infección por este insecto es la caída de los frutos infestados. Generalmente, pueden producir hasta un 90% de pérdidas en la producción de naranjilla (Vélez, 1988; Salas *et al.*, 1991). Otra plaga con un impacto significativo en la producción de naranjilla es el perforador de cuello o *Faustinus apicalis*. (Jijón, 1982). También, la planta es susceptible a ataques por el escarabajo llamado coloquialmente barredor del tallo y ramas *Alcidion sp.* (Castañeda, 1992). Sin embargo, las especies con mayor influencia son los pulgones *Myzus persicae*, *Myzus ornato* y *Aphis gossypii* (Jijón, 1982). Las infecciones de estos parásitos generalmente producen el marchitamiento de la planta y posteriormente su muerte, generando un estado grave dentro de los cultivos de naranjilla y otras plantas (Vélez, 1988).

#### **1.1.9. Cultivo de naranjilla en el Ecuador y el mundo**

La naranjilla o lulo puede encontrarse en Ecuador, Colombia y ciertos países de Centro América como Panamá y Costa Rica, siendo estos últimos los lugares donde se la cultiva a menor escala (Heiser, 1972). Actualmente, Ecuador y Colombia son los mayores productores de naranjilla en el mundo (González, 2007).

Desde la época colonial, los agricultores han realizado cruces entre la naranjilla común (*S. quitoense*) con su pariente más cercano *S. sessiliflorum* (naranjilla jíbara) con el objetivo de mejorar su rendimiento y resistencia a factores abióticos y bióticos. Esto hizo que el cultivo de naranjilla común disminuya drásticamente (Soria, 1989). Sin embargo, estas modificaciones genéticas obtenidas presentan algunas características favorables como mayor adaptabilidad a altitudes más bajas aumentando su zona de producción, generó mayor resistencia a cierto tipo de plagas comunes al cultivo y generó un fruto con menor susceptibilidad a daños al ser transportado, ya que la pulpa es más dura (González, 2007). Actualmente, en Ecuador se la cultiva en la Costa, Sierra y Oriente (Revelo & Sandoval, 2003), siendo su mayor producción en las provincias de Pichincha, Imbabura, Sucumbios, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Sowell & Shiverly, 2012). Cabe recalcar que la mayor área de cultivo corresponde a las provincias de la región Oriental (Revelo & Sandoval, 2003). La superficie cultivada es de aproximadamente 9.459 hectáreas, con un volumen anual de producción de 39.636 toneladas (Soria Idrovo, 1996). El 50% de la producción nacional corresponde a una variedad conocida como híbrido del Puyo, seguido de un 45% del híbrido conocido como INIAP Palora y el 5% restante a la naranjilla convencional (*S. quitoense*) (NEIVA, 2006).

## **1.2. Cultivo *in-vitro* de la naranjilla**

### **1.2.1. Técnicas de propagación *in vitro* a través de tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de tejidos es una tecnología que puede usarse para la conservación y propagación de plantas, basándose en el principio de la totipotencia celular (Cañal *et al*, 2001). Implica cultivar tejidos o células vegetales de forma aséptica bajo condiciones abióticas controladas y en un medio rico en nutrientes y suplementado con hormonas vegetales. En sí es el control relativo de los procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos de los tejidos que están siendo estudiados o analizados (Abdelnor & Escalant, 1994). Durante la multiplicación vegetativa o asexual, se utiliza una planta madre o base que es propagada *in vitro*, donde sus individuos descendientes son clones o copias genéticas idénticas a la planta madre y entre ellas (Cañal *et al*, 2001). Los tipos principales de propagación *in vitro* son: cultivo de órganos, callos, suspensión de células, cultivo de protoplastos y cultivo de anteras (Bozzone, 1997). El cultivo de órganos corresponde a un

cultivo con el fin de propagar la planta mediante meristemas o ápices, microestacas y embriones (Radice, 2010).

### **1.2.2. Función de los reguladores de crecimiento vegetales**

Las fitohormonas son sustancias químicas que generalmente son producidas por las propias plantas y su función es estimular, inhibir o regular la comunicación intracelular (Abdelnor & Escalant, 1994). La aplicación de estos reguladores de crecimiento tiene como objetivo inducir a los explantes vegetales para que entren en un proceso de morfogénesis (Flórez, 1997). El primer grupo de hormonas vegetales son las auxinas, que generan diversos efectos biológicos como la estimulación de la división celular, actúan en el crecimiento radicular y posee un control sobre el sistema vascular (Koepfl et al., 1937). También, en concentraciones altas, las auxinas pueden suprimir la morfogénesis (Smith, 2006). Los tipos de auxinas presentes son ácido indol acético (AIA), ácido 1-naftalen acético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido indolbutírico (IBA). La hormona 2,4-D es ampliamente utilizada para la inducción de callo, mientras que las hormonas IAA, IBA y ANA se utilizan para inducción de raíces (Smith, 2006) Por otro lado, las citoquininas actúan en la regulación del desarrollo y mantenimiento de los tejidos vegetales. También tienen un rol en la división de células no meristemáticas, ocasionando la formación de callo (masa de células no diferenciadas) con presencia de auxinas. Finalmente, inhiben la dominancia apical (Flórez, 1997). Las citoquininas kinetina (KIN), 6-benzilaminopurina (BA), zeatina y 6-y-y-[dimetilallylamino]-purina (2iP) promueven la división celular, proliferación de brotes y morfogénesis. La hormona Tidiázurón (TDZ) se utiliza comercialmente como defoliante para inducir que las plantas desprendan sus hojas. Esta última citoquinina, en concentraciones bajas, puede estimular la regeneración de brotes (Smith, 2006). Adicionalmente, se conoce que, a nivel molecular, el efecto de las citoquininas puede estar relacionado con la síntesis de ARN, estimulación de la síntesis de proteínas y activa cierto tipo de enzimas (George et al., 2008). Las giberelinas es un grupo de fitohormonas que mayoritariamente son de producción natural (las auxinas y citoquininas tienen variantes producidas sintéticamente) (Koepfl et al., 1937). Este grupo de hormonas tiene un efecto en el incremento del crecimiento de vástagos y también provoca algunos efectos fisiológicos como división celular o inducción de síntesis de ADN en la fase G1 de la mitosis. (Abdelnor & Escalant, 1994). Adicionalmente, se conoce que tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de callo y en la formación de raíces

adventicias (Smith, 2006). Por último, el ácido abscísico (ABA), está involucrado en la abscisión dominante de frutas y hojas. También es útil para el cultivo de embriones (Smith, 2006).

### **1.2.3. Medios de cultivo**

Para mantener la viabilidad de un cultivo de tejidos, estimular su diferenciación y favorecer su crecimiento, se requiere crear un medio con nutrientes y hormonas vegetales. Específicamente, los medios de cultivo para propagación *in vitro* de especies vegetales poseen los siguientes componentes: sales inorgánicas (minerales), compuestos orgánicos, preparaciones naturales complejas y materiales inertes (Abdelnor & Escalant, 1994). Las sales inorgánicas son esenciales para la sobrevivencia de las plantas y contienen Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (F) (Radice, 2010). Entre los compuestos orgánicos se encuentran los carbohidratos (azúcares), hormonas, vitaminas y aminoácidos como L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina y L-tirosina que son los más populares dentro de este campo de estudio (Radice, 2010). Las preparaciones naturales complejas son una gran variedad de sustancias con una composición que no se conoce en su totalidad y sirven para enriquecer medios de cultivo (Abdelnor & Escalant, 1994). Estas pueden ser extractos de malta, agua de coco, extracto de levadura y pulpa de diferentes frutas (Ramírez & Duque, 2010). Finalmente, los materiales inertes incluyen sustancias gelificantes que dan soporte y carbón activado para remover compuestos no deseados en el medio de cultivo (Abdelnor & Escalant, 1994).

### **1.2.4. Estudios de propagación *in vitro* de la naranjilla y sus parientes**

Gisbert *et al.* (2006), estudió la regeneración *in vitro* de *Solanum aethiopicum* y *S. macrocarpon*, que son dos frutales de la región subtropical de África. En este estudio, se realizaron tres experimentos. El primero, a partir de explantes de cotiledones, se evaluó la regeneración de brotes usando TDZ, NAA+TDZ y IAA+ zeatina, encontrando que TDZ indujo una mayor respuesta regenerativa. En un segundo experimento, se evaluó la regeneración de brotes a partir de explantes de hojas, usando 0.45  $\mu\text{M}$  de TDZ con un resultado del 100% de regeneración. El tercer experimento consistió en la optimización de regeneración de brotes con diferentes concentraciones de TDZ, donde, en un medio MS, el rango entre 0.1-0.2  $\mu\text{M}$  otorga un mayor desempeño de regeneración.

O' Connor *et al.* (2010), evaluó la regeneración de plantas de *S. americanum* a partir de explantes de hojas. El estudio consistió de tres etapas: inducción de brotes a partir de tejidos de hoja, elongación de brotes y enraizamiento. La mejor combinación de hormonas para la inducción de brotes fue 5.7  $\mu\text{M}$  de zeatina + 0.11  $\mu\text{M}$  de ácido acético en un medio MS. La elongación de los brotes se logró transfiriéndolos a un medio MS basal. El enraizamiento se obtuvo al utilizar  $\frac{1}{2}$  MS con 58.5 mM de sacarosa.

Hendrix *et al.* (1987), evaluó la organogénesis y regeneración de plantas a partir de explantes de hojas de las especies *S. candidum*, *S. quiotense* y *S. sessiliflorum*. Se efectuaron dos experimentos donde el primero evaluó el efecto de diferentes combinaciones de BA con ANA. Para *S. candidum*, las combinaciones que produjeron brotes con raíces fueron en rangos de 0.0, 0.01 y 0.09  $\mu\text{M}$  de BAP con 0.0 y 0.01  $\mu\text{M}$  de NAA en un medio basal mineral MS. En el caso de *S. sessiliflorum* la producción de brotes con raíces se observó en un medio MS con rangos de 0.0-0.09  $\mu\text{M}$  BAP con 0.11  $\mu\text{M}$  NAA. En el segundo experimento, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de kinetina e IAA en combinación. Para *S. candidum*, la mayor cantidad de brotes adventicios se produjo en un medio MS con rangos de 93-116  $\mu\text{M}$  kinetina con 0.06-5.7  $\mu\text{M}$  IAA y 163  $\mu\text{M}$  kinetina con 0.57-5.7  $\mu\text{M}$  IAA. En tanto que para *S. sessiliflorum*, la mayor producción de brotes adventicios se obtuvo en un medio MS suplementado 93  $\mu\text{M}$  kinetina en combinación con 0.06  $\mu\text{M}$  IAA y 163  $\mu\text{M}$  kinetina con 5.7  $\mu\text{M}$  IAA.

Rodríguez y Oliveira (1991), realizaron un estudio de regeneración in vitro de varias accesiones de *S. topiro* y *S. sessiliflorum* a partir de explantes de hojas e hipocotilos en un medio MS suplementado con combinaciones de ANA y BA. Como resultado, obtuvieron que los explantes de hipocotilos generaron una mayor respuesta que los explantes de hoja para la regeneración de brotes y que, a su vez, la mejor combinación hormonal probada fue  $5 \times 10^{-7} \text{M ANA} + 1 \times 10^{-6} \text{M BA}$  en un medio MS.

Boufleuher *et al.* (2008) evaluó el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas en la propagación de *S. sessiliflorum* a partir de segmentos nodales de dos variedades de distintas localidades. El primer experimento consistió en probar el efecto de diferentes concentraciones de ANA y BAP en un medio MS suplementado con mio-inositol, glicina y sacarosa. Como resultado, se dedujo que las combinaciones de ANA y BAP inhibieron el crecimiento y mantenimiento de la dominancia

apical de brotes (elongación), como también la rizogénesis de la planta; pero aumentó la formación de callo. En el segundo experimento, se midió el efecto de IAA en combinación con KIN, TDZ y zeatina en un medio basal mineral MS. Como resultado, la combinación de 0.01 mg L<sup>-1</sup> IAA y 5.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ y 0.01 mg L<sup>-1</sup> IAA y 2.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ indujeron una mayor regeneración de brotes axilares; mientras que para brotes adventicios la mejor respuesta se obtuvo a partir 5.0 mg L<sup>-1</sup> TDZ y 2.5 mg L<sup>-1</sup> TDZ

Medina *et al.* (2008) evaluó la regeneración de *S. sessiliflorum* a partir de explantes foliares. En un primer experimento analizaron el efecto combinado de BA con ANA dentro de un medio basal mineral MS, donde obtuvieron plantas enraizadas en los rangos entre 0.0-1.5 mg L<sup>-1</sup> BA y 0.0-0.5 mg L<sup>-1</sup> ANA, con rangos hormonales superiores a esos, se generaron plantas anormales y aumentó la formación de callo. En un segundo experimento, estudiaron el efecto combinado de kinetina con IAA, donde la mayor producción de brotes se obtuvo a una concentración de 2.0 mg L<sup>-1</sup> kinetina con 1.0 mg L<sup>-1</sup> IAA.

Schuelter *et al.* (2009), analizó la regeneración *in vitro* de *S. sessiliflorum* de diferentes localidades a partir de explantes de segmentos de hoja, hoja con peciolo, peciolo, segmentos de hipocotilos y yemas apicales. Para la regeneración de brotes, los mejores explantes fueron segmentos de hipocotilos y yemas apicales. Para segmentos de hipocotilos, la mayor cantidad de brotes adventicios por explante se obtuvo a partir de un medio MS con 10-20 mg L<sup>-1</sup> KIN combinado con 0.02 mg L<sup>-1</sup> AIA.

Específicamente, en *S. quitoense*, Hendrix *et al.*, (1987) -con el procedimiento ya descrito anteriormente- obtuvieron una mayor respuesta con un medio de MS suplementado con 0.09 µM BA y 0.11 µM ANA para brotes axilares. Te-chato (1988), estudió la respuesta de formación de brotes con diferentes concentraciones de BA en combinación con ANA usando explantes de hipocotilos, hojas cotiledóneas y meristemo apical. El explante con mayor regeneración de brotes fue hipocotilo en un medio MS suplementado con un rango de 0.0-0.01 ppm ANA + 0.0-5.0 ppm BA. Segovia (2002), realizó un estudio de optimización de regeneración de brotes de naranjilla probando diferentes tipos de medios de cultivo mediante el uso de explantes de yemas axilares (nudos). Como resultado, el medio ½ MS suplementado con 0.02 ppm ANA, 0.04 ppm BAP y 0.05 GA3 presentó una mejor y mayor elongación y crecimiento de la planta. Tandazo (2015), evaluó la formación de callo e inducción de vástagos a partir de explantes de hipocotilos y hojas cotiledóneas. Para la inducción de callo,

el medio con una mejor respuesta fue MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA utilizando hojas cotiledóneas como explante. En cambio, para la inducción de vástagos el medio MS suplementado con 4.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.05 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> generó la mayor respuesta utilizando explantes de hipocotilos.

En el presente trabajo se evaluó la regeneración de retoños de *S. quitoense* a partir de tres tipos de tejidos: yemas apicales, hipocotilos y peciolos. Se cultivó yemas apicales en un medio MS con un rango de 0.01- 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA. También, se utilizaron dos tipos de hipocotilos, rectos de 3 semanas de edad y curvos de 2 semanas de edad. Estos fueron cultivados en MS con 0.01 mg L<sup>-1</sup> ANA, 0.1 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y un rango de 4.0-6.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Para peciolos, se extrajeron tejidos de la parte superior e inferior de la planta y se los colocó en un medio MS con 0.01-0.02 mg L<sup>-1</sup> ANA, 0.5-1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> y un rango entre 3.0-5.0 mg L<sup>-1</sup>. Se evaluó el mejor medio de cultivo para cada tejido y la comparación del desempeño de regeneración de estos para las variables número y tamaño de brotes, como también número y tamaño de hojas. Finalmente, se analizó el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas obtenidas durante el proceso de aclimatación.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

- Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* utilizando yemas apicales, hipocotilos y peciolos de *S. quitoense* que sirva de apoyo para la propagación y mejoramiento de la especie.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la mejor combinación de hormonas vegetales para la regeneración de brotes de naranjilla para cada tipo de explante utilizado.
- Establecer el mejor tipo de explante para la regeneración de brotes de naranjilla.
- Evaluar un protocolo eficiente de aclimatación de plántulas de naranjilla.

## 3. Justificación

La naranjilla o lulo es considerada como una de las 35 especies de plantas tropicales no industrializadas con un prometedor valor económico para los agricultores (Dennis *et al.*, 1985). Sin embargo, tiene un gran número de problemas agronómicos, especialmente relacionados con su alta susceptibilidad a infecciones de distintos tipos de parásitos que atacan a la planta por diferentes vías (Sowell & Shiverly, 2012). El comercio y negocio de la naranjilla dependen principalmente de las exportaciones del fruto hacia mercados internacionales. Sin embargo, su aceptación en dichos mercados está limitada por su baja productividad (incapacidad de solventar la demanda) y altos residuos químicos provenientes de pesticidas, fungicidas y herbicidas usados a causa de la alta vulnerabilidad de la planta hacia diversas enfermedades (Andrade, 2004). Para tratar de solventar dicho problema, se ha buscado realizar cruces interespecíficos entre distintas variedades de *S. quitoense* con sus parientes cercanos para generar plantas híbridas con un mejor desempeño (INIAP, 2000). Como resultado se ha logrado obtener especímenes con un mayor rendimiento y que presentan resistencia a un cierto grupo de patógenos (INIAP, 2003). No obstante, dichas variedades no terminan de solventar todos los problemas presentes en la especie y en algunos casos se han generado híbridos infértiles (Sowell & Shiverly, 2012). Por ende, el cruzamiento interespecífico de variedades de naranjilla puede no resultar la mejor metodología de mejoramiento genético de la especie, debido a que en un estudio previo demostró que existe reducida variabilidad genética en las poblaciones de *S. quitoense* y sus parientes andinos (Torres *et al.*, 2008). Por lo tanto, es necesario implementar nuevas y diferentes estrategias de mejoramiento genético de la especie. Para lograr dicho propósito, es importante establecer protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de naranjilla que contribuyan, promuevan y faciliten futuros estudios de mejoramiento genético, propagación y conservación de la especie. Este trabajo describe diferentes alternativas para una regeneración eficiente de brotes de naranjilla *in vitro* a partir de tres tipos de tejidos bajo distintas concentraciones hormonales.

#### **4. Área de estudio**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA) de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Las semillas de naranjilla se las obtuvo de plantas crecidas en la Granja Experimental Tumbaco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

## 5. Materiales

### 5.1. Material vegetal

- Semillas de naranjilla obtenidas del INIAP

### 5.2. Desinfección de semillas

- Alcohol etílico 70%
- Hipoclorito de sodio 2.5%
- Tween-20
- Vasos de precipitación de 500 ml
- Cajas Petri de vidrio
- Agua destilada esterilizada
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)

### 5.3. Germinación de semillas *in vitro*

- Cajas Petri de vidrio
- Pinzas
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962)

### 5.4. Subcultivo

- Plántulas de naranjilla de 30 días de edad germinadas *in vitro*
- Pinzas
- Bisturí
- Medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962)
- Cajas Petri estériles
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)

### 5.5. Ensayos de organogénesis

- Hojas, peciolo e hipocotilo provenientes de plantas de naranjilla subcultivadas *in vitro*, 30 días de edad
- Medios de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con varias combinaciones hormonales (0.1, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 0.0.1, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 y 2.0 mg L<sup>-1</sup> ANA + 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 mg L<sup>-1</sup> BAP)
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)
- Pinzas
- Bisturí
- Cajas petri estériles
- Alcohol 70%

## **5.6. Ensayos de elongación y enraizamiento de retoños**

- Retoños de naranjilla obtenidos en la fase de organogénesis
- Medio de cultivo MS basal (Murashigne & Skoog, 1962)
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO)

## **5.7. Aclimatación de plántulas**

- Macetas rectangulares
- Tierra autoclavada convencional
- Invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ

# **6. Metodología**

## **6.1. Material vegetal**

Se obtuvo frutos maduros de naranjilla de la Granja Experimental del INIAP en Tumbaco-Ecuador. De ellos se extrajo las semillas con el uso de una cuchara y un tamiz. Luego las semillas fueron lavadas en agua corriente hasta eliminar completamente el mucílago adherido a ellas. Finalmente, se las puso a secar sobre papel periódico a temperatura ambiente por 2 días.

## **6.2. Germinación *in vitro* de semillas de naranjilla**

Las semillas fueron desinfectadas dentro de una cámara de flujo laminar con 70% de etanol por tres minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 2,5% más Tween-20 por 20 minutos y cinco enjuagues con agua destilada esterilizada. Posteriormente, las semillas fueron transferidas a un medio de cultivo basal Murashige & Skoog (MS) (Murashigne & Skoog, 1962) con 3% de sacarosa, pH 5.8. Se sembró 15-20 semillas por frasco en un total de 10 frascos que contenían 50 mL de medio basal MS. Se las incubó en el cuarto de cultivo a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 horas durante 30 días.

## **6.3. Brotación de yemas apicales**

Las yemas apicales se obtuvieron de plántulas de naranjilla de dos meses de edad germinadas *in vitro*. Las yemas fueron cortadas con un bisturí, dejando un medio centímetro de tallo en la parte basal de la yema. Luego se las sembró en cajas Petri de plástico conteniendo 25 mL de medio de cultivo MS (Murashigne & Skoog, 1962) suplementado con

3% de sacarosa y ácido 1-naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1) y con un pH del medio de 5.8. Se colocaron 5 yemas por caja Petri, tres cajas por tratamiento. Las yemas fueron incubadas durante 4 semanas a una temperatura de 23 ± 1°C y 16 horas de fotoperiodo. Los datos se tomaron a partir de los 30 días de cultivo respecto a número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas. Este ensayo se realizó por triplicado.

#### **6.4. Regeneración de brotes a partir de hipocotilos**

Se obtuvieron segmentos de 1 cm de longitud de hipocotilos curvos y rectos a partir de plántulas de naranjilla germinadas *in vitro* de dos y tres semanas de edad respectivamente. Se colocó cinco segmentos de los dos tipos de hipocótilos en cajas petri de plástico conteniendo 25 mL de medio MS (Murashigne & Skoog, 1962) suplementado con 3% de sacarosa y benziladenina (BAP) en concentraciones de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0 mg L<sup>-1</sup>, más 0.01 mg L<sup>-1</sup> de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Figura 2). Se preparó 3 cajas por tratamiento. Posteriormente, se las incubó en un cuarto de cultivo a una temperatura de 23 ± 1°C con 16 horas de fotoperiodo. A los 30 días de cultivo se midió el número y tamaño de brotes y el número y tamaño de hojas. Este ensayo se realizó por duplicado.

#### **6.5. Regeneración de brotes a partir de peciolo**

Se obtuvieron segmentos de peciolo de aproximadamente 1 cm de longitud, de los tercios superior e inferior de plántulas de naranjilla de dos meses de edad germinadas *in vitro*. Se cultivó 5 segmentos de peciolo en cajas Petri de plástico conteniendo 25 ml de medio MS (Murashigne & Skoog, 1962) suplementado con 3% de sacarosa y concentraciones de ANA de 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>, combinado con BAP en concentraciones de 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 mg L<sup>-1</sup> y concentraciones de GA<sub>3</sub> de 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3). Se preparó 3 cajas por tratamiento. Posteriormente, se las incubó en un cuarto de cultivo a 23 ± 1°C con 16 horas de fotoperiodo. A los 30 días de cultivo se midió el número y tamaño de brotes y el número y tamaño de hojas. Este ensayo se realizó por duplicado.

#### **6.6. Elongación y enraizamiento de brotes de naranjilla**

Los brotes de naranjilla, obtenidos en los tres ensayos anteriores, se los individualizó con pinzas y bisturí y luego se los transfirió a frascos de vidrio de 10 cm de diámetro, conteniendo 50 mL de medio MS (Murashigne & Skoog, 1962) basal sin reguladores de crecimiento, para su elongación y enraizamiento. Se incubó en el cuarto de cultivo a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con 16 horas de fotoperiodo hasta que las plantas desarrollaron raíces y alcanzaron un tamaño aproximado de 7 a 9 cm de longitud en un tiempo cercano a 4 semanas.

### **6.7. Aclimatación de plántulas de naranjilla**

Las plántulas de naranjilla enraizadas en medio MS (Murashigne & Skoog, 1962) fueron extraídas del medio y sus raíces lavadas con agua corriente para eliminar los restos del agar. Luego fueron plantadas en macetas rectangulares, previamente desinfectadas con cloro y jabón y conteniendo tierra negra autoclavada convencional obtenida del Invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Posteriormente se cubrió las macetas con papel plástico transparente, para conservar la humedad, utilizando sorbetes de plástico como soportes y cinta adhesiva masking para sellar completamente las macetas (Figura 4). Se realizaron 3 orificios en la cubierta de plástico cada tres días durante un mes, luego de lo cual se retiró el plástico completamente. Durante el ensayo se regó las macetas con agua dos veces por semana. Se determinó el porcentaje de supervivencia de las plántulas obtenidas a partir de explantes de peciolo e hipocotilo durante 60 días, donde se tomó datos cada 4 semanas.

### **6.8. Diseño experimental y análisis de datos**

En el experimento de brotación de yemas apicales, el único factor de diseño fue la hormona ANA y sus niveles (concentraciones) fueron: 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2  $\text{mg L}^{-1}$ . En este experimento se utilizaron 3 réplicas para cada nivel con 5 observaciones (explantes) por réplica. El ensayo se dispuso en un diseño de bloques completos al azar.

Para el experimento de regeneración de brotes a partir de hipocotilo, los factores seleccionados fueron: 1. “tipo de hipocotilo”, 2. “concentración de ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )”, 3. “concentración de  $\text{GA}_3$  ( $\text{mg L}^{-1}$ )” y 4. “concentración de BAP ( $\text{mg L}^{-1}$ )”. Los niveles para el primer factor fueron hipocotilo recto y curvo; para el segundo factor: 0.01  $\text{mg L}^{-1}$ ; para el tercero 0.1  $\text{mg L}^{-1}$ ; y para el cuarto: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0  $\text{mg L}^{-1}$ . Por tanto, correspondió a un diseño experimental  $2 \times 1 \times 1 \times 5$  dispuesto en un diseño de bloques completos al azar. En este experimento se utilizaron 2 réplicas de cada nivel.

Para el experimento de regeneración de brotes a partir de peciolos, los factores fueron: 1. “Parte de la planta” (donde se obtuvieron los peciolos), 2. “Concentración de ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )”, 3. “Concentración de  $\text{GA}_3$  ( $\text{mg L}^{-1}$ )” y 4. “Concentración de BAP ( $\text{mg L}^{-1}$ )”. Los niveles para el primer factor fueron tercio superior y tercio inferior de la planta; para el segundo: 0.01, 0.02 y 0.03  $\text{ng/L}$ ; para el tercero 0.5 y 1.0  $\text{mg/L}$ ; y para el cuarto: 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0  $\text{mg/L}$ . Por lo tanto, correspondió a un experimento factorial  $2 \times 3 \times 2 \times 3$ , dispuesto en un diseño de bloques completos al azar. En este experimento se utilizaron 2 réplicas de cada nivel.

Para todos los experimentos, las variables de respuesta medidas fueron: número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas.

Los datos de todos los experimentos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un Modelo Lineal Generalizado con bloques y adicionalmente para encontrar las diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba de comparación pareada de Tukey. Adicionalmente, se utilizó una prueba independiente para comparar las medias entre los tres diferentes tejidos estudiados. Todos estos análisis se realizaron utilizando el software MiniTab 17 (Minitab 17 Statistical Software, 2010).

## **7. Resultados**

### **7.1. Brotación de yemas apicales**

Se analizó el efecto de diferentes concentraciones de ácido 1-naftelen acético (ANA) sobre la brotación de yemas apicales de naranjilla (Figura 1). Las variables medidas fueron porcentaje de regeneración de brotes, tamaño de brotes y número y tamaño de hojas a los 30 días de iniciado el ensayo. En a la regeneración de brotes, todas las yemas cultivadas mostraron un 100% de regeneración de brotes, independientemente de la concentración de ANA aplicada. Sin embargo, para el resto de variables, en un medio MS con 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  ANA, se obtuvieron tamaños promedio de brotes de 2,77 cm de longitud ( $p < 0,001$ ), 7,2 hojas por brote ( $p < 0,001$ ) y hojas con un tamaño promedio de 0.86 cm ( $p = 0.01$ ) (Tabla 1; Tabla 2).

### **7.2. Regeneración de brotes a partir de hipocotilos**

En este ensayo se sometió hipocotilos de 2 y 3 semanas (curvos y rectos, respectivamente) a una dosis fija de ANA y  $\text{GA}_3$  (0.01  $\text{mg L}^{-1}$  ANA + 0.1  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$ ), combinado con cinco diferentes concentraciones de BAP en medio basal MS con el objetivo

de regenerar brotes de naranjilla (Figura 2). Las variables analizadas fueron número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas.

Se encontró diferencias significativas en la respuesta de los hipocotilos rectos en comparación con los curvos a las combinaciones hormonales probadas, siendo los hipocotilos rectos estadísticamente mejores en las variables número de brotes, con un promedio de 1.01 brote ( $p=0.001$ ), y número de hojas, con una media de 2.22 hojas ( $p=0.001$ ) (Tabla 3; Tabla 4).

La mayor regeneración de brotes se observó en un medio suplementado con MS +  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> + 5.5 mg/L de BAP con brotes de 0.39 cm de longitud en promedio ( $p= 0.002$ ) y 2.73 hojas por brote ( $p= 0.016$ ) (Tabla 5; Tabla 6). En el caso de los explantes curvos, las diferentes combinaciones hormonales probadas indujeron, estadísticamente, una igual respuesta en las cuatro variables medidas (Tabla 6).

### **7.3.Regeneración de brotes a partir de peciolo**

En este ensayo se analizó el efecto de diferentes combinaciones de hormonas vegetales (ANA, GA<sub>3</sub> y BAP) en la regeneración de brotes a partir de peciolo ubicados en los tercios superior e inferior de las plántulas de naranjilla (Figura 3).

Bajo un nivel de confianza del 95%, entre los dos tipos de peciolo estudiados, se pudo determinar que los peciolo del tercio superior de la planta produjeron una mayor regeneración que los explantes provenientes del tercio inferior de la misma en las cuatro variables estudiadas. Adicionalmente, los peciolo del tercio superior de la planta produjeron en promedio 2.24 brotes de 0.42 cm de longitud y 5.03 hojas de 0.22 cm de largo (Tabla 7). Adicionalmente, mediante el análisis de ANOVA, se detectó diferencias significativas en la respuesta de los peciolo del tercio superior y del tercio inferior en todas las variables evaluadas: número de brotes ( $p=0.004$ ), tamaño de brotes ( $p=0.001$ ), número de hojas ( $p=0.037$ ) y tamaño de hojas ( $p=0.001$ ) (Tabla 8).

También, para los peciolo del tercio superior de la planta, se observó que existen diferencias significativas entre las combinaciones de hormonas para todas las variables estudiadas. Para la variable “número de brotes” ( $p< 0.001$ ) (Tabla 9), la combinación de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA, más  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> y  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP produjo una mayor respuesta con una media de 5.1 brotes por explante (Tabla 10). En cambio, para el resto de variables (tamaño de

brotos y número y tamaño de hojas) ( $p=0.000$ ) (Tabla 9), la combinación de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA, más  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  y  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP generó una mayor respuesta con brotes de  $0.92 \text{ cm}$  de longitud promedio,  $12.65$  hojas con  $0.41 \text{ cm}$  de longitud (Tabla 10; Figura 5). Con respecto a los peciolos del tercio inferior de la planta, estos mostraron una menor capacidad regenerativa comparado con los del tercio superior, por lo que no se les consideró dentro del análisis en este ensayo (Figura 5).

En cuanto al análisis factorial, se pudo observar que entre los factores BAP,  $\text{GA}_3$ , ANA y parte de la planta (con sus respectivos niveles), únicamente la variable “número de brotes” resultó ser estadísticamente significativa para un segundo orden de interacción ( $p=0.041$ ) (Tabla 11; Tabla 12). Por otro lado, las variables “tamaño de brotes” ( $p=0.012$ ), “número de hojas” ( $p=0.000$ ) y “tamaño de hojas” ( $p=0.000$ ) (Tabla 11) mostraron un comportamiento lineal o de primer orden, sin ninguna interacción entre sus factores (Tabla 12).

Bajo un nivel de confianza del 95%, la única interacción estadísticamente significativa para la variable “número de brotes” resultó ser entre los factores “BAP” con “ $\text{GA}_3$ ” ( $p=0.018$ ) y “ $\text{GA}_3$ ” con “ANA” ( $p=0.017$ ) (Tabla 12). Por lo tanto, las concentraciones óptimas para cada interacción se presentan al combinar  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  +  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  +  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA (Figura 6).

En contraste, para los resultados de primer orden o aquellas variables donde no se presentó una interacción de segundo orden o superior, solo se puede evaluar la contribución de los efectos principales o, en otras palabras, el efecto individual de cada hormona por separado. Bajo un nivel de confianza del 95%, tanto para la variable “tamaño de brotes” como para “tamaño de hojas”, el único factor que generó cambios estadísticamente significativos fue “ANA” ( $p=0.001$  y  $p<0.001$  respectivamente) (Tabla 12). Estas dos variables mostraron un incremento de regeneración al momento de utilizar una concentración de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 7 y Figura 8). La influencia de las hormonas BAP y  $\text{GA}_3$  no fue considerada dentro del análisis, debido a que su influencia no es estadísticamente significativa para las dos variables mencionadas anteriormente (Tabla 12). Para la variable “número de hojas”, las hormonas “BAP”, “ $\text{GA}_3$ ” y “ANA” mostraron ser estadísticamente significativas de manera independiente y no en combinación, por lo que su efecto regenerativo se incrementó al utilizar concentraciones de  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{GA}_3$  y  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA (Figura 9).



#### **7.4. Comparación del desempeño entre explantes estudiados**

Mediante una prueba-t independiente, se pudo evaluar las diferencias entre las medias totales de las combinaciones hormonales en cada uno de los tres explantes estudiados: yemas apicales, hipocotilos y peciolos. Por lo tanto, bajo un nivel de confianza del 95% se observó que el explante con mayor efecto para las variables número de brotes y hojas fueron peciolos, mientras que para la variable tamaño de brotes y hojas fueron las yemas apicales (Tabla 13; Figura 10).

#### **7.5. Elongación y enraizamiento de brotes**

Todos los brotes que fueron transferidos a frascos con medio basal MS con 3% de sacarosa mostraron la formación de raíces y una elongación igual o superior a los 7 cm de longitud después de un periodo de 30 días bajo condiciones de 16 horas de fotoperiodo a temperatura ambiente.

#### **7.6. Aclimatación de plantas**

La eficiencia de aclimatación de los brotes *in vitro* a tierra, se evaluó calculando el porcentaje de supervivencia de plántulas de naranjilla obtenidas únicamente a partir de hipocotilos y peciolos. Los brotes de yemas apicales se excluyeron para este análisis. Las plantas provenientes de peciolos tuvieron 97% de supervivencia en tierra. Las plántulas provenientes de explantes del tercio inferior de la planta, resultaron significativamente mejores a los del tercio superior de la misma (Tabla 14). Para plantas provenientes de explantes de hipocotilos, no se evidenció diferencias significativas entre las plántulas que provenían de hipocotilos curvos y rectos, ya que se obtuvo un 100% de supervivencias de plantas para todas las combinaciones de hormonas, excepto para la combinación de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> +  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, donde se obtuvo un porcentaje del 60% (Tabla 15).

### **8. Discusión**

#### **8.1. Brotación a partir de yemas apicales**

Para este experimento, se utilizó la parte apical de la planta como tejido para la brotación de nuevos retoños. Se definió el explante de yema apical como la constitución de un

pequeño segmento de tallo, pocos primordios foliares y el meristemo apical intacto (Hawkings-Smith y Murashige, 1970) -cabe recalcar que no se incluyeron meristemos axilares en este ensayo-. La selección de yemas apicales como explante inicial para regeneración de retoños, se basa en que éstas generalmente se utilizan para la micropropagación clonal de plántulas, ya que se lo puede realizar de manera fácil y rápida, en comparación con otros tejidos vegetales (Nehra y Kartha, 1994). Por otro lado, la selección de ANA como el único regulador de crecimiento en este ensayo, se debe a que en estudios previos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ se determinó que el uso exclusivo de la auxina ANA tiene un efecto positivo para el crecimiento de brotes provenientes de meristemos apicales como explantes iniciales. Sustentando lo anterior, en un estudio se menciona que el meristemo apical podría no ser una fuente productora propia de auxinas, por lo que la adición de auxinas exógenas podría ser un elemento clave para fomentar su desarrollo y crecimiento (Hawkings-Smith y Murashige, 1970). Este fenómeno está basado en que las auxinas se encuentran directamente relacionadas con la regulación del crecimiento y elongación en las plantas (Velásquez *et al.*, 2016). Por lo tanto, el propósito de utilizar solamente ANA en un medio de cultivo es buscar inducir la regeneración directa de un brote por la acción de la yema apical como principal protagonista -al promover el crecimiento del meristemo apical- y sin la necesidad del crecimiento de brotes adventicios. Adicionalmente, la no adición de citoquininas exógenas en este ensayo se debe a que se ha reportado que estas pueden generar un efecto inhibitorio en el desarrollo normal de la yema apical en una planta completa. Esto, debido a que el meristemo podría suplir con cantidades adecuadas de citoquininas endógenas a los tejidos adyacentes o simplemente no los requiere como reguladores de crecimiento (Hawkings-Smith y Murashige, 1970). Por ello, es necesario buscar alternativas para regenerar de manera sencilla brotes que adquieran un tamaño significativo para su micropropagación, por lo que cultivar explantes de yemas apicales con la hormona ANA resultarían una combinación candidata para lograrlo.

Para la micropropagación de *S. quitoense* y sus parientes cercanos a partir de yemas apicales, estudios previos han optado como técnica preferente la vía organogénesis indirecta. Por ejemplo, Te-chato (1988) reportó que para promover la elongación de brotes adventicios a partir de tejidos con meristemos apicales provenientes de plantas de *S. quitoense*, es necesario una combinación entre los reguladores de crecimiento ANA y BA, obteniendo plantas de hasta 5 mm en concentraciones de 0.01 mg L<sup>-1</sup> y 0.1-1.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

En otro estudio, se evaluó la regeneración de yemas apicales de *S. sessiliflorum* en un medio MS con 0.01-0.1 mg L<sup>-1</sup> AIA y 20 mg L<sup>-1</sup> KIN, generando brotes adventicios con un tamaño no superior a los 5mm (Schuelter *et al.*, 2009). Sin embargo, estos últimos autores resaltan la necesidad de explorar otras alternativas de regeneración de brotes que generen plántulas con mayor tamaño para facilitar la micropropagación de las mismas.

Adicionalmente, no se han reportado publicaciones donde muestren metodologías de micropropagación directa de *S. quitoense* y sus parientes cercanos a partir de explantes de yemas apicales. Por otro lado, en *S. tuberosum*, se ha reportado que la micropropagación directa de la planta es altamente recomendable para una propagación clonal rápida y eficiente de plantas viables que sirvan para la conservación del germoplasma y futuros ensayos de transformación genética (Vinterhalter *et al.*, 2008). Quraishi *et al.* (1994), mediante cultivo de segmentos apicales en *S. tuberosum*, obtuvo hasta un 70% de regeneración de brotes con aproximadamente 6 nodos en un medio MS suplementado con 50 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. En contraste, con los resultados obtenidos en este trabajo, se muestra que al colocar explantes de yemas apicales de plantas de *S. quitoense* en un medio MS suplementado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA se obtuvo 100% de regeneración de brotes con tamaño promedio de 2.77 cm de longitud después de un mes en dicho medio (Tabla 1). Adicionalmente, esta misma concentración probada fue estadísticamente superior en todas las variables analizadas (Tabla 2). Esto podría mostrar que, para brotación plantas de naranjillas a partir de yemas apicales, la elongación de brotes se puede lograr de manera efectiva utilizando ANA como único regulador de crecimiento.

## **8.2. Regeneración de brotes a partir de hipocotilos**

En cuanto a los resultados obtenidos en este ensayo, la mejor respuesta para a la regeneración de brotes, se obtuvo en los hipocotilos rectos de 3 semanas de edad, comparado a los hipocotilos curvos de 2 semanas de edad para las variables tamaño de brotes y número de hojas. Este fenómeno puede estar asociado con la carga y balance hormonal endógena de estos tejidos (Grattapaglia & Machado, 1998; Schuelter *et al.*, 2009).

Adicionalmente, la contribución de las hormonas ANA y GA<sub>3</sub> en este estudio no se pudo evaluar dado que todos los tratamientos incluyeron la misma concentración de estos reguladores (0.01 mg L<sup>-1</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup> respectivamente). Sin embargo, un estudio exploratorio

previo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la universidad mostró que estas dos concentraciones son las mejores para la regeneración de brotes dentro de las cuatro variables evaluadas. Además, la necesidad de incluir una auxina radica en que estas pueden estar directamente relacionadas con la elongación de brotes (Velásquez *et al.*, 2016), mientras la adición de la hormona GA<sub>3</sub> puede favorecer el crecimiento de brotes, ya que, tal como lo indican Hendrix *et al.* (1987), puede estar principalmente relacionada con el tamaño de los brotes pues induce elongación de los entrenudos, justificando su uso dentro del ensayo.

Los resultados de este ensayo difieren a los obtenidos en experimentos realizados por Schuelter *et al.* (2009) y Te-chato (1988), quienes utilizan diferentes balances hormonales de KIN con AIA y BAP con ANA respectivamente, reportan aproximadamente 3 y 2 brotes por explante correspondientemente, mientras que el promedio obtenido en este estudio fue de 1.3 brotes. En un estudio realizado por Saglam (2010), se muestra que la combinación entre diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento BAP con ANA en explantes de cotiledones de la planta *Onobrychis sativa*, genera una disminución significativa en la regeneración de brotes por explante comparado con el desempeño de la adición solamente de citoquina en un medio MS. También, en un estudio ejecutado por Kumlay y Ercisli (2015) en papas (*Solanum tuberosum*) demuestran que la adición de ANA a un medio MS con citoquinas, genera una disminución significativa en la regeneración de brotes, mientras que solo la combinación de las hormonas BAP con GA<sub>3</sub> genera un aumento notorio en la producción de nuevos retoños. Complementando lo anterior, un trabajo realizado por Singh *et al.* (2014) muestra que, para explantes de hipocotilos en plantas de *Psophocarpus tetragonolobus*, la combinación entre los reguladores BAP con ANA genera un menor número de brotes por explante que utilizando una combinación con IAA. Todo esto indica que probablemente combinar BAP con ANA no sea una estrategia eficiente para regenerar nuevos retoños a partir de explantes de hipocotilos en ciertas especies, por lo cual se sugiere explorar otras alternativas hormonales si se busca una mayor regeneración de brotes adventicios en *S. quitoense*.

### **8.3. Regeneración de brotes a partir de peciolo**

En este ensayo, igual que en el caso anterior, todas las combinaciones de hormonas probadas indujeron la regeneración de retoños a partir de peciolo tanto del tercio superior como inferior de las plántulas de naranjilla germinadas *in vitro*. Sin embargo, las mejores

respuestas se observaron para los peciolo del tercio superior de la planta. Así, en las variables número de brotes y tamaño de los brotes, las mejores combinaciones hormonales fueron  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> + 3.5 y  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP respectivamente, donde se obtuvo hasta 5 brotes por explante (Tabla 10). Hendrix *et al.* (1987) demostraron que, al utilizar segmentos de hoja, la mejor respuesta para una regeneración de brotes adventicios se obtuvo en un medio MS suplementado con  $23 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN +  $0.57 \text{ mg L}^{-1}$  de IAA en plantas de *S. quitoense*. Por otro lado, Schuelter *et al.* (2009) mencionan que para explantes de peciolo, la respuesta más alta en cuestión de regeneración de brotes se obtuvo en un medio MS con  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  IAA +  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN, donde se obtuvo 1.5 brotes por explante. En contraste, en este trabajo se pudo evidenciar que al incluir bajas concentraciones de citoquinina (BAP) y auxina (ANA) en combinación con GA<sub>3</sub> se puede lograr una regeneración significativa de retoños.

Adicionalmente, mediante un análisis de interacciones entre factores, se pudo evidenciar el efecto al combinar los reguladores de crecimiento entre sí para las cuatro variables estudiadas. Para la variable “número de brotes”, se puede inferir que la adición de una tercera hormona como GA<sub>3</sub> puede potenciar la regeneración de un mayor número de brotes por explante. Esto se explica, debido a que el regulador de crecimiento GA<sub>3</sub> interactúa directamente con las hormonas BAP y ANA, mientras que estas dos últimas, al no interactuar entre sí, no generan cambios significativos entre ellas al momento de combinarlas. De manera específica, se puede decir que la mayor regeneración se da en concentraciones de  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> (Figura 6). Esto es un evento esperado, debido a que se conoce que las giberelinas están implicadas en varios procesos de desarrollo y crecimiento de la planta (Khalloufi *et al.*, 2017). También, este resultado concuerda con lo mencionado por Jarret *et al.* (1980), donde muestra que GA<sub>3</sub> es un elemento crítico para la regeneración y desarrollo de retoños en plantas de *S. tuberosum* cultivadas en un medio MS. Por otro lado, la poca interacción entre BAP y ANA está reportada previamente en el trabajo de Velásquez *et al.* (2016), donde se observa que estas dos hormonas en conjunto generan un efecto reducido en la regeneración de brotes, por lo que puede explicar por qué estas interactúan únicamente con la hormona giberelina de manera independiente. Además, este estudio concuerda con el de Salem y Hassanein (2017), donde se evidencia que al usar un medio MS suplementado con una concentración de BAP más alta que GA<sub>3</sub>, se favorece la regeneración de varios brotes en explantes de hojas de *S. tuberosum*.

Sin embargo, también difiere con el trabajo de Li *et al.* (2008), donde relacionan la interacción entre auxina-giberelina con el control del crecimiento basal de la planta, donde GA<sub>3</sub> aumenta la actividad de la auxina en la parte basal del meristemo apical. De la misma manera, Ross *et al.* (2002), en plantas de pera (*Pisum sativum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), menciona que, dentro del crecimiento de la planta, la presencia de auxina incrementa el nivel de giberelinas bioactivas y que, a su vez, estas dos hormonas tienen una relación directa en el crecimiento apical y elongación de los internodos

Para la variable de “número de hojas”, a diferencia de las otras tres variables analizadas, las tres hormonas utilizadas presentaron diferencias significativas de manera independiente, esto quiere decir que no interactuaron entre sí, por lo que solo se evalúa su efecto por separado. Este fenómeno puede estar explicado, debido a que, según Fambrini y Pugliesi (2013), el origen de desarrollo de las hojas está dividido en dos fases del desarrollo morfológico, donde la primera depende significativamente de la división celular y la segunda del desarrollo de una correcta diferenciación de células especializadas. En sí, las citoquinas actúan dentro de este proceso al promover la identidad de las células meristemáticas, mientras que las auxinas y giberelinas son necesarias para la división celular y elongación de los órganos vegetativos. Por ende, estas tres hormonas son elementales para dar origen a las hojas y, a su vez, se manifiestan en distintas etapas del desarrollo del órgano vegetativo. Finalmente, para las variables “tamaño de brotes y hojas”, la única hormona que tiene una significancia estadística es ANA. Esto tiene sentido, debido a que, como se discutió anteriormente, la hormona ANA tiene un importante rol en el crecimiento apical y meristemático de la planta, como también en la elongación de ésta (Clifford, 1997; Cline, 1994; Eshel & Teper-Bamnolker, 2012).

#### **8.4. Comparación del desempeño entre explantes**

Mediante un análisis de comparación de medias por una prueba-T, se pudo comparar el desempeño de los tres explantes utilizados en los medios con hormonas, con respecto a la regeneración de brotes. Con los resultados obtenidos, los peciolo resultaron superiores a los explantes de yemas apicales e hipocotilos para las variables “número de brotes y hojas”, mientras que las yemas apicales resultaron ser superiores para las variables “tamaño de brotes y hojas”. Los hipocotilos se resultaron inferiores en todas las variables evaluadas. Como se discutió anteriormente, la adición de GA<sub>3</sub> en el cultivo de peciolo, pudo haber sido un

elemento clave para potenciar la regeneración de nuevos brotes y el incremento del número de hojas (Khalloufi *et al.*, 2017; Salem y Hassanein, 2017). De la misma manera, para yemas apicales, al mantener el meristemo apical intacto y con la adición de la auxina como único regulador de crecimiento, se promovió la elongación y aumento de tamaño de la planta (Velásquez *et al.*, 2016; Cline, 1994). Por otro lado, el bajo desempeño de regeneración de brotes por parte de los hipocotilos pudo darse por una interacción pobre o efecto reducido entre las hormonas BAP y ANA, influyendo directamente en el desarrollo y tamaño de los brotes (Saglam, 2010; Singh *et al.*, 2014). Este estudio muestra que para regenerar un mayor número de brotes se debería utilizar peciolo, mientras que, para obtener brotes y hojas con mayor tamaño, se debería utilizar yemas apicales.

## 9. Conclusiones

- Dentro del ensayo de yemas apicales, el mejor medio para las variables tamaño de brotes, como también número y tamaño de hojas fue MS suplementado con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA con promedios de brotes de 2.77 cm y 7.2 hojas con 0.86 cm de longitud.
- En el ensayo de hipocotilos, los hipocotilos rectos (3 semanas de edad) fueron estadísticamente superiores a los hipocotilos curvos (2 semanas de edad) dentro de las cuatro variables estudiadas. También, el medio MS suplementado con  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> +  $5.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP produjo una mayor regeneración en las variables tamaño de brotes y tamaño de hojas con promedios de 0.39 cm y 2.73 respectivamente.
- Para el ensayo de peciolo, aquellos que provienen del tercio superior de la planta, mostraron una mayor capacidad regenerativa que los del tercio inferior. También, el medio MS suplementado  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> +  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP fue estadísticamente superior en la variable número de brotes con 5.1 brotes por explante, mientras que el medio MS suplementado con  $0.02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA +  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> +  $4.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP tuvo un mayor efecto en el resto de variables evaluadas con promedios de 0.92 cm, 12.65 hojas con 0.41 cm.
- En explantes de peciolo, GA<sub>3</sub> cumple un rol importante dentro de la regeneración de nuevos retoños al interactuar con ANA y BAP, mientras que ANA por sí sola cumple un papel significativo en el tamaño de brotes y hojas.
- Dentro de este estudio, los peciolo pueden generar un mayor número de brotes y de hojas, mientras que las yemas apicales promueven la regeneración de brotes y hojas con mayor tamaño.

## 10. Recomendaciones

Para futuros ensayos de regeneración in vitro de plantas, se recomienda utilizar explantes provenientes de plantas propagadas clonalmente, más no de aquellas propagadas por semillas, para estandarizar la respuesta a las hormonas y disminuir el efecto del genotipo.

También, es importante implementar diseños experimentales donde se incluya la interacción de factores, con el objetivo de poder evidenciar y estudiar el efecto solitario o en conjunto de las hormonas con respecto a cada explante utilizado.

Es necesario explorar distintas combinaciones de otros reguladores de crecimiento a los utilizados en este estudio para analizar si el efecto de éstos incrementa o mejora la regeneración de nuevos retoños.

Dentro de ensayos de hipocotilos, es necesario ampliar los gradientes de concentración de cada hormona (en el caso de ANA y GA<sub>3</sub>) con el propósito de mejorar e incrementar la regeneración de brotes.

## 11. Referencias

- Abdelnour, A.; & Escalant, J. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. *Laboratorio de Tejidos de CATIE*. 1-29.
- Acosta, O; Pérez, A.M: & Vaillant, F. (2009). Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol. 59. Págs.: 88-93.
- Andrade, R. (2004). Caracterización de las condiciones agrosocio-económicas de las familias productoras de naranjilla (*Solanum quitoense*) en la región Amazónica del Ecuador. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Bozzone, D. (1997). Using tissue culture to investigate plant cell differentiation and dedifferentiation. *Journal of Biological Education*. 31: 4.
- Castañeda, V. (1992). El lulo su cultivo, su conservación. Quito: Ediciones tecnológicas. Págs.: 93.
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*. 1: 3-9.
- Chong, L.; & Andrade, F. (2001). Exportación de Naranjilla en Conserva hacia los Estados Unidos y sus Efectos en la Economía Ecuatoriana. Guayaquil: ESPOL. Págs.: 40-50.
- Clements, C.; Alwang, J.; Barrera, V.; & Dominguez, J.M. (2016). Graft is good: the economic and environmental benefits of grafted naranjilla in the Andean region. *Renewable Agriculture and Food Systems*. Págs.: 1-13.
- Clifford, P. (1997). Apical dominance in higher plants. *Journal of Biological Education*. 31 (2): 86-89.
- Cline, M. G. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plan development. *Physiological Plantarum*. 90: 230-237.
- Dennis, F. G., Hemer, R. C., & Camacho, S. (1985). Naranjilla: A potential cash crop for the small Farmer in Latin America. *Acta Horticulture*. 158: 475-481.
- Díaz, D.; Córdoba, M.; Criollo, H.; & Lagos, T. Evaluación de medios de cultivo para propagación *in vitro* de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*. *Acta Agronómica*. 62 (1): p. 27-36.

- Escudero, N.; & López-Llorca, L. (2012). Effects on plantas growth and root-knot nematode infection of endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Springer Science and Business Media.
- Eshel, D.; & Terper-Bamnlker, P. (2012). Can loss of apical dominance in potato tuber serve as a marker of physiological age.
- Fambrini, M., & Pugliesi, C. (2013). Usual and unusual development of the dicot leaf: involvement of transcription factors and hormones. *Plant Cell Replication*. 32. 899-922.
- Flórez-Roncancio, V. (1997). Análisis hormonal en plantas: Tendencias Actuales. Colombia: Agronomía Colombiana, 14 (2). Págs.: 144-148.
- Grattapaglia, D., & Macado, M. A. (1998). Micropropagación. En: Cultura de Tejidos y Transformación Genética de Plantas. *EMBRAPA-CNPQ*. Brasilia: 183-247.
- George, E.; Hall, M.; & Klerk, G. (2008). *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists*. Plant Propagation by Tissue Culture. Springer. 3era edición. p. 205-212.
- Gisbert, C.; Prohens, J.; & Nuez, F. (2006). Efficient regeneration in two potential new crops for subtropical climates, the scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 34: 55-62.
- Hawkings-Smith, R., Murashige, T. (1970). In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *American Journal of Botany*. 57 (5): 562-568.
- Heiser, C. (1985). Ethnobotany of Naranjilla (*Solanum quitoense*) and Its Relatives. New York: Economic Botany 29. Págs.: 4-11.
- Heiser, C. (1972). The Relationships of the Naranjilla, *Solanum quitoense*. *Biotropica*: 4. Págs.: 77-84.
- Hendrix, R.; Litz, R.; & Kirchoff, B. (1987). In vitro organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl., *S. quitoense* Lam. (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 11: 67-73.
- INIAP. (2000). Híbrido interespecífico de alto rendimiento. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Boletín Divulgado No. 276.

- Jarem, R. L., Hasegawa, P. M., Erickson, H. T. (1980). Effects of medium components on shoot formation from cultured tuber discs of potato. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 105: 238-242.
- Jijón, R. (1982). Plagas del Cultivo de Naranjilla. Quito: INIAP. Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. Págs.: 34-44.
- Jiménez, J. (1982). Apuntes sobre el cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en la zona centro oriental del Ecuador. Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP. Quito. Págs.: 15-25.
- Khalloufi, M., Martínez-Andújar, C., Lachaal, M., Karray-Bouraoui, N., Pérez-Alfocea, F., & Albacete, A. (2017). *Journal of Plant Physiology*. 134-144.
- Koepfl, J.; Thimann, K.; Went, F. (1937). Phytohormones: structure and physiological activity. *Journal of Biological Chemistry*, 122 (3). Págs.: 763-780.
- Kumlay, A. M, & Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 29: 6. 1075-1084
- Li, X., Meng, G., Ha, F., Huo, L., Wang, J., Wang, S., Zheng, G., & Liu, H. (2008). Interactions of auxin and gibberellin in the control of basal growth of *Arabidopsis* Rosette Leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*. 57: 6. 815-825.
- .
- Medina, M.; Sepúlveda, N.; & Murillo, M. (2008). Regeneración *in vitro* de plantas a partir de explantes foliares del lulo Chocano, *Solanum sessiliflorum* Dunal vía organogénesis. *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó*. 27: 92-95.
- Minitab 17 Statistical Software. (2010). [Computer Software]. State College, PA: Minitab Inc. Obtenido en: [www.minitab.com](http://www.minitab.com)
- Morales, J. (2016). Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de la semilla de *Solanum caripense* Dunal, para la obtención de plantas libres de bacterias y hongos. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-481.
- Nehra N.S., Kartha K.K. (1994). Meristem and Shoot Tip Culture: Requirements and Applications. In: Vasil I.K., Thorpe T.A. *Plant Cell and Tissue Culture*. Dordrecht: 37-70.

- National Research Council. (1989). *Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. Washington D.C.: National Academy Press.
- Navarro, R. (1988). Enfermedades del lulo. Memorias del Primer Seminario Nacional del Cultivo de Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). págs.: 30-31.
- NEIVA. (2006). Manual Técnico Cultivo de Lulo (*Solanum quitoense* Lam) en el Departamento del Huila. Gobernación del Huila. Secretaría Técnica. Págs.: 7-24.
- Nishii, K.; Wang, C-N.; Spada, A.; Nagata, T.; & Moller, M. (2012). Gibberellin as a suppressor of lateral dominance and inducer of apical growth in the unifoliate *Streptocarpus wendlandii* (Gesneriaceae). *New Zealand Journal of Botany*. 50 (3): 267-287.
- Ochoa, J.; Gallegos, P; Asaquiba, Y.; Insuasti, M.; Galarza, M.; Jaramillo, V.; Vizúete, B.; Viera, W.; Viteri, J.; Williams, R.; Carrasco, I.; Martínez, A.; Ayala, G. (2000). Manejo integrado de plagas y enfermedades de frutales andinos. Santa Catalina: Informe Anual del Departamento de Protección Vegetal. INIAP. Págs.: 4-8.
- O'Connor, A.; Domínguez, A.; Keb-Llanes, M.; González, T.; & Peña, Y. (2010). Efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum americanum*.
- Padilla, F.; Sánchez, J.; Estévez, C. (1982). Enfermedades fungosas de la naranjilla encontradas en algunas zonas del Ecuador. Quito: INIAP. Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. Págs.: 83-87.
- Pastrana, E. 1998. Manejo Post-Cosecha y comercialización del lulo (*Solanum quitoense* Lam.). Serie de paquetes de capacitación sobre manejo post cosecha de frutas y hortalizas No. 11. Programa Nacional Nacional SENA de Capacitación en manejo Post-Cosecha y Comercialización de Frutas y Hortalizas, Convenio SENA. Colombia, Bogotá. Pág.: 396.
- Quraishi, A., Zubeda, C., Hamid, R., & Parvez K. (1994). Pre-basic seed potato production through tissue culture. *Pakistan Journal of Agriculture Resistance*. 15 (1): 8-12.
- Rodrigues, A.; & Oliveira, N. (1991). In vitro regeneration of several accessions of *Solanum topiro* Humb and Bonpl. and *S. sessiliflorum* Dun. (Cubio). *Pesq agropecuaria do brasil*. 26: 1931-1936.
- Ramírez, V.; & Duque, N. (2010). Respuesta del Lulo La Selva (*Solanum quitoense* x *Solanum hirtum*) a la aplicación de fermentados aeróbicos tipo bocashi y fertilizante químico. *Acta Agronómica*. Vol.: 59. Págs.: 155-161.

- Radice, S. (2010). Parte I Herramientas básica, Morfogénesis in vitro. Buenos Aires: INTA. Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Págs.: 27-29.
- Revelo, J.; & Sandoval, P. (2003). Factores que afectan la producción y productividad de la Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la región amazónica del Ecuador. Quito: INIAP.
- Rodríguez, V. (1986). Prácticas agronómicas para el cultivo de la Naranjilla Memorias del Curso “El cultivo de la Naranjilla en el Ecuador”. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Ecuador. Págs.: 13-18.
- Rodríguez, V.; & Camacho, B. (1992). Colección de Cultivares de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y especies relacionadas: Reporte preliminar. Instituto Nacional de Investigaciones agropecuarias. Quito. Págs.: 26-31.
- Ross, J. J., O'Neill, D. P, Wolbang, C. M., Symons, G. M., & Reid, J. B. (2002). Auxin-Gibberellin Interaction and Their Role in Plant Growth. *Journal of Plant Growth Regulation*. 20: 346-353.
- Saglam, S. (2010). Growth regulators effects on in vitro shoot regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24: 4. 2077-2079.
- Salas, J.; Parra, A.; Alvarez, C. (1991). Contribución al conocimiento de la ecología del perforador del fruto del tomate *Neoleucinodes elegantis* (Gene) (Lepidoptera: pyralidae). *Agronomía tropical* 41. Págs.: 26-32.
- Salem, J., & Hassanein, A.M. (2017). *In vitro* propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biologia Plantarum*. 61: 3. 427-437.
- Samaniego, V. (1982). El cultivo de la naranjilla (*Solanun quitoense* Lam) en la zona de Pastaza en el Ecuador. Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP. Quito. Págs.: 26-32.
- Schuelter, A.R.; Grunvald, A.K; Amaral Júnior, A. T.; da Luz, C. I.; Luz, C.I.; Goncalvez, L. M.; Stefanello, S.; & Scapim, C.A. (2009). *In vitro* regeneration of cocona (*Solanum sessiliflorum*, Solanaceae) cultivars for commercial production. *Genetics and Molecular Research*. Vol 8 (3): 963-975.
- Schultes, H., & Cuatrecasas, J. 1958. Notes on the cultivated lulo. Harvard University, Botanical Museum Leaflets. 16 (5): 97-105,
- Segovia, V. (2002). Optimización de la regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) orientada a la transformación genética de plantas. España: CIAT.

- Singh, V., Sigh-Chauhan, N., Singh, M., Idris, A., Madanala, R., Pande, V., & Mohanty, C. S. (2014). Establishment of an efficient and rapid method of multiple shoot regeneration and a comparative phenolics profile in in vitro and greenhouse-grown plants of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. *Plant Signaling & Behavior*. 9
- Smith, R. (2006). *Regulator Factors*. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press. 3era edición: 33-36.
- Sowell, A.; & Shively, G. (2012). Economic and environmental impacts of grafted naranjilla. *Forests, Trees and Livelihoods* 21. Págs.: 30-43.
- Soria, J. (1989). La naranjilla que actualmente se cultiva y consume en Ecuador. *Boletín Divulgación*. Quito. Págs.: 9-11.
- Soria, J. (1997). Mejoramiento genético de la “naranjilla” (*Solanum quitoense* Lam.) mediante cruzamiento interespecíficos. Quito: Abya-Yala. Uso y manejo de recursos vegetales.
- Soria Idrovo, N. (1996). Problemática de la Pre y Post-Cosecha de Frutales en Ecuador. Quito: PROCIANDINO. Manejo Pre y Post cosecha de Frutales y Hortalizas para Exportación.
- Tamayo, P. (2001). Enfermedades del Tomate de Árbol, la Mora y el Lulo en Colombia. CORPOICA, *Boletín Técnico* 12.
- Tandazo, A. (2015). Evaluación de medios de cultivo in-vitro para la inducción de callos y vástagos de naranjilla *Solanum quitoense* var. *Quitoense*. Quito: UCE-FCA. Págs.: 2-12.
- Te-chato, S. (1988). Tissue culture of lulo: I Plantlet regeneration from vegetative explants. *Crop Biotechnology*. 10: 4.
- Torres, A. F, Arias, A.S, Arahana, V., & Torroes, M.L. (2008). Preliminary Assessment of Genetic Diversity and Phenetic Relations for Section *Lasiocarpa* by Means of Heterologous SSR Markers. *Crop Science*. 48: 1.
- Valarezo, C.; & Samaniego, V. (1982). El cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en el área del proyecto Zamora-Nangaritza. *Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla*. INIAP. Quito. Págs.: 33-45.
- Velásquez, S. M., Barbez, E., Kleine-Vehn, J., & Estevez, J. M. (2016). Auxin and Cellular Elongation. *Plant Physiology*. 170: 1206-1215.

- Vélez, A. (1988). Plagas y Otros Insectos del Lulo o Naranjilla. Colombia: Memorias del Primer Seminario Nacional del Cultivo del Lulo. Secretaría de Agricultura de Antioquia.
- Vinterhalter, D., Dragicevic, I., & Branka Vinterhalter. (2008). Potato *in Vitro* Culture Techniques and Biotechnology. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 2 (1): 16-45.
- Whalen, M.; Costich, D.; & Caruso, E. (1981). Injertos con naranjilla silvestre (*Solanum quitoense*). Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP. Págs.: 80-81.

## 12. Tablas

**Tabla 1:** Efecto de diferentes concentraciones de ANA en la brotación de yemas apicales de naranjilla bajo los parámetros analizados.

Medio de cultivo	Número de brotes	Tamaño de brotes (cm)	Número de hojas	Tamaño de hojas (cm)
Concentración de ANA (mg/L)	Porcentaje	Promedio	Promedio	Promedio
0.01	100 %	1.19 b	5.12 b	0.74 ab
0.05	100 %	1.55 b	4.73 b	0.59 bc
0.1	100 %	2.77 a	7.20 a	0.86 a
0.15	100 %	1.50 b	4.67 b	0.69 abc
0.2	100 %	1.29 b	4.27 b	0.53 c

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey

**Tabla 2:** Valores de significancia P producto del análisis de varianza para el experimento de crecimiento de brotes a partir de explantes de yemas apicales

<i>Variable</i>	<i>Valor P</i>
Tamaño de brotes	0.000
Número de hojas	0.000
Tamaño de hojas	0.001

Los resultados obtenidos se realizaron bajo una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 3:** Efecto de la edad de los hipocotilos en la regeneración de plantas de naranjilla en los cuatro parámetros analizados.

Edad del hipocotilo	Número de brotes	Tamaño de brotes (cm)	Número de hojas	Tamaño de hojas (cm)
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
<b>Recto (3 semanas)</b>	1.01 a	0.25	2.22 a	0.20
<b>Curvo (2 semanas)</b>	0.57 b	0.23	1.32 b	0.18

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

**Tabla 4:** Resultados del análisis de varianza entre la comparación de explantes de hipocotilos rectos y curvos.

<b>Explantes de Hipocotilos</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor-P</b>
Número de brotes	0.001
Tamaño de brotes	0.750
Número de hojas	0.001
Tamaño de hojas	0.489

Los resultados obtenidos se realizaron bajo una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 5:** Efecto de diferentes combinaciones de hormonas ANA, GA<sub>3</sub> y BAP bajo los parámetros analizados mediante explantes de hipocotilos.

<b>HIPOCOTILOS CURVOS</b>				
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tamaño de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Tamaño de hojas (cm)</b>
<b>Concentración de ANA, GA<sub>3</sub>, BAP (mg/L)</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
0.01+0.1+4.0	0.70	0.17	1.01	0.16
0.01+0.1+4.5	0.35	0.14	0.90	0.10
0.01+0.1+5.0	0.60	0.37	1.80	0.18
0.01+0.1+5.5	0.70	0.22	1.40	0.25
0.01+0.1+6.0	0.50	0.26	1.50	0.19
<b>HIPOCOTILOS RECTOS</b>				
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tamaño de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Tamaño de hojas (cm)</b>
<b>Concentración de ANA, GA<sub>3</sub>, BAP (mg/L)</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
0.01+0.1+4.0	0.90	0.23 ab	2.35 ab	0.22
0.01+0.1+4.5	0.55	0.12 b	1.03 b	0.12
0.01+0.1+5.0	1.10	0.23 ab	2.15 ab	0.22
0.01+0.1+5.5	1.20	0.39 a	2.73 a	0.23
0.01+0.1+6.0	1.30	0.28 ab	2.83 a	0.22

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

**Tabla 6:** Resultados del análisis de varianza para las diferentes combinaciones hormonales del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de hipocotilos rectos y curvos.

<b>Hipocotilos Rectos</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor-P</b>
Número de brotes	0.180
Tamaño de brotes	0.002
Número de hojas	0.016
Tamaño de hojas	0.115
<b>Hipocotilos Curvos</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor-P</b>
Número de brotes	0.285
Tamaño de brotes	0.580
Número de hojas	0.471
Tamaño de hojas	0.618

Los resultados obtenidos se realizaron bajo una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 7:** Efecto del origen de los peciolo, en relación a su ubicación en el tercio superior o inferior de la plántula, en la regeneración de plantas de naranjilla en los cuatro parámetros analizados.

<b>Parte de la planta</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tamaño de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Tamaño de hojas (cm)</b>
	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
<b>Superior</b>	2.24 a	0.42 a	5.03 a	0.22 a
<b>Inferior</b>	1.77 b	0.32 b	3.73 b	0.18 b

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey.

**Tabla 8:** Resultados del análisis de varianza entre la comparación de explantes de peciolo del tercio superior e inferior de la planta.

<b>Explantes de Peciolo</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor-P</b>
Número de brotes	0.004
Tamaño de brotes	0.001
Número de hojas	0.037
Tamaño de hojas	0.001

Los resultados obtenidos se realizaron bajo una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 9:** Resultados del análisis de varianza del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolos del tercio superior e inferior de la planta.

<b>Tercio Superior</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor P</b>
Número de brotes	0.000
Tamaño de brotes	0.000
Número de hojas	0.000
Tamaño de hojas	0.000

Los resultados obtenidos se realizaron bajo una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%

**Tabla 10:** Efecto de diferentes combinaciones de hormonas ANA, GA3 y BAP bajo los parámetros analizados mediante explantes de peciolos del tercio superior de la planta

<b>TERCIO SUPERIOR</b>				
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tamaño de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Tamaño de hojas (cm)</b>
<b>Concentración de ANA, GA<sub>3</sub>, BAP (mg/L)</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
0.01+0.5+3.0	2.05 cdef	0.32 bcd	3.10 defg	0.18 abcd
0.01+0.5+3.5	1.90 cdef	0.43 abcd	2.88 defg	0.28 abcd
0.01+0.5+4.0	1.60 cdef	0.24 bcd	1.40 fg	0.15 bcd
0.01+0.5+4.5	1.75 cdef	0.22 bcd	2.15 efg	0.13 cd
0.01+0.5+5.0	1.25 def	0.36 bcd	1.45 fg	0.14 cd
0.01+1.0+3.0	4.90 ab	0.59 abcd	9.85 abc	0.27 abcd
0.01+1.0+3.5	2.85 bcde	0.58 abcd	4.00 cdefg	0.26 abcd
0.01+1.0+4.0	2.10 cdef	0.66 abc	5.20 cdefg	0.31 abc
0.01+1.0+4.5	0.50 f	0.13 d	0.70 g	0.07 d
0.01+1.0+5.0	1.55 cdef	0.42 bcd	3.40 defg	0.22 abcd
0.02+0.5+3.0	1.25 def	0.48 abcd	2.65 efg	0.25 abcd
0.02+0.5+3.5	1.65 cdef	0.52 abcd	5.20 cdefg	0.29 abcd
0.02+0.5+4.0	2.20 cdef	0.55 abcd	7.75 abcde	0.37 ab
0.02+0.5+4.5	3.35 abcd	0.44 abcd	7.30 abcdef	0.26 abcd
0.02+0.5+5.0	1.70 cdef	0.29 bcd	4.15 cdefg	0.22 abcd
0.02+1.0+3.0	3.65 abc	0.35 bcd	7.50 abcdef	0.19 abcd
0.02+1.0+3.5	5.10 a*	0.62 abcd	12.15 ab	0.33 abc
0.02+1.0+4.0	2.65 cdef	0.35 bcd	8.90 abcd	0.24 abcd
0.02+1.0+4.5	5.05 ab	0.92 a*	12.65 a*	0.41 a*
0.02+1.0+5.0	2.30 cdef	0.68 ab	6.20 bcdefg	0.37 ab
0.03+0.5+3.0	2.65 cdef	0.45 abcd	7.20 abcdef	0.22 abcd
0.03+0.5+3.5	1.60 cdef	0.17 cd	3.50 defg	0.14 cd
0.03+0.5+4.0	1.70 cdef	0.18 cd	3.35 defg	0.16 bcd
0.03+0.5+4.5	3.15 abcd	0.65 abc	7.80 abcde	0.29 abcd
0.03+0.5+5.0	1.65 cdef	0.58 abcd	4.15 cdefg	0.26 abcd
0.03+1.0+3.0	1.80 cdef	0.19 bcd	4.60 cdefg	0.18 bcd
0.03+1.0+3.5	1.85 cdef	0.23 bcd	3.20 defg	0.12 cd
0.03+1.0+4.0	1.15 def	0.48 abcd	2.80 defg	0.21 abcd
0.03+1.0+4.5	0.85 ef	0.25 bcd	2.45 efg	0.07 d
0.03+1.0+5.0	1.55 cdef	0.28 bcd	3.25 defg	0.12 cd

Las mismas letras dentro de una columna no difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey. \* indica la mejor respuesta de cada tratamiento

**Tabla 11:** Resultados del análisis de varianza para la interacción entre las diferentes hormonas con respecto a la parte de la planta de explantes de peciolos para las cuatro variables estudiadas producto del diseño estadístico factorial general.

<b>Interacción Hormonal entre Explantes de Peciolos</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor P</b>
Número de brotes	0.041
Tamaño de brotes	0.012
Número de hojas	0.000
Tamaño de hojas	0.000

Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 12:** Resultados del análisis de varianza para las distintas interacciones resultantes de un diseño factorial para las variables número y tamaño de brotes y número y tamaño de hojas.

<b>Interacción Hormonal entre Explantes de Peciolos</b>			
<b>Variable</b>	<b>Tipo de Interacción</b>	<b>Interacción</b>	<b>Valor P</b>
Número de brotes	Segundo orden	BAP * GA <sub>3</sub>	0.018
		ANA * GA <sub>3</sub>	0.017
Tamaño de brotes	Linear	ANA	0.001
Número de hojas	Linear	BAP	0.023
		GA <sub>3</sub>	0.018
		ANA	0.004
Tamaño de hojas	Linear	ANA	0.000

Los resultados obtenidos se realizaron bajo diseño factorial con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 13:** Diferencias entre el desempeño global de todas las combinaciones hormonales de cada tipo de explante de naranjilla utilizadas bajo los cuatro parámetros analizados.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Tamaño de brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Tamaño de hojas (cm)</b>
	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>
<b>Yemas apicales</b>	1±0	2.28±0.84 <sup>a</sup>	6.99±0.35 <sup>b</sup>	0.86±0.001 <sup>b</sup>
<b>Peciolos</b>	5.25±1.74 <sup>a</sup>	0.94±0.27 <sup>ab</sup>	12.92±2.80 <sup>a</sup>	0.42±0.12 <sup>a</sup>
<b>Hipocotilos</b>	1.20±0.74 <sup>b</sup>	0.39±0.12 <sup>ac</sup>	2.73±0.69 <sup>c</sup>	0.23±0.07 <sup>c</sup>

Las letras distintas dentro de una misma columna difieren estadísticamente bajo un nivel de confianza del 95%, mediante un análisis de diferencias de medias (prueba pareada T).

**Tabla 14:** Comparación del porcentaje de supervivencia de plantas de Naranjilla de explantes de peciolo de hojas del tercio superior e inferior de la planta.

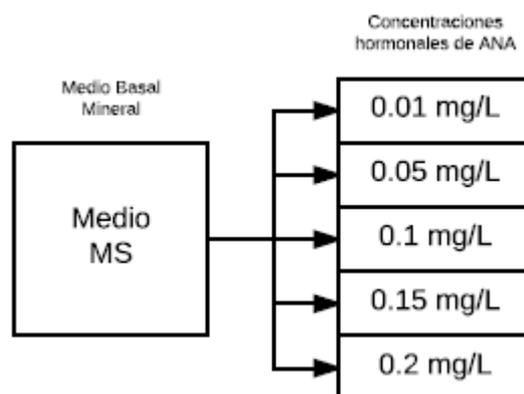
<b>Parte de la planta</b>	<b>Porcentaje de supervivencia de brotes (%)</b>
Tercio Superior	83 b
Tercio Inferior	97 a

Las diferentes letras minúsculas dentro de una misma columna difieren estadísticamente entre ellas bajo un nivel de confianza del 95% mediante la prueba de Tukey

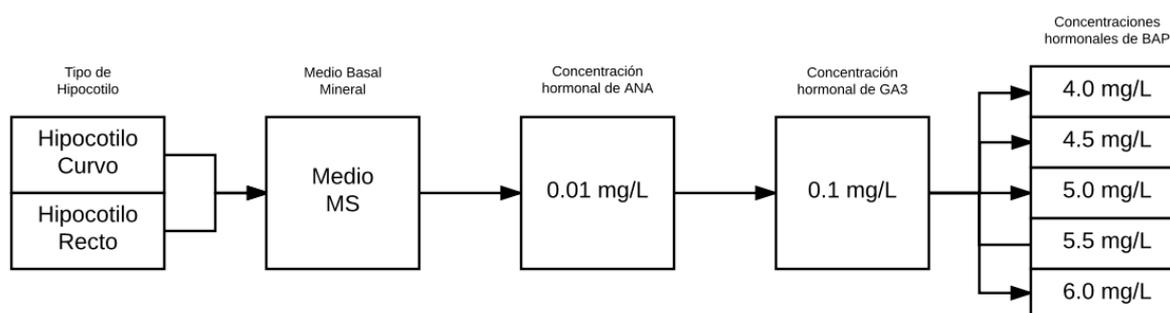
**Tabla 15:** Tabla comparativa del porcentaje de supervivencia de plantas de naranjilla en aclimatación por combinación de hormonas entre explantes de hipocotilos curvos y rectos

<b>Combinación de hormonas (ANA, GA<sub>3</sub>, BAP)</b>	<b>Hipocotilos Rectos</b>	<b>Hipocotilos Curvos</b>
	<b>Porcentaje de supervivencia de plantas (%)</b>	<b>Porcentaje de supervivencia de plantas (%)</b>
0.01+0.1+4.0	100	60
0.01+0.1+4.5	100	100
0.01+0.1+5.0	100	100
0.01+0.1+5.5	100	100
0.01+0.1+6.0	100	100

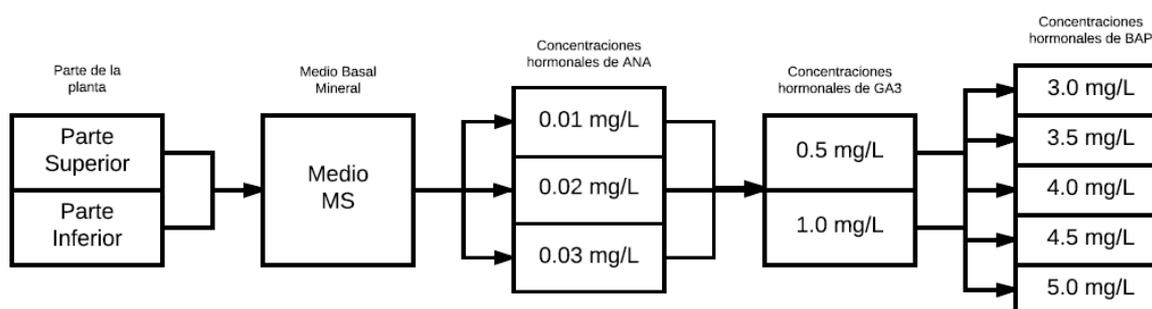
## 13. Figuras



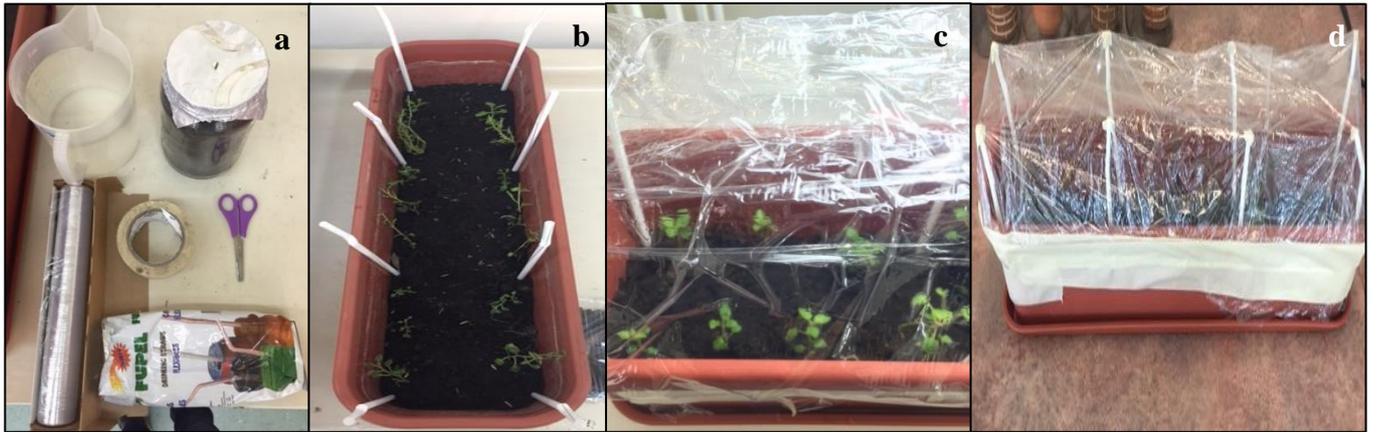
**Figura 1:** Diseño de los experimentos para el ensayo de brotación de yemas apicales, se indica el medio utilizado con las diferentes concentraciones de la auxina ANA.



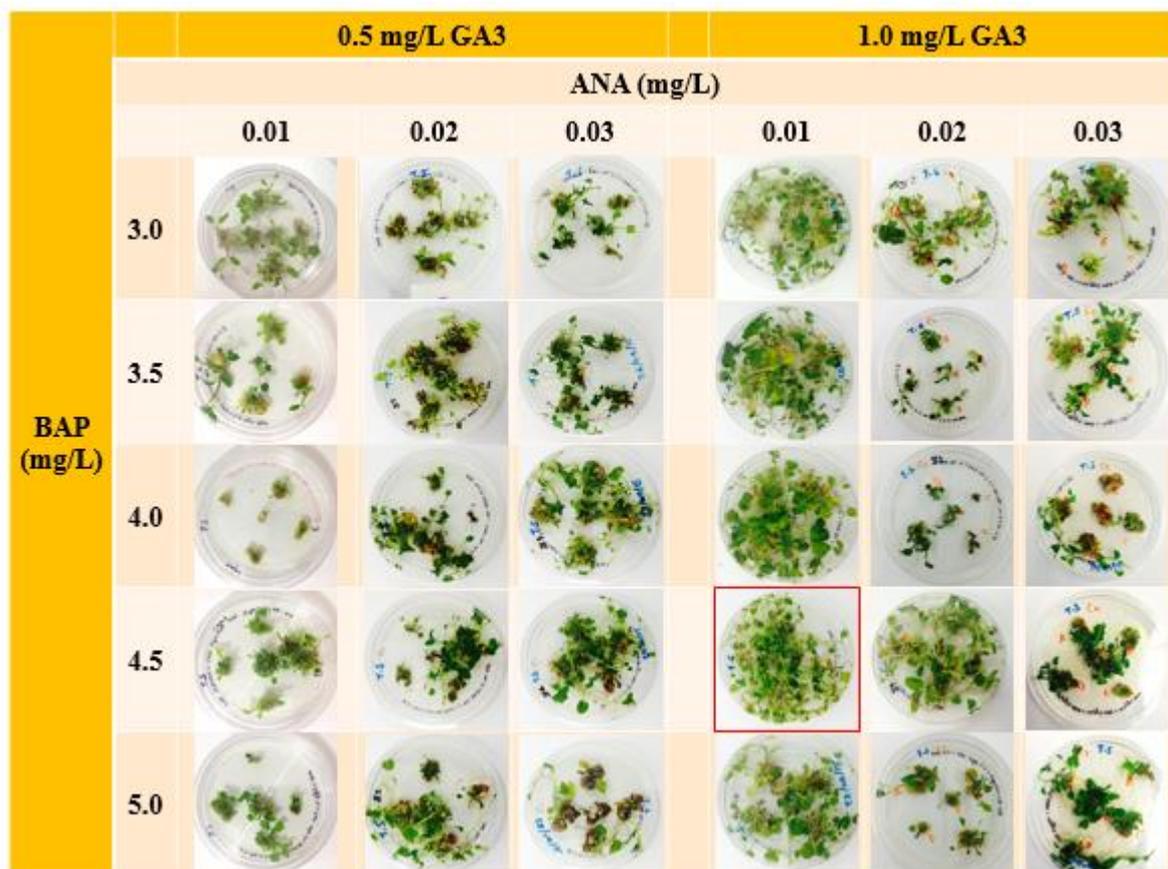
**Figura 2:** Diseño de los los ensayos con explantes de hipocotilos de dos y tres semanas (curvo y recto respectivamente), se indica los medios utilizados con las diferentes concentraciones de las hormonas ANA, GA<sub>3</sub> y BAP.



**Figura 3:** Diseño de los ensayos con peciolo de la parte superior e inferior de plantas de naranjilla. Se indica el medio utilizado con diferentes concentraciones de las hormonas auxina ANA, giberelina GA<sub>3</sub> y citoquinina BAP.

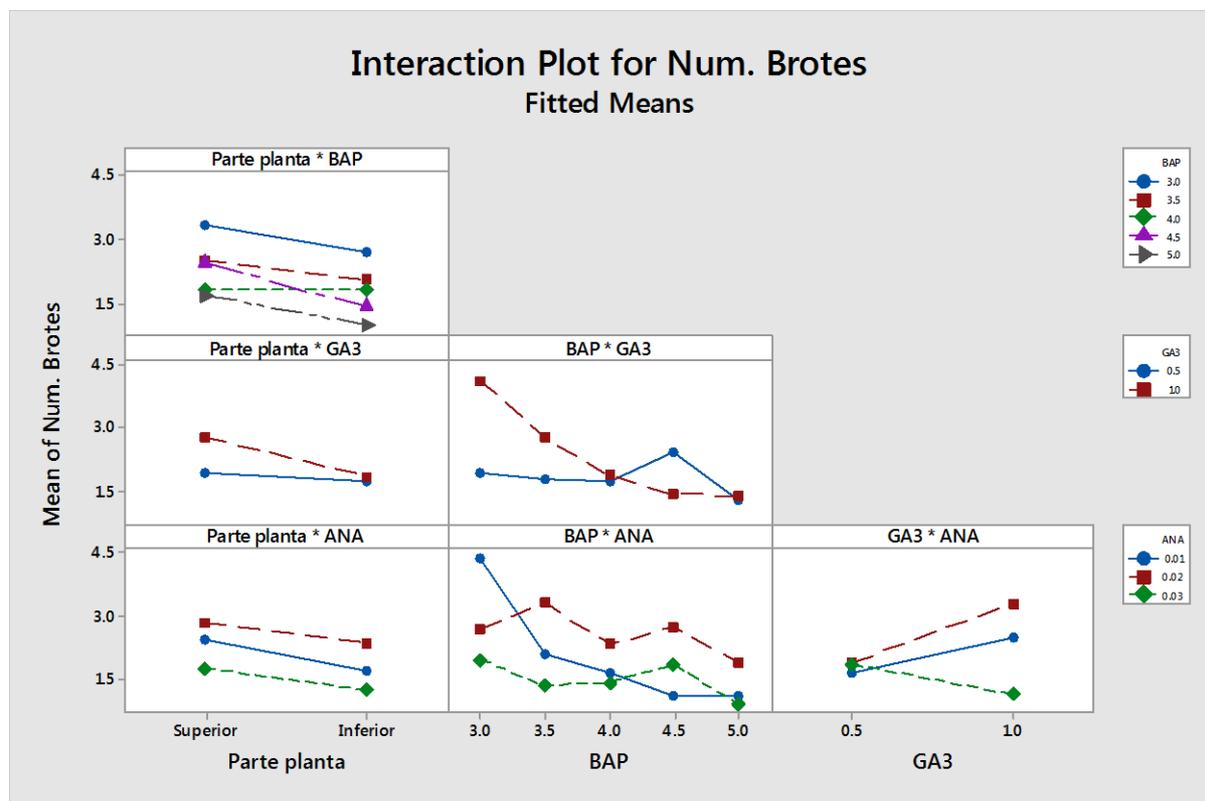


**Figura 4:** Preparación y montaje de invernaderos caseros para la aclimatación de plántulas provenientes de la brotación en los diferentes explantes estudiados. De izquierda a derecha: a) Material inicial para realizar los invernaderos de aclimatación; b) Posición de las plántulas dentro del invernadero de aclimatación; c) Plántulas con cobertura y d) Vista externa del invernadero de aclimatación

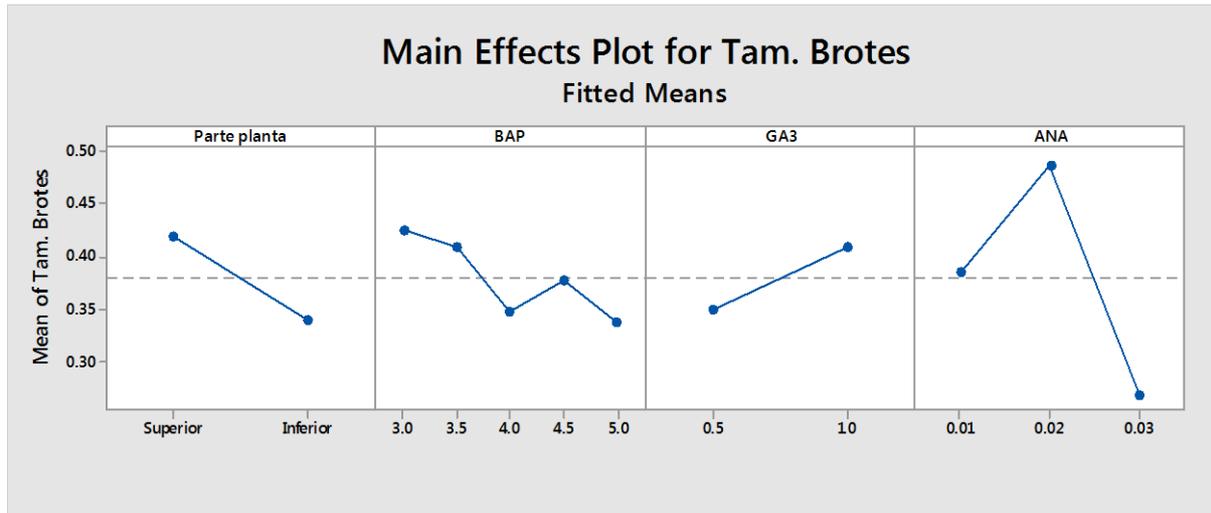


**Figura 5:** Comparación de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo de la parte superior de la planta frente a diferentes combinaciones de ANA (parte superior, segundo nivel), GA<sub>3</sub> (parte superior, primer nivel) y BAP (izquierda). El recuadro rojo

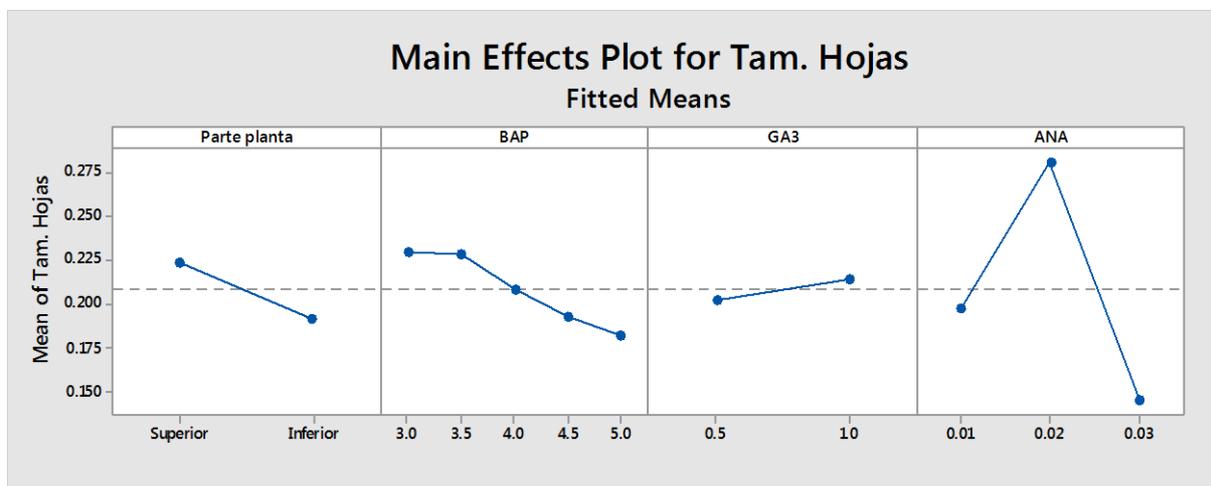
corresponde a la mejor combinación hormonal estadísticamente hablando, bajo un nivel de confianza del 95%.



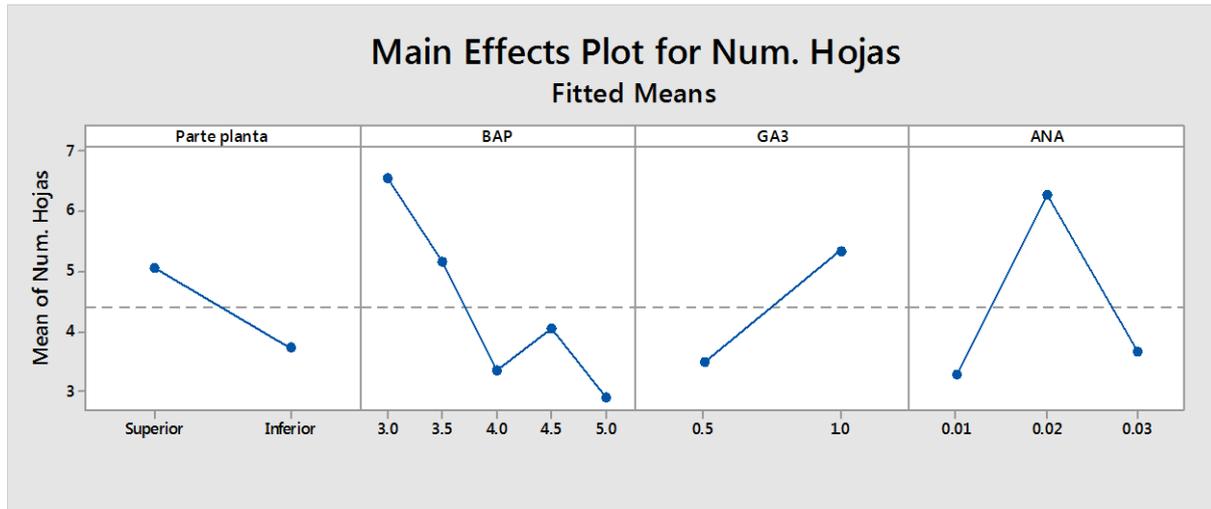
**Figura 6:** Gráfico de interacción entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA<sub>3</sub>” y “BAP” para la variable “número de brotes” del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo. Dentro del experimento, las únicas interacciones significativas fueron: BAP\*GA<sub>3</sub> y BAP\*ANA. El resto de interacciones produjeron la misma respuesta estadística. En el eje Y: promedios para el número de brotes; en el eje X: diferentes niveles de los factores. En los recuadros (derecha): las distintas concentraciones (niveles) de los factores ANA, GA<sub>3</sub> y BAP.



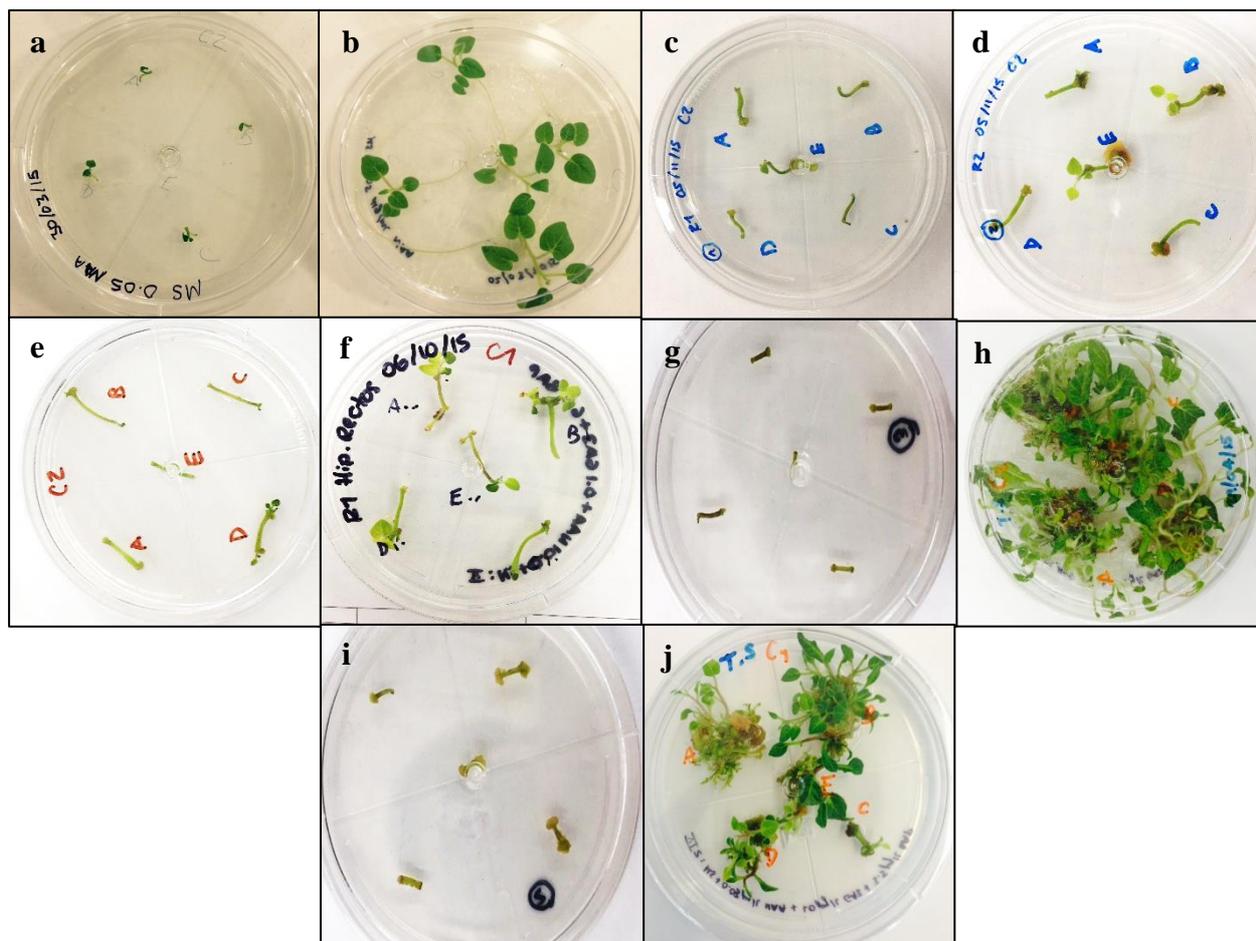
**Figura 7:** Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente; sin interacción) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA<sub>3</sub>” y “BAP” para la variable “tamaño de brotes” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolos. Para esta variable, no hubo interacciones entre los factores. El único factor estadísticamente significativo fue “ANA”. En el eje Y: promedios del tamaño de los brotes y en eje X: diferentes niveles de los factores.



**Figura 8:** Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA<sub>3</sub>” y “BAP” para la variable “tamaño de hojas” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolos. Para esta variable, no hubo interacciones entre los factores. El factor estadísticamente significativo fue “ANA”. En el eje Y: promedios del tamaño de las hojas y en eje X: diferentes niveles de los factores.



**Figura 9:** Comportamiento de los efectos principales (efecto de cada factor independientemente; sin interacción) entre los diferentes niveles de los factores “Parte de la planta”, “ANA”, “GA3” y “BAP” para la variable “número de hojas” dentro del experimento de regeneración de brotes a partir de explantes de peciolo. Para esta variable, no hubo interacciones entre los factores. Los factores estadísticamente significativos fueron “ANA”, “GA3” y “BAP”. En el eje Y: promedios del número de hojas y en eje X: diferentes niveles de los factores.



**Figura 10:** Fotografías del desempeño de regeneración de brotes de los explantes de cada experimento analizado en este estudio. De izquierda a derecha. a) explantes de yemas apicales al inicio de experimento (edad 0 días); b) regeneración de brotes a partir de explantes de yemas apicales después de 30 días en medio con hormonas; c) explantes de hipocotilos curvos (2 semanas de edad) al inicio del experimento; d) desarrollo de nuevos brotes de explantes de hipocotilos curvos; e) explantes de hipocotilos rectos (3 semanas de edad) al inicio del experimento; f) regeneración de brotes a partir de explantes de hipocotilos curvos; g) explantes de peciolo del tercio superior de la planta al inicio del ensayo; h) regeneración de brotes de explantes de peciolo del tercio superior de la planta; i) explantes de peciolo del tercio inferior de la planta al inicio del experimento; j) regeneración de brotes de explantes de peciolo del tercio inferior de la planta.