

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Protocolo para la Regeneración de Plántulas a partir de Explantes de Hojas de
Cinco Variedades Ecuatorianas de Tomate de Árbol (*Solanum betaceum*)**

Esteban Borrero Perelló

Proyecto presentado como requisito para la obtención del título de B.S en Biotecnología

Quito

Mayo de 2007

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de autor
Esteban Borrero Perelló
2007

RESUMEN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es una planta de origen andino que posee el potencial para convertirse en un producto de gran importancia económica tanto en el mercado nacional como el mercado internacional de exportación. Cada vez más se difunden los beneficios que tiene el consumo de esta fruta por parte del consumidor, y se prevé un futuro favorable para el tomate de árbol. Desafortunadamente, la efectividad productiva del cultivo se ve disminuida por su susceptibilidad a diversas plagas y enfermedades.

En la presente investigación, se determinó un protocolo para la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja de cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol, utilizando una combinación hormonal de la auxina ANA (hormona vegetal vegetal que estimula el alargamiento celular e inducen a la formación de raíz) y la citoquinina BAP (hormona vegetal que estimula la división celular e induce a la formación de retoño). Se utilizaron cinco frutos de cada variedad de tomate de árbol, y se encontró que no se puede relacionar una combinación hormonal específica con una variedad determinada, para la formación de callo y la regeneración de retoños. Mediante el programa estadístico Statview se calculó el ANOVA y se pudo determinar una concentración específica de la auxina ANA (0.07 ppm) que asegura el éxito para la formación de callo y la regeneración de retoños a partir de explantes para todas las variedades. Por otro lado, no se pudo determinar una concentración específica de la citoquinina BAP para la formación de callo ni la regeneración de retoños.

A pesar de que la utilización de la auxina ANA a una concentración de 0.07 ppm y la citoquinina BAP a concentraciones de 3 o 4 ppm, aseguran el éxito para la formación de callo y la regeneración de retoños para las cinco variedades, se recomienda la utilización de las variedades Amarillo y Negro ya que fueron las variedades que mayor porcentaje de formación de callo y regeneración de retoño presentaron.

ABSTRACT

The tamarillo (*Solanum betaceum*) is an Andean fruit that has the potential to develop into a product of economic importance within the national market as well as in the global export markets. The benefits that provides the consumption of this fruit are been known more by the consumer and is believed to present a favorable future for the tamarillo. Unfortunately, its production efficiency is weakened by its susceptibility to a wide range of pests and diseases.

In this research, a protocol for shoot regeneration from leaf explant of the five ecuadorian varieties of tamarillo was developed, using an hormonal combination of the auxine ANA (plant hormone that promotes the cells to enlarge and induces root formation) and the citoquinine BAP (plant hormone that induces cell division and stimulates shoot). Five fruits of the five varieties of tamarillo were used, and it was found that there is no relationship between specific hormonal combinations with a determined variety, for calli produce and shoot regeneration. A hormonal concentration that assures the success for calli formation and shoots regeneration for the auxine ANA (0.07 ppm) was determined by the use of the statistic program ANOVA. On the other hand, it was unable to determine a specific hormonal concentration for calli formation and shoot regeneration for the citoquinine BAP.

Although the use of the auxine ANA at 0.07 ppm concentration and the citoquinine BAP at 3 or 4 ppm concentration, assures the success for calli formation and shoot regeneration for the five varieties, it is recommended to use the Amarillo and Negro varieties since those varieties presented the higher percentage of calli formation and shoot regeneration.

TABLA DE CONTENIDO

Derechos de Autor.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
1. Introducción.....	1
1.1. Descripción General del Cultivo.....	1
1.1.1. Historia y Características Morfológicas.....	1
1.1.2. Descripción de Cultivares.....	2
1.1.3. Características Morfológicas de las Variedades Cultivadas Ecuatorianas.....	3
1.1.3. Características Ecológicas.....	4
1.2. Situación Actual del Cultivo en el Ecuador e Importancias Económicas..	5
1.3. Problemática del Cultivo y Enfermedades.....	7
1.4. Cultivos de Tejidos Vegetales.....	9
1.4.1. Composición del Medio de Cultivo.....	9
1.4.2. Germinación de Semillas <i>In Vitro</i>	10
1.4.3. Subcultivos.....	11
1.4.4. Morfogénesis <i>In Vitro</i>	12
1.4.4.1. Factores que Afectan los Procesos Morfogénicos.....	12
1.4.5. Regeneración a Partir de Explantes.....	14
1.4.5.1. Hormonas Reguladoras de Crecimiento.....	15
1.5. Factores de Contaminación.....	16
1.5.1. Asepsia.....	16
1.5.2. Métodos para la Prevención de Contaminación.....	17
1.6. Aclimatación de las Plantas Cultivadas <i>In Vitro</i>.....	17
2. Objetivo General.....	19
3. Objetivo Específico.....	19
4. Justificación.....	19
5. Área De Trabajo.....	20
6. Materiales Y Reactivos.....	20

6.1. Material Vegetal.....	20
6.2. Materiales para la Germinación <i>In Vitro</i> de Semillas y Sub Cultivos....	20
6.3. Materiales para la Regeneración a Partir de Explantes.....	21
6.4. Materiales para la Aclimatación de Plantas Regeneradas <i>In Vitro</i>	21
7. Metodología.....	21
7.1. Recolección y Almacenamiento del Material Vegetal.....	21
7.2. Germinación <i>In Vitro</i> de Semillas.....	21
7.3. Medio de Cultivos para Regeneración de Plantas a Partir de Explantes.....	22
7.4. Obtención y Cultivo de Explantes <i>In Vitro</i>	22
7.5. Sub Cultivos de los Retoños.....	23
7.6. Aclimatación de Plantas Regeneradas <i>In Vitro</i>	23
7.7. Análisis Estadístico.....	24
7.7.1. Variables Evaluadas.....	24
7.7.2. Diseño Experimental.....	24
8. Resultados.....	25
8.1. Cuantificación de Germinación de Semilla de Tomate de Árbol <i>In Vitro</i>	25
8.2. Cuantificación de Formación de Callo por Explante Cultivado.....	25
8.3. Regeneración de Retoños.....	26
8.4. Porcentaje de Enraizamiento.....	27
9. Discusión.....	28
9.1. Importancia de Repeticiones.....	28
9.2. Formación de Callo <i>In Vitro</i>	29
9.3. Regeneración de Retoño.....	31

9.4. Porcentaje de Enraizamiento.....	32
9.5. Justificación del Análisis Estadístico Elegido.....	33
10. Conclusiones y Recomendaciones.....	34
10.1. Conclusiones.....	34
10.2. Recomendaciones.....	34
11. Bibliografía.....	36
12. Tablas.....	38
13. Figuras.....	52

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

12. Tablas.....	38
Tabla #1. Porcentaje de Germinación <i>In Vitro</i> de Semillas.....	38
Tabla #2. Concentraciones de Hormonas BAP y ANA.....	38
Tabla #3. Análisis de Varianza de Callosidad.....	39
Tabla #4. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Amarillo.....	40
Tabla #5. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Mora.....	41
Tabla #6. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Negro.....	42
Tabla #7. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Redondo.....	43
Tabla #8. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Puntón.....	44
Tabla #9. Promedio y Rango para la Significación entre las concentraciones de Auxina para la Formación de Callo.....	45
Tabla #10. Promedio y Rango para la Significación entre las Citoquininas para la Formación de Callo.....	45
Tabla #11. Análisis de Varianza de Regeneración de Retoño.....	46
Tabla #12. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Amarillo.....	47
Tabla #13. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Negro.....	48
Tabla #14. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Redondo.....	49
Tabla #15. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Amarillo.....	50
Tabla #16. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Amarillo.....	51
Tabla #17. Promedios y Rangos de Significación para la Regeneración de Retoños.....	52
Tabla #18. Promedios y Rangos de Significación entre las concentraciones de Auxinas para la Regeneración de Retoños.....	52
Tabla #19. Promedios y Rangos de Significación entre las concentraciones de Citoquininas para la Regeneración de Retoños.....	53
Tabla #20. Promedios y Rangos de Significación para la Callosidad.....	53
 14. Figuras.....	 54
Figura #1. Interacción de las Variedades con la Auxina y Citoquinina para la Formación de Callo.....	54
Figura #2. Comparación de las Combinaciones Hormonales vs. el Porcentaje de Callosidad de las 5 Variedades.....	55

Figura #3. Comparación de la Concentración de Auxinas para la Formación de Callo.	56
Figura #4. Comparación de la Concentración de BAP para la Formación de Callo.....	56
Figura #5. Interacción de las Variedad con la Auxina y Citoquinina para la Regeneración de Retoños.....	57
Figura #6. Comparación de las Combinaciones Hormonales vs el Porcentaje de Regeneración de Retoños de las 5 Variedades.....	58
Figura #7. Comparación de la Combinación de Auxinas para la Regeneración de Retoño.....	59
Figura #8. Comparación de la Combinación de BAP para la Regeneración de Retoños.....	59

1. INTRODUCCIÓN.

Un gran número de frutas de origen Andino, tienen potencial para convertirse en productos de alta calidad para consumo nacional y de exportación, con un alto beneficio económico. El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es una de ellas (Bohs, 1986). A pesar de que el tomate de árbol se lo domesticó en América el Sur, el mayor desarrollo de este cultivo se da en Nueva Zelanda (Atkinson, 1990).

1.1. Descripción General del Cultivo.

1.1.1. Historia y Características Morfológicas

A pesar que se conocen las poblaciones silvestres del tomate de árbol, no se puede determinar con certeza su origen. Sin embargo, el origen del tomate de árbol se relaciona con América del Sur, específicamente la zona Andina (Bohs, 1989). *Solanum betaceum* está relacionada con la artesanía Pre-Colombina en Perú (Tapia, 1999), lo que indica que este cultivo fue domesticado por habitantes de los Andes. Heiser (1999) y Cardenas (1969), mencionan que los nombres comunes de *S. betaceum* son derivados del español o del portugués, lo que da a entender su reciente domesticación. No hace mucho, se conoce que existen poblaciones silvestres de *S. betaceum*, en bosques protegidos en el Sur de Bolivia y al Norte de Argentina (Tapia, 1999).

El “tomate de árbol” (*Solanum betaceum*), como se lo nombró originalmente por Cavanilles en 1799, fue transferido por Sendtner en 1845 al género *Cyphomandra* donde perteneció hasta hace poco cuando Bohs (1995) lo regresó al género *Solanum*. Estudios moleculares realizados corroboran con este cambio de nombre (Atkinson, 1990).

A nivel morfológico, el tomate de árbol se presenta como un arbusto que puede alcanzar los 4 metros de altura, tiene una corteza grisácea y follaje perenne. Tiene hojas alternas, enteras, que en los extremos de las ramas pueden llegar a ser muy grandes, entre 30-40 centímetros de largo y 20-35 centímetros de ancho, con pecíolo robusto de 4 a 8 centímetros de longitud. Posee un limbo de 15 a 30 centímetros de longitud, con forma ovalada. La nerviación es marcada y sobresaliente. Las flores son pequeñas, de 1,3 a 1,5 centímetros de diámetro, de color blanco-rosáceo, dispuestas en pequeños racimos terminales. Tienen 5 pétalos y 5 estambres amarillos. El fruto es una baya aromática de forma ovoidal de 4 a 8 centímetros de longitud y 3 a 5 centímetros de ancho, con largo pedúnculo en el que persiste el cáliz de la flor. Su pulpa jugosa, de color naranja o roja, con numerosas semillas (Bohs, 1989).

El tomate de árbol es una planta auto-compatible y su propagación es por semillas, que germinan con mucha facilidad. Presenta un crecimiento muy rápido, dando frutos al año de sembrado y continuamente durante 48 meses. Alcanza su madurez reproductiva en 1 o 2 años, produciendo frutos hasta los 8 o 10 años (Lewis, 1999).

1.1.2. Descripción de Cultivares

Tanto en el mercado nacional como internacional, no se ha establecido una diferenciación clara entre las variedades de esta fruta, sin embargo en un estudio realizado por el SICA (Sistema de Información del Censo Agropecuario), se reconocen 8 cultivares de tomate de árbol (Albornoz 1992).

“**Ecuadorian Orange**”: es una fruta de color naranja, de tamaño mediano, con una pulpa de color naranja, y de textura cremosa. Tiene una acidez menor que en otras variedades. Se la utiliza en la cocina gourmet.

“**Goldmine**”: es una fruta de color amarillo, con pulpa blanda, tiene un sabor fuerte pero no ácido. Es recomendada para su consumo en fresco por su sabor.

“**Inca Gold**”: es una fruta amarilla, sabor menos ácido que los tipos rojos. Se la consume en fresco o cocinada. El sabor de la fruta cocinada se parece a la del durazno.

“**Oratia Red**”: es una fruta roja, de tamaño grande con un pronunciado sabor ácido. Se lo consume fresco y en conservas.

“**Rothamer**”: fruta de mayor tamaño que los otros tipos, con cáscara de color rojo brillante y pulpa amarilla. Tiene un sabor dulce.

“**Ruby red**”: es una fruta de tamaño grande, con una cáscara de color rojo brillante y su pulpa es de color rojo oscuro. Tiene un sabor fuerte y ácido. Se lo utiliza en la cocina gourmet.

“**Solid Gold**”: fruta grande con cáscara color dorado-naranja. Su pulpa es suave con un sabor menos pronunciado que los otros tipos. Es muy buena para su consumo en fresco.

“**Yellow**”: es una fruta de tamaño mediano, con una cáscara de color naranja-amarillenta. La pulpa es de color amarillo con sabor suave.

1.1.3. Características Morfológicas de las Variedades Cultivadas Ecuatorianas

La sierra ecuatoriana posee varias zonas óptimas para la producción del tomate de árbol. Albornoz, (1992) describe que en el Ecuador posiblemente existen 5 variedades de tomate de árbol, diferenciadas entre si de acuerdo al color del fruto y su extremo apical.

“**Tomate Puntón**”: es una fruta ovoide de tamaño mediano, con el extremo apical puntón. Su cáscara es de color anaranjado oscuro. Tiene una pulpa color anaranjado claro.

“**Negra**”: es una fruta ovoide de tamaño grande, su extremo apical es puntón. El color de su pulpa es anaranjado claro, tiene una cáscara de color púrpura de consistencia dura cuando ha completado su madurez fisiológica.

“**Amarillo**”: es una fruta ovoide, de tamaño pequeño, extremo apical puntón. La pulpa tiene un color anaranjado claro. Su cáscara es de color amarillo. Posiblemente la variedad más ancestral, por la gran semejanza de su fruto con el de los silvestres actuales.

“**Tomate redondo**”: fruta esferoide, de tamaño pequeño. Tiene el extremo apical redondo. Su cáscara es de color anaranjado oscuro. Su pulpa es de color anaranjado claro.

“**Tomate mora**”: es una fruta ovoide, de tamaño mediano, su extremo apical es redondo. Su cáscara es de color púrpura. Tiene la pulpa de color anaranjado claro. Esta variedad surge quizás por el cruzamiento natural, o por la polinización dirigida. En la cruce, no hay duda que actúa la variedad “negra” ya sea para suministrar óvulos (oosfera) o polen, y una de las otras tres variedades.

1.1.4. Características Ecológicas

El tomate de árbol, al ser originario de los Andes, requiere climas templados de bosques húmedos montanos, con temperaturas entre los 13° y 24° centígrados, con Pluviosidad de 600 a 1.500 milímetros anuales (Tapia, 1999). Tiene un rendimiento productivo en altitudes que varían entre los 800 y 2.800 metros sobre el nivel del mar. En

base a los requisitos edáficos, requiere suelos francos arenosos, con buen drenaje, que sean ricos en materia orgánica y respondan bien al abono. A pesar, de que es una planta que necesita de riego constantemente, si aumenta mucho el porcentaje de humedad, los tallos sufren de putrefacción. Necesita un porcentaje de humedad relativa de 70-80% (Bohs, 1989). El tomate de árbol, es incapaz de tolerar cambios erráticos de clima. Aparentemente, es intolerante a las altas temperaturas y por lo general la maduración de su fruto se ve inhibida en tierras bajas, cercanas al nivel del mar, debido a su clima tropical que consta con un exceso de calor (Prohens, 1996).

El clima se vuelve el factor determinante del éxito del cultivo, y la precipitación tiene un papel muy importante, en cuanto al éxito de su producción. El tomate de árbol, es altamente susceptible a las heladas, los vientos y las sequías (Atkinson, 1990).

1.2. Situación Actual del Cultivo en el Ecuador e Importancia Económica.

El Ecuador, al poseer un clima subtropical, es ideal para el crecimiento y la producción del tomate de árbol. Cuenta con varias zonas óptimas para el crecimiento de esta fruta. Las provincias más representativas son Imbabura, Tungurahua y Pichincha (Albornoz, 1992).

El cultivo de tomate de árbol se viene realizando desde hace muchos años en el Ecuador. Tradicionalmente se lo cultivaba en zonas como Patate y Baños. Sin embargo, su producción se ha extendido comercialmente a varias zonas del Ecuador. Esto se debe, a que hubo un crecimiento de la demanda interna, desde hace 15 años (Wendt, 2002).

Debido a que el tomate de árbol tiene potencial para ser un producto de exportación en el futuro y que económicamente viene creciendo en el mercado, principalmente a nivel

internacional, se están desarrollando proyectos que ayuden a su producción y aumente su comercialización. La ESPOL, está investigando la variabilidad genética en tomate de árbol, para determinar variedades somaclonales, para luego caracterizarlas y propagarlas *in vitro*. Conjuntamente, la Universidad Central del Ecuador, se dedica a la investigación de fuentes de resistencia a nemátodos y virus de este cultivo, mediante mapeo molecular. Por otro lado, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuarias (INIAP), también está trabajando en dos proyectos relacionados con el tomate de árbol. El primero es un estudio de la “mancha negra” y “nudo de la raíz”, que son plagas que atacan a esta planta, y el segundo trata sobre el mejoramiento de la productividad del tomate de árbol (Wendt, 2002).

El Ecuador inició con las exportaciones de esta fruta a finales de los años 80 y hasta ahora no se ha podido consolidar un mercado creciente (Albornoz, 1992). Las razones principales de esta baja comercialización del cultivo se debe, por un lado, a que la planta del tomate de árbol es altamente susceptible a enfermedades y pestes provocadas por nemátodos o virus, ocasionando no solo un daño a la salud de la planta sino al fruto, especialmente a su epidermis, dando como resultado problemas en la heterogeneidad del fruto, convirtiéndola en una fruta inaceptable para exportación. Por otro lado, están los problemas relacionados con la poscosecha. La falta de tecnología de poscosecha origina pérdidas muy grandes, no hay una conciencia del productor con relación al manejo adecuado de los frutos, por esa razón en el camino entre el huerto y el consumidor se pierden grandes cantidades de producto y dinero. Por ello, es necesario hacer un análisis profundo para tratar de buscar soluciones que permitan un desarrollo sostenido de las explotaciones con fines de exportación (Soria, 1996). Tanto las enfermedades que afectan

al cultivo como el mal manejo, afectan también a la producción de esta fruta e incrementan los costos de producción (Wendt, 2002). El mejoramiento genético es una alternativa clave para el desarrollo de materiales mejorados con resistencia a plagas y enfermedades, y que tengan una mejor calidad. Si se quiere incrementar el valor agregado a esta fruta, tomando en cuenta el actual régimen de globalización y competitividad, se requiere el desarrollo, la adaptación y la optimización de la técnica del fitomejoramiento (Albornoz, 1992).

La exportación de esta fruta, ha sido irregular en las últimas dos décadas. Entre los años 1990 y 1992, se registró un incremento consistente en las exportaciones del tomate de árbol, alcanzando el mayor volumen de exportación de la década. En 1999 el volumen exportado cayó en un 38.8% seguido de una disminución del 90.4% en el 2000. El mercado internacional, ha sido bastante irregular para el cultivo de tomate de árbol en la última década, a pesar de que este cultivo se ha incrementado en superficie a nivel nacional. El tomate de árbol es el tercer frutal con mayor superficie cultivada en el Ecuador (Soria, 1996). Los mayores importadores de esta fruta son Alemania y Estados Unidos, aunque países como Canadá, Suiza, España, Finlandia, Bélgica, Noruega, Suecia, también son importadores de tomate de árbol (Wendt, 2002).

1.3. Problemática del Cultivo y Enfermedades.

La producción de este cultivo consta con otro limitante tecnológico, que afecta a la exportación de este producto, esto es la equivocada distancia de siembra utilizada por los agricultores en las zonas tradicionales de cultivo, que no permite una gran producción de tomate de árbol con calidad de exportación, en color, tamaño y fitosanidad (Albornoz

1992). Es por esta razón, que es necesario fortalecer la investigación para generar tecnología, comenzando por determinar los estándares de calidad, técnicas de conservación, etc. (Soria, 1996).

A pesar de que *S. betaceum* es relativamente resistente a plagas y enfermedades, se ve afectada por un gran número de enfermedades virales y nemátodos. Sin embargo, hay que mencionar que en la actualidad, el cultivo de tomate de árbol es resistente al virus del mosaico del tabaco (TMV), que ataca a varios miembros de las solanáceas (Atkinson, 1990).

El cultivo de tomate de árbol sufre enfermedades virales, bacterianas, fungales y se ve afectado por plagas tanto de insectos como nemátodos (Holmes, 1946). La enfermedad viral que mayor daño ocasiona a la *S. betaceum* es el potyvirus mosaico del tamarillo (TaMV). Este virus destruye el follaje de la planta y su hábitat. Pero el mayor daño se ocasiona al fruto, atacando la epidermis, provocando moretones y abolladuras, inaceptables para exportación (Standring, 1989). En cuanto a las enfermedades fungales, *Phytophthora infestans* ocasiona el mayor daño al cultivo, provocando la enfermedad Tizón de la hoja. El *Neoleucinodes elegantalis* es la principal plaga en el cultivo de tomate de árbol. La larva de este insecto ocasiona un daño previo a la maduración del fruto de este cultivo. Produce pérdidas del fruto en un 40-80% (Heiser, 1999).

En la actualidad, los productores del tomate de árbol, están desarrollando técnicas genéticas que proporcionen resistencias contra estas plagas y enfermedades. Hay que tener en cuenta que si el Ecuador desea permanecer en el mercado de exportación de este cultivo, deberá optar por realizar estas técnicas de mejoramiento genético. Los tratamientos tradicionales fitosanitarios del tomate de árbol, aumentan los costos de

producción debido a la incesante dependencia colateral de agroquímicos y pesticidas de control (Albornoz, 1992).

1.4.Cultivos de Tejidos Vegetales

1.4.1. Composición del Medio de Cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Los medios de cultivo están diseñados para proveer nutrientes, humedad, pH y osmolaridad apropiada para la germinación de semillas, brotación de yemas, regeneración de plantas y cultivo de células. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprenden entre 6 y 40 compuestos. Básicamente, los medios de cultivo se componen de una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras del crecimiento (hormonas); los medios de cultivo pueden ser semisólidos o líquidos. Si el medio de cultivo es semisólido, se utiliza un agente gelificante (Radice, 2004).

La mayoría de los cultivos que crecen *in vitro*, son heterótrofos, es por esa razón que necesitan de una fuente de carbono. Por lo general, se utiliza la sacarosa en concentraciones de 2-5%, como fuente de carbono. Sin embargo, en algunos medios se la reemplaza por glucosa. También se han visto casos que se utilizan la maltosa o galactosa. Los medios de cultivo deben proveer los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de plantas enteras. Por lo general, se utilizan concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. Es importante que al incorporar el hierro se lo haga con un agente quelante (Fe-EDTA), esto ayuda a que el cultivo tenga disponibilidad a un rango

de pH más amplio. En la mayoría de los casos los medios de cultivo contienen auxinas y/o citoquininas. Las giberelinas, otra hormona reguladora de crecimiento, son utilizadas a veces para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. Si el medio de cultivo es semisólido, el agar a concentraciones 0.6 y 1% es el compuesto más utilizado. También se puede utilizar Agargel, Transfergel, Phytigel, agarosa y Gelrite, por supuesto, a concentraciones diferentes. También se suele incorporar al medio de cultivo, otros compuestos con diferente composición química. Se le puede agregar otros aminoácidos, además de la glicina, como la L-tirosina, aspargina y cisteína, al igual que agentes antioxidantes, antibióticos y fungicidas. Hay que tener cuidado con las concentraciones agregadas ya que pueden inhibir el crecimiento de los cultivos (Radice, 2004).

1.4.2. Germinación de Semillas *In Vitro*

El factor determinante para el éxito del cultivo de tejidos depende en mantener absoluta asepsia, tanto en el interior del recipiente que contiene el medio de cultivo, como el tejido vegetal que dará origen a las nuevas plantas. A veces, es prácticamente imposible lograr una desinfección adecuada del tejido vegetal ya sea porque está extremadamente contaminado o porque se ha realizado un mal manejo por parte del operador. La germinación de semillas *in vitro* es una solución inteligente para que el tejido vegetal tenga un mayor índice de asepsia, ya que el tejido vegetal pasa por una serie de lavados que ayudan a su esterilización y además se trabaja en una cámara de flujo laminar. Es sumamente importante que las semillas germinadas *in vitro* se esterilicen adecuadamente, para luego utilizar el tejido regenerado con las mismas

condiciones estériles. Para la germinación de semillas de tomate de árbol y para la mayoría de solanáceas, el medio de cultivo que se utiliza, debido a su composición salina es el de Murashige y Skoog (1962) o medio MS como se lo conoce comúnmente. Este medio de cultivo usa alrededor de 20 sales para proveer los macro y micronutrientes necesarios (Radice, 2002).

1.4.3. Subcultivos

Hay varios motivos por los cuales se realiza subcultivos *in vitro*, uno de esos es para obtener mayor cantidad de material vegetal. Un subcultivo, es la transferencia en condiciones asépticas, de segmentos de plantas ya establecidas *in vitro*, a otro recipiente que contiene el mismo u otro medio de cultivo. Por lo general, el medio de cultivo que se utiliza para los subcultivos, como se mencionó anteriormente es el MS (Radice, 2002). Dependiendo del subcultivo, se puede o no añadir hormonas reguladoras de crecimiento en estos medios. Los segmentos a transferir pueden ser yemas, ápices vegetativos, segmentos nodales, hojas y pecíolos. Es importante que al realizar subcultivos, se elimine todo el medio de cultivo original, del segmento de la planta que se va a subcultivar. Es preferible eliminar las hojas de los segmentos nodales para subcultivar, ya que estos pueden provocar contaminación del material vegetal. Hay que tomar todas las precauciones necesarios para mantener la asepsia, tanto del medio de cultivo como del segmento subcultivado (Guimaraes, 1988).

1.4.4. Morfogénesis *In Vitro*

La morfogénesis, en términos generales, es la capacidad regenerativa del tejido vegetal. La embriogénesis somática y la organogénesis, son procesos morfogénicos que se realizan con frecuencia en el cultivo *in vitro*. La organogénesis consiste en la obtención de tallos, raíces o flores a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones del cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división. Esta capacidad, de las células vegetales, para regenerarse en plantas completas (totipotencia celular), fue anunciada por primera vez por Haberlandt en 1902. Sin embargo, no fue hasta 1934, que White pudo mantener en forma ilimitada el crecimiento de raíces en medios líquidos a partir de ápices de tomate. Al mismo tiempo, se identificó el ácido indol acético (AIA), que posibilitó el mantenimiento indefinido *in vitro* de callos de zanahoria y tabaco (Radice, 2004).

1.4.4.1 Factores que Afectan los Procesos Morfogénicos

Hay cuatro factores principales que determinan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos, en condiciones *in vitro*. El genotipo, las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo, las condiciones físicas para realizar el cultivo y el explante. El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, tanto por la capacidad del explante para adaptarse en condiciones *in vitro* como por la formación de callo, la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Esta es la razón por la cual, no se puede generalizar metodologías o protocolos de trabajo. Los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo, deben ser específicos para cada situación en particular (Reinert, 1983).

Existen varios compuestos químicos que influyen en la morfogénesis del cultivo *in vitro*. Uno de ellos es la composición salina del medio de cultivo. Como ya se mencionó anteriormente, el medio de cultivo más comúnmente utilizado es el MS. Las hormonas reguladoras de crecimiento son otros compuestos químicos que influyen en la morfogénesis de cultivos *in vitro*. El carbón activado, el agar y la atmósfera gaseosa son otros factores que afectan la morfogénesis en este tipo de cultivo. En cuanto a la atmósfera gaseosa es un factor que está condicionado por el tipo y tamaño del envase seleccionado, así como también por el tipo de cobertura que se le dé al envase, ya sea algodón, papel aluminio, película resistente transparente o tapas rígidas de polipropileno. El intercambio gaseoso es diferente para cada tipo de tapa. El nivel de oxígeno disponible para el explante, condiciona el crecimiento y los procesos morfogénicos. Se necesita una buena aireación para obtener cualquier tipo de procesos morfogénicos. En cuanto a la concentración de dióxido de carbono (CO₂), varía según la respiración y la actividad fotosintética de la planta (Radice, 2002).

Un compuesto químico muy importante, es la presencia de etileno en el medio de cultivo. Para el cultivo de células, callos y anteras, la acumulación de etileno tiene respuestas inhibitorias. La cantidad de etileno que se obtiene *in vitro*, varía con la especie, el tipo de explante, la concentración de citoquininas en el medio de cultivo, el tipo de agar seleccionado y con la luz (Standring, 1989). Hay que tener en cuenta, que una forma de introducir etileno al medio de cultivo, es a través de la esterilización del material de disección, cuando se lo introduce en alcohol y se lo flamea en un mechero. En muchos casos el etileno actúa como promotor de la morfogénesis, pero luego puede ser inhibitorio para el crecimiento de órganos diferenciados (Reinert, 1983).

Las condiciones físicas que influyen en la morfogénesis de cultivos *in vitro*, son la temperatura, la humedad y la luz. En cuanto a la temperatura, se recomienda que las condiciones *in vitro* se asemejen a las que son óptimas del cultivo estudiado, ya que de esa forma las respuestas esperadas serán mejores. La humedad por otro lado, dependerá de la cobertura del envase. Para la estimulación de formación de callo, es común que se prefiera la obscuridad. Sin embargo, el suministro de luz favorece a la diferenciación de órganos (Radice, 2004).

1.4.5. Regeneración a partir de explantes

La regeneración a partir de explantes, por lo general se realiza con plantas cultivadas *in vitro* (Reinart, 1983). Hay varios factores que se deben tomar en cuenta en la elección del explante para cultivo *in vitro*. Primero que nada, hay que conocer el objetivo del cultivo, ya sea para estudios básicos o para la obtención de plantas con sanidad controlada. Segundo, hay que tener en cuenta la posibilidad de contaminación con microorganismos. Es por esta razón que se prefiere plantas cultivadas *in vitro* o en su excepción plantas cultivadas en invernadero (Radice, 2004). Un aspecto de gran influencia en la morfogénesis del cultivo *in vitro*, es la edad fisiológica del explante. Mientras más joven e indiferenciado sea el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. El tamaño del explante también es determinante. En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos.

También es necesario tomar en cuenta que existe un tamaño mínimo de explante, que depende de la especie y del material vegetal (Sevilla, 2004).

1.4.5.1. Hormonas Reguladoras de Crecimiento

Por lo general, cuando se realiza cultivo de explantes, el medio de cultivo empleado, comúnmente MS, requiere, además de los componentes necesarios de todo medio de cultivo, ser suplementado por hormonas reguladoras de crecimiento. Estas hormonas, inducirán procesos de dediferenciación primero y posteriormente la diferenciación y formación de plantas completas. Hay cinco tipos de reguladores de crecimiento (Radice, 2004).

Auxinas: Son un grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que estimulan el agrandamiento celular e inducen a la formación de raíces. Las más utilizadas en cultivo *in vitro* son el ácido indol acético (IAA), ácido naftalen acético (ANA), ácido 2-diclorofenooxiacético (2,4-D) y ácido indol butírico (IBA). Son muy utilizadas para la formación de callo y para la estimulación para la formación de retoños a partir de explantes vegetales.

Citoquininas: Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que estimulan la división celular e inducen la formación de tallos y hojas. Los más utilizados son el benzil amino purina (BAP), 6-furfuril amino purina (Kinetina) y Zeatina. Ayudan a la formación de callo a partir de explantes vegetales.

Giberelinas: Inducen el alargamiento del tallo y estimulan la germinación de las semillas. Existen más de 60 ácidos giberélicos, pero el más utilizado es el ácido

giberélico 3 (AG₃). No estimulan la formación de callo ni el crecimiento de retoños a partir de explantes vegetales.

Ácido abscísico (ABA): Inhibe el crecimiento, es responsable de la abscisión de hojas, flores y frutos. Participa en el mecanismo de apertura y cierre de las estomas. Se lo utiliza en cultivos *in vitro* para la conservación del germoplasma.

Etileno: Induce la senescencia de las flores y maduración de los frutos. En cultivos *in vitro*, provoca prematura senescencia de las plántulas.

1.5. Factores de Contaminación

1.5.1. Asepsia

Uno de los principales problemas que se presenta en los cultivos *in vitro* es la contaminación por microorganismos, ya sean hongos, levaduras, bacterias, fitoplasma y virus. El ambiente que se genera por el explante, el medio de cultivo y las condiciones físicas de la incubación, es propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos (Lentini, 2001-2002). Por lo general, se estima un impacto de pérdida de un 10% en los laboratorios que se involucran en la micropropagación. Hay dos factores principales que ocasionan la contaminación de los cultivos. El primer factor, son los microorganismos presentes en el interior o en la superficie del explante. El otro factor de contaminación, son las fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. Es recomendable detectar la fuente y el tipo de microorganismos que produce la contaminación, para mantener el éxito de los cultivos, esto ayuda a la planificación de procesos para poder controlarlos (Radice, 2004).

1.5.2. Métodos para la Prevención de Contaminación

Para evitar o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos, es necesario conocer el material vegetal con que se trabaja y las posibles contaminaciones específicas. Es recomendable realizar una adecuada preparación de la planta dadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos. En el proceso de la germinación de semillas, es importante utilizar agua destilada estéril de esa manera se mantiene asepsia en el material vegetal. En algunos materiales vegetales se utiliza la preincubación de los explantes, mediante la cual éstos son desinfectados suavemente y precultivados durante 24 horas en un medio conteniendo sacarosa y finalmente son desinfectados nuevamente y cultivados. Es muy importante emplear medios e instrumentos de cultivos esterilizados. Para su esterilización, en la mayoría de los casos se hace uso del calor, ya sea por medio de llama directa, calor húmedo o calor seco. Siempre que se haga cultivos *in vitro*, hay que realizarlos dentro de una cámara de flujo laminar, que no esté expuesta a corrientes de aire. La mesa de trabajo, los vidrios del gabinete, los recipientes y los instrumentos de trabajo deben ser previamente desinfectados. El operario también debe desinfectar sus manos y antebrazos con alcohol al 70%. Todos estos procesos para evitar la contaminación de los cultivos, aseguran la asepsia de los mismos (Radice, 2004).

1.6. Aclimatación de las Plantas Cultivadas *In Vitro*

El medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares, sales y hormonas reguladoras de crecimiento, y sumándole la ausencia de microorganismos, generan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son transferidas al ambiente externo. Para el éxito de la aclimatación, se

debe realizar un minucioso control de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz), de tal manera, que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo estimular la fotosíntesis para el crecimiento rápido de las plantas. Si el desarrollo de la cutícula es lento y la funcionalidad del aparato estomático es escasa en las hojas, se genera una alta tasa de transpiración, lo que puede ocasionar la muerte por deshidratación. Es imprescindible evitar la exposición a temperaturas extremas tanto en la fase aérea, como en el sustrato. Otro aspecto importante a tener en cuenta, es el sustrato que se va a utilizar. Se puede utilizar arena, perlita, turba, vermiculita o una mezcla de ellos. Hay que realizar una previa esterilización. Es recomendable la agregación de fertilizantes. En todo momento deberá realizarse un riguroso control fitosanitario empleándose antibióticos, fungicidas e insecticidas de uso universal (Radice, 2004).

En la presente investigación se desarrolló un protocolo para la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja de cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol. Se utilizaron hormonas de crecimiento tanto la auxina ANA (0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.09 ppm) como la citoquinina BAP (3, 4 y 5 ppm) a diferentes concentraciones, para determinar una combinación hormonal específica que sea exitosa para la formación de callo y la regeneración de retoños para todas las variedades. Se determinó que la auxina ANA a una concentración de 0.07 ppm, en combinación con la citoquinina BAP a concentraciones de 3 y 4 ppm es exitosa para todas las variedades. Las variedades Amarillo y Negro son las que mejores resultados presentaron para la regeneración de retoños, mientras que la variedad Mora fue la que peor porcentaje de regeneración de retoños presentó.

2. OBJETIVO GENERAL.

Establecer un protocolo *in vitro* para la regeneración de plantas a partir de explantes de hoja de cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol.

3. OBJETIVO ESPECIFICO.

- Probar varias concentraciones de la auxina ANA y citoquinina BAP para la regeneración de retoños de cinco variedades de tomate de árbol.

4. JUSTIFICACIÓN.

El tomate de árbol es una de las frutas de origen Andino que tiene potencial para convertirse en producto de primera para consumo nacional y de exportación, con un alto beneficio económico. Por otro lado, se está difundiendo cada vez más los beneficios que este cultivo tiene para la salud del consumidor. Si bien es cierto que el Ecuador ha tenido un ingreso alto gracias a este cultivo, hay que tener en cuenta que para que esta tendencia continúe, se deberá implementar nuevas técnicas para su manejo. En la actualidad, los países que exportan tomate de árbol, realizan un procedimiento de mejora genética, principalmente, para la resistencia de enfermedades y plagas que afectan al cultivo. El Ecuador, todavía no ha desarrollado un buen programa para las mejoras genéticas en este cultivo, lo que estaría perjudicando a la producción y a la exportación de este producto. Un paso previo que se debe realizar antes de pensar en realizar mejoras genéticas de este cultivo, es el desarrollar una forma por la cual se pueda producir esta fruta en grandes cantidades, una solución es la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja. Para que el proceso de regeneración de retoños sea exitoso se debe determinar una

concentración de las hormonas reguladoras de crecimiento tanto de auxinas como de citoquininas, que sea aplicable a todas las variedades de tomate de árbol.

5. ÁREA DE TRABAJO.

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito. Cumbayá, Ecuador.

6. MATERIALES Y REACTIVOS.

6.1. Material Vegetal

- Se recolectó cinco frutos de cada una de las cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol, de distintos cultivares en la localidad de Natabuela, en la Provincia de Imbabura.

6.2. Materiales para la Germinación *In Vitro* de Semillas y Sub Cultivos

- Alcohol 70%
- Agua Destilada Estéril
- Hipoclorito de Sodio 2.5%
- Tween 20
- Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) a la mitad de su concentración de sales.

6.3. Materiales para la Regeneración a Partir de explantes

- Explante de hoja de cultivo *in vitro*
- Citoquinina Benzil Amino Purina (BAP) a 3, 4 y 5 ppm.
- Auxina Ácido Naftalen Acético (ANA) a 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 y 0.09 ppm.
- Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog 1962)

6.4. Materiales para la Aclimatación de Plantas Regeneradas *In Vitro*

- Sustrato “Tierra Milagrosa”

7. METODOLOGÍA

7.1. Recolección y Almacenamiento del Material Vegetal

El material vegetal se lo recolectó de cuatro distintas haciendas ubicadas en la localidad de Natabuela, en la Provincia de Imbabura. Se recolectó cinco frutos directamente del árbol de tomate, seleccionando los de mejor apariencia y libres de plagas y enfermedades. Posteriormente, se extrajeron las semillas de cada fruto y se las dejó secar a temperatura ambiente por 3 días.

7.2. Germinación *In Vitro* de Semillas

El establecimiento del ensayo de germinación de semillas *in vitro* se realizó en la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol al 70%. Las semillas pasaron por una serie de tratamientos de desinfección. Primero se colocaron por 3 minutos en alcohol al 70%. Luego, se realizó un lavado en agua destilada estéril. Posteriormente se transfirió las semillas a hipoclorito de sodio 2.5 % añadiéndole 4 o 5 gotas de Tween 20, por 15 minutos. Se realizó entre 4 a 5 lavados en agua destilada

estéril. Finalmente, se las sembró en medio de cultivo MS a la mitad de su concentración de sales, suplementado con 30g de sucrosa y 8g de agar a un pH de 5.8 El medio de cultivo fue previamente autoclavado. Se sembraron alrededor de 20 semillas por frasco y se obtuvieron alrededor de 7 a 10 frascos por variedad. Luego, se las incubó en el cuarto de cultivo (Temperatura 18-24 °C y fotoperíodo 16 horas luz, 8 horas oscuridad), alrededor de 10 semanas. Se determinó el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas, de cada variedad de tomate de árbol (Tabla #1).

7.3. Medio de Cultivo para Regeneración de Plantas a partir de Explantes

El medio de cultivo que se utilizó para la regeneración de plantas a partir de explantes, fue el MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 30g de sucrosa y 8g de agar. Adicionalmente, se le añadieron distintas concentraciones de la auxina ANA y la citoquinina BAP (Tabla #2), y se ajustó el pH a 5.8. Se colocó 25 ml de medio de cultivo MS por cada caja Petri de plástico desechable. Se preparó 15 cajas Petri para cada variedad de tomate de árbol, cada una con distintas concentraciones de auxina como de citoquinina (Tabla #2). Se preparó, así mismo, 3 cajas Petri por cada combinación hormonal, Constituyendo 3 repeticiones para cada combinación hormonal de cada variedad.

7.4. Obtención y Cultivo de Explantes *In Vitro*

Los explantes, de cada variedad de tomate de árbol, que se utilizaron para la regeneración de plantas *in vitro*, provinieron de las hojas más jóvenes y de la parte medio, de la planta cultivada *in vitro*. Con material de insición previamente esterilizado y

dentro de la cámara de flujo laminar, se procedió a eliminar los bordes de cada hoja, y se obtuvo entre 4 o 6 explantes con un tamaño promedio de 1 cm². Posteriormente se realizó el cultivo de los explantes de hoja en las distintas cajas Petri. Se cultivó 5 explantes por caja Petri. Como se mencionó anteriormente, se realizó tres repeticiones por cada combinación hormonal. Se cultivaron un total de 225 cajas Petri. Finalmente, se las dejó en incubación por 5 semanas en un cuarto de cultivo, hasta que regeneraron retoños. Se realizó un control a los 14 días para determinar la formación de callo.

7.5. Subcultivo de los Retoños

Una vez que regeneraron retoños a partir de los explantes de hoja, se procedió a realizar subcultivos de los mismos. El medio de cultivo que se utilizó fue el MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 30g de sucrosa y 8g de agar a un pH de 5.8, no se le añadió ninguna hormona reguladora de crecimiento. Se cultivaron cinco retoños por frasco. Sin embargo, el número total de retoños subcultivados por combinación hormonal, no fue el mismo en todas las variedades. El número de frascos obtenidos a partir de cada caja Petri, varió de acuerdo a la cantidad de retoños obtenidos y al nivel de contaminación de cada caja petri.

7.6. Aclimatación de plantas regeneradas *In Vitro*

Antes de realizar la aclimatación de las plántulas obtenidas en el medio MS, se las dejó crecer por 3 semanas hasta que alcanzaron una altura de aproximadamente 6 a 8 cm y formaron raíces. Finalmente, se las transfirió al sustrato. En este experimento el sustrato que se utilizó fue Tierra Milagrosa, previamente autoclavada y contenida dentro de

pequeñas macetas de barro. Previo a la transferencia se eliminó todo residuo del medio de cultivo de la raíz de la planta. Para evitar que las plantas mueran, se las regó con agua una vez al día por 3 semanas aproximadamente o hasta que se observó claramente que las plantas estaban lo suficientemente adaptadas como para transferirlas al campo.

7.7. Análisis Estadístico

7.7.1. Variables Evaluadas

1. Se evaluó el porcentaje de germinación de semillas a las 10 semanas de sembradas, se procedió a contar el número de plantas germinadas y este dato se transformó a porcentaje.
2. Se evaluó el porcentaje de formación de callo. Se contó el número de explantes que habían formado callo y se transformó a porcentaje.
3. Se registró el número de retoños por caja Petri y se transformó a promedio.

7.7.2. Diseño Experimental

El experimento se lo realizó con un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 5x5x3 (variedad x auxinas x citoquininas), con tres observaciones. En cuanto al análisis estadístico, los datos tomados fueron analizados usando el programa estadístico StatView. Se realizó el análisis de la varianza, y la prueba de comparación de media de Tukey al 5 %. Los valores promedio fueron resumidos en forma de gráficos de barras. Para los niveles hormonales se hizo gráficos de líneas para observar la tendencia.

8. RESULTADOS.

8.1. Cuantificación de Germinación de Semilla de Tomate de Árbol *In Vitro*

Se obtuvo entre 7 a 10 frascos, conteniendo veinte semillas de tomate de árbol por frasco, de los cinco frutos de cada variedad. En las variedades Mora y Puntón, la prueba de germinación de semillas *in vitro* se tuvo que repetir, ya que se contaminaron los medios de cultivo. Se determinó que el mayor porcentaje de germinación lo obtuvo la variedad Puntón con un 92 %, seguido del Redondo con un 83 %, en tanto que el menor porcentaje correspondió al Negro con 35 % (Tabla #1). Las hojas de las plantas obtenidas de las distintas variedades por frasco, alcanzaron un tamaño promedio de 4-6 centímetros, de tal manera que se obtuvo entre 4 a 6 explantes por hoja con un tamaño de 1 cm² cada uno.

8.2. Cuantificación de Formación de Callo

Una vez realizado el análisis estadístico (ANOVA), del número de explantes que formaron callo, tomando en cuenta las tres observaciones, se pudo detectar una diferencia significativa, tanto entre las variedades de tomate de árbol, como entre las concentraciones de la auxina ANA, pero no se observó diferencia significativa entre las concentraciones de la citoquinina BAP (Tabla #3). Sin embargo, no hay significancia estadística para la interacción variedades por combinación hormonal. Por otro lado, analizando los resultados obtenidos, se puede decir que la variedad Amarillo fue la que mayor porcentaje de callosidad presentó, en todas las combinaciones hormonales. Por otro lado, la variedad Mora fue la que presentó el menor porcentaje de formación de callo (Figura #1). Los datos de formación de callo de las cinco variedades variedad se

encuentran en las tablas #4, #5, #6, #7 y #8. Se pudo determinar que la combinación hormonal #10 con concentraciones de la auxina ANA de 0.07 ppm y concentración de 3 ppm de la citoquinina BAP, fue la que mejor actuó en todas las variedades (Figura #2). Independientemente, se pudo observar que las concentraciones de 0.05, 0.07 y 0.09 ppm de la auxina ANA tuvieron un rendimiento similar para la formación de callo (Tabla #9), alcanzando su punto máximo la concentración de 0.07 ppm (Figura #3). Por otro lado, las tres concentraciones de la hormona BAP presentaron un rendimiento similar (Figura #4) siendo la concentración de 3 ppm la que mejor actuó (Tabla #10).

8.3. Regeneración de Retoños

En cuanto a la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja, se pudo observar que sí hubo una diferencia significativa entre las distintas variedades, al igual, que entre las combinaciones hormonales (Tabla #11). Se utilizó el programa estadístico ANOVA StatView versión 5.0 para obtener estos resultados. Sin embargo, al igual que en la formación de callo, no hubo una relación entre una variedad específica con una combinación hormonal determinada. Debido a que solo se llevó el control de la regeneración de retoños por 5 semanas, los datos registrados corresponden a este período. Los datos son los promedios de las tres repeticiones para cada variedad (Tabla #12 - #16). Se pudo establecer que la variedad Negra fue la que mejor promedio de regeneración de retoños tuvo para las distintas combinaciones hormonales (Figura #5). Por otro lado, la variedad Mora, al igual que en la formación de callo, fue la que tuvo el promedio más bajo en cuanto a la regeneración de retoños a partir de explantes de hoja (Tabla #17).

No se pudo determinar una clara combinación hormonal que sobresalga de las demás. Sin embargo, las combinaciones hormonales #10 (ANA 0.07 ppm y BAP 3 ppm), #11 (ANA 0.07 ppm y BAP 4 ppm) y #12 (ANA 0.07 ppm y BAP 5 ppm), fueron las que mejor promedio de regeneración de retoños produjeron en las cinco variedades de tomate de árbol (Figura #6). Independientemente, se puede decir que las concentraciones de la auxina ANA de 0.01, 0.03 y 0.05 ppm en combinación con BAP produjeron un porcentaje promedio de regeneración de retoños similar (Tabla #18), siendo la concentración de 0.07 ppm de la auxina ANA la que mayor promedio de regeneración de retoños presentó para todas las variedades (Figura #7). Se ve una diferencia significativa por parte de la concentración de 0.07 ppm de la auxina ANA, sobre las demás concentraciones de la misma auxina (Tabla #18) Pero, no se pudo determinar una concentración específica que sea estadísticamente significativa para la citoquinina BAP en combinación con la auxina ANA para la regeneración de retoños para todas las variedades (Figura #8). Sin embargo, la concentración de 3 ppm fue la que mayor resultado presentó (Tabla #19). Además, se pudo observar que la concentración de 5ppm de la citoquinina BAP fue la que peor promedio de regeneración de retoños presentó (Tabla #19).

8.4. Porcentaje de Enraizamiento.

Debido al nivel de contaminación que sufrieron los cultivos de retoños *in vitro* en algunos de los frascos de las distintas variedades, no fue posible realizar un análisis estadístico que determine diferencias en cuanto al efecto de las combinaciones hormonales sobre el enraizamiento. Por esta razón, los datos obtenidos no se los puede

tomar en cuenta como resultados estadísticos representativos, pero si como datos referenciales. Se pudo determinar, que la variedad Negra fue la que generó mayor enraizamiento, independientemente de la combinación hormonal de la que provino el retoño.

Independientemente del grado de contaminación que se presentó en los retoños, se pudo obtener datos referenciales sobre los porcentajes de enraizamiento que presentó cada variedad. En cuanto a la variedad Amarillo, la combinación hormonal #4 (0.03 ppm ANA y 3 ppm BAP) fue la que mejor porcentaje de enraizamiento dio, con un 60 % de eficacia. Por otro lado, en la variedad Negra, la combinación de hormonas #3 (0.01 ppm ANA y 5 ppm BAP) fue la mejor con un porcentaje de eficacia del 60%. La combinación hormonal #10 (0.07% ppm ANA y 3 ppm BAP), fue la mejor en la variedad Redondo con un porcentaje del 57%. La variedad Mora, fue la que mayor contaminación sufrió, sin embargo, fue la variedad que mejor porcentaje de enraizamiento obtuvo en la combinación hormonal #13 (0.09 ppm ANA y 3 ppm BAP), con un porcentaje del 100%. Finalmente, la concentración de hormonas que dio el porcentaje más alto de enraizamiento, en la variedad Puntón fue la combinación hormonal #8 (0.05 ppm ANA y 4 ppm BAP).

9. DISCUSIÓN.

9.1. Importancia de Repeticiones

Para que los resultados obtenidos de cualquier experimento sean significativos, es importante el número de repeticiones que se realice. Mientras mayor sea el número de repeticiones, mayor será la confiabilidad de los resultados. Por otro lado, es importante

que la implementación del experimento se lo haga por repeticiones, en caso de no poder hacerlo íntegramente en un solo día. Esto es importante ya que se puede introducir factores que afectan las respuestas de las variedades a las combinaciones hormonales y que no permitirían una evaluación objetiva y real. Cada repetición con todas las variedades, debe tener los mismos factores y las mismas condiciones de manejo, para que no exista diferencia entre variedades debido a razones que no sea el efecto de las combinaciones hormonales. Por ejemplo, el ánimo del operador, o el cuidado en la asepsia tanto del material vegetal como del área de trabajo, e incluso, el lugar donde se incubaba al cultivo *in vitro* del explante, afecta al resultado del mismo (Tapia, 1999). En el presente estudio se implementó el ensayo, por repeticiones, dado el alto número de unidades experimentales sugeridas.

9.2. Formación de Callo *In Vitro*

Un factor determinante para la formación de callo *in vitro*, a partir de explante de hoja, es el tamaño del explante (Pierik, 1990). En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tomar en cuenta que existe un tamaño mínimo de explante, que depende de la especie y del material vegetal (Sevilla, 2004). El tamaño del explante va a determinar si se da o no la formación de callo (Pierik, 1990). En este estudio el tamaño por explante fue de 1 cm².

Otro factor, que determina la formación de callo, es la posición del explante en el medio de cultivo. Si el explante de hoja se la coloca con el haz hacia arriba y el envés hacia abajo, se estimula la formación de callo. En el presente estudio, hubo reducidas ocasiones que se cultivó el explante con el envés hacia arriba, lo que ocasionó limitada formación de callo, el cual murió al poco tiempo de formado, sin que se pueda atribuir este comportamiento a razones específicas. Para cualquier tipo de cultivo *in vitro*, hay que ubicar el haz de la hoja hacia arriba, directo a la fuente de luz y el envés debe estar en contacto con el medio de cultivo (Pierik, 1990). La mejor respuesta en callogenesis se puede atribuir a que la nervadura central que tiene, cambia cuando está en contacto con el medio de cultivo y por tanto reacciona mejor a los cambios hormonales.

Es muy importante determinar qué hormonas de crecimiento se va a utilizar de manera que induzcan a la formación de callo. Como ya se mencionó anteriormente, las hormonas de crecimiento, tanto las auxinas como las citoquininas inducen a la división celular del explante vegetal y a la formación de callo, y de acuerdo a la concentración en que se apliquen, determina la formación de raíz, tallo u hoja. Los niveles de auxinas y citoquininas utilizados en este experimento, provienen de un ensayo previo, más amplio. Analizando los resultados obtenidos, se puede determinar que de las concentraciones de la auxina ANA probados hay una que induce exitosamente a la formación de callo para todas las variedades de tomate de árbol (0.07 ppm). Sin embargo, para la citoquinina BAP no hay una concentración específica para la formación de callo, pero se determinó que en concentraciones de 3 ppm, 4 ppm y 5 ppm los resultados son exitosos para la formación de callo para todas las variedades. Sin embargo, la concentración recomendada será 3 ppm ya que atribuiría a la reducción de los costos de producción.

Se pudo diferenciar variedades que respondieron mejor a las combinaciones hormonales para la formación de callo, las variedades Amarillo y Negro fueron las que mayor porcentaje de formación de callo presentaron, mientras que la variedad Mora fue la que presentó el porcentaje más bajo (Tabla #20). Sin embargo, desde el punto de vista estadístico, una combinación hormonal fue la más exitosa para la regeneración de retoños (0.07 ppm de ANA y 3 ppm de BAP) para las cinco variedades de tomate de árbol. Esto se debe a que variabilidad genética entre las distintas variedades de tomate de árbol es muy estrecha (Lentini, 2001)

9.3. Regeneración de Retoños

Analizando los resultados obtenidos, se pudo observar que si hay una diferencia significativa entre las cinco variedades, como entre las concentraciones hormonales, para la regeneración de retoños a partir de explantes. Como se mencionó anteriormente, debido a que no se pudo conocer el número total de retoños que se obtuvieron por callo, no se pudo determinar el 100 % de regeneración de retoños por combinación hormonal. Por lo tanto, el dato estadístico que se obtuvo fue del promedio de las tres repeticiones para cada combinación hormonal de cada variedad. La razón por la cual no se pudo determinar el 100 % de regeneración de retoños se debió a que en este experimento solo se llevó el control para la regeneración de retoños, por un período de 5 semanas. A partir de ese tiempo se realizaron los subcultivos de retoños y no se siguió llevando la cuenta de la regeneración de retoños a partir de los explantes.

La hormona de crecimiento auxina tiende a estimular la formación de raíz, mientras que la citoquinina estimula la formación de retoños. Analizando los resultados

obtenidos, se pudo determinar que la auxina ANA a una concentración de 0.07 ppm, en combinación con una citoquinina BAP asegura al igual que en la formación de callo, una regeneración de retoños exitosa. Sin embargo, no se pudo determinar una concentración específica de la citoquinina BAP que sea exitosa para la formación de callo y la regeneración de retoños para todas las variedades, aunque se comprobó que la citoquinina BAP en concentraciones de 3 y 4 ppm interactúa con la auxina mejor que en concentración de 5 ppm.

Al igual que en la formación de callo, se pudo determinar qué variedad presentó un mayor promedio de eficacia en cuanto a la regeneración de retoños. La variedad Negro es la que mayor promedio de regeneración de retoños presentó en las distintas combinaciones hormonales, mientras que las demás variedades presentaron una respuesta similar entre sí, siendo la variedad Mora la que menor respuesta presentó (Tabla #17).

Observando la combinación hormonal que mayor porcentaje de formación de callo presentó, y la combinación hormonal que presentó mayor promedio de regeneración de retoños, se puede asegurar que si hay una relación entre la formación de callo con la regeneración de retoños, en cuanto a la combinación hormonal que se aplique.

9.4. Porcentaje de Enraizamiento

El porcentaje de enraizamiento obtenido, no es un porcentaje estadístico exacto ya que hubo varios factores que afectaron al resultado. El principal factor fue el índice de contaminación que sufrieron los cultivos de retoños. Una de las hipótesis de la razón de esta contaminación es el mal manejo de los materiales utilizados, como del material vegetal por parte del operador. Es importante que se elimine todo residuo del medio de

cultivo previo, antes de ser transferido al medio de cultivo de retoños. Se recomienda que se eliminen las hojas de mayor tamaño de los retoños regenerados de callo, antes de ser cultivados, ya que propician la contaminación (Radice, 2004). Es por esta razón, que no se pudo utilizar un programa estadístico, que proporcione resultados exactos. Los únicos datos que se utilizaron fueron, qué variedad presentó el menor índice de contaminación y qué retoño proveniente de qué combinación hormonal indujo a la formación de raíz para cada variedad de tomate de árbol. Ningún frasco de ninguna variedad respondió igual con respecto a la combinación hormonal de donde provino la plántula. La variedad Mora fue la que mejor índice de enraizamiento presentó (100%), proveniente de la combinación hormonal #13 (0.09 ppm ANA y 3 ppm BAP). La concentración de la citoquinina BAP a 3 ppm se vio repetida en tres (Amarillo, Mora y Redondo) de las cinco variedades, proporcionando el mejor índice de enraizamiento en esas variedades.

9.5. Justificación del Análisis Estadístico Elegido

El programa estadístico StatView versión 5.0, fue una herramienta fácil de utilizar y muy práctica para el análisis de los datos obtenidos en esta investigación. El programa analiza la varianza y realiza pruebas de comparación entre medios en las distintas variables evaluadas. Los resultados son expresados por medio de gráficas de barra. Sin embargo, fue un limitante en cuanto al análisis de los resultados obtenidos sobre el porcentaje de enraizamiento, ya que al tener frascos contaminados, se generó un elevado número de datos faltantes con lo cuál se hace imposible un análisis estadístico.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

10.1. Conclusiones

El cultivo *in vitro* del tomate de árbol, con propósito de regeneración de retoños a partir de explantes de hoja, respondió a la combinación hormonal de auxinas y citoquininas. Se pudo determinar una combinación hormonal para todas las variedades, para la formación de callo como para la regeneración de retoños. Se pudo determinar que la auxina ANA a una concentración de 0.07 ppm produce exitosamente la inducción para la formación de callo como para la regeneración de retoños, en combinación con la citoquinina BAP a concentraciones de 3 y 4 ppm.

La variedad Amarillo fue la que tuvo el mejor porcentaje de formación de callo para todas las combinaciones hormonales y la variedad Negra fue la que mejor promedio de regeneración de retoños tuvo para todas las combinaciones hormonales. Por otro lado, la variedad Mora fue la que peor rendimiento tuvo para la formación de callo como para la regeneración de retoños.

10.2. Recomendaciones

Hay que tener mucho cuidado de la posición en la que se cultive el explante, ya que si se coloca el explante con el en vez hacia arriba se formará callo pero no regenerará retoño. La posición del explante es un factor determinante para la formación de callo y la regeneración de retoño.

Para obtener regeneración de retoños a partir de explantes de hoja, se debe utilizar la auxina ANA en una concentración de 0.07 ppm en combinación con la citoquinina

BAP a concentraciones de 3 y 4 ppm, y se recomienda que se utilice las variedades Amarillo, Negra y Puntón.

Se debería realizar un ensayo para determinar la cantidad de retoños viables que un explante puede regenerar, de esa forma se podría obtener el porcentaje total de regeneración de retoños por combinación hormonal.

Se debería hacer un estudio sobre la estabilidad genética de los retoños obtenidos, para determinar si han sufrido cambios genéticos.

Se debe buscar balances hormonales que aumenten la eficacia de regeneración en las variedades Redondo y Mora.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Albornoz, G., El tomate de árbol (*Cytophandra betacea* Sendt) en el Ecuador. Universidad Central Ecuador Fundagro, Quito, Ecuador., 1992
2. Arahana, V., (2006-2007). Manual de Laboratorio de Agrobiotecnología
3. Atkinson, R.G., “Regeneration of Transgenic Tamarillo Plants.” Crop Hortic Sci. 18 (1990): 153-156
4. Atkinson, R.G., Eagles. R.M., Forster. R.L.S., y Gardner. R.C., “Genetic Transformation of *Cyphomandra betacea* (Tamarillo).” Crop Hortic Sci. 18 (1990): 276-288
5. Bohs, L. “Ethnobotany of the Genus *Cyphomandra* (Solanaceae).” Economic Botany 43 (1989): 143-163
6. Cárdenas. M., Manual de plantas económicas de Bolivia. Imprenta Icthus, Cochabamba, Bolivia., 1969
7. Guimaraes. M.L., Cruz. G., y Montezuma-Carvalo. J., “Somatic Embriogénesis and Plant Regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.” Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2 (1988): 161-167
8. Lentini. Z., (2001-2002) “Conservación y transformación genética de Lulo (*Solanum quiétense* y tomate de árbol (*Cypomandra betacea*.)
9. Heiser. Ch., y Anderson. G., Prospective on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA., 1999
10. Lewis. D.H., y Considine. J.A., “Pollination and Fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.)” New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science. 27 (1999): 101-112
11. Pierik, R., Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 326 p. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España., 1990
12. Prohens, J., Ruiz, J., y Nuez, F. “Advancing the Tamarillo Harvest by Inducing Postharvest Ripening.” Hort Science 31 (1996): 109-111.
13. Radice, S., Morfogénesis In Vitro. Ed. Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Luís Mroginski. INTA-DDIB, Buenos Aires., 2004. 446p p.

14. Reinert. J., y Yerman M.M., Plant Cell and Tissue Culture. Springer-Verlag, New York., 1983
15. Sevilla, R., y Holle, M., Recursos Genéticos Vegetales. Ediciones Torre Azul, Primera Edición, Perú., 2004
16. SOL-System-Draft 2.0. “The Internacional Solanacea Genome Project (SOL): Systems Approach to Diversity and Adaptation”., 2004
17. Soria. N., “Manejo pre y post-cosecha de frutales y hortalizas para exportación.” PROCIANDINO. Ecuador, Quito., 1996
18. Stranding, L., Pringle, G., y Murray, B. “The Control of Chloroplast Number in *Solanum muricatum* Ait. and *Chytopandra betacea* (Cav.) Sendt. and its value as an indicator of polyploidy.” Euphytica 47 (1990): 71-77.
19. Tapia. M., Agrobiodiversidad en los Andes. Fundación Frederich Ebert. Lima, Perú., 1999
20. Wendt. J., y Izquierdo. J., “Manejo y Gestión de la biotecnología Agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador.” Fundación REDBIO Internacional y Oficina Regional de la FAO. Santiago, Chile., 2002

12. TABLAS.

Tabla #1. Porcentaje de Germinación *In Vitro* de Semillas

	# Semillas por frasco	# Frascos sembrados	# Frascos obtenidos	Porcentaje %
Amarillo	20	16	12	75
Negro	20	20	7	35
Redondo	20	12	10	83
Puntón	20	12	11	92
Mora	20	12	7	58

Tabla #2. Concentraciones de Hormonas BAP y ANA

		BAP ppm	
ANA ppm	3	4	5
0.01	#1	#2	#3
0.03	#4	#5	#6
0.05	#7	#8	#9
0.07	#10	#11	#12
0.09	#13	#14	#15

* Los recuadros que están con el signo #, representan las combinaciones que existentes entre la citoquinina BAP y la auxina ANA, a diferentes concentraciones.

Tabla #3. Análisis de Varianza de Callosidad

Variabes	GL	+ de los cuadrados	Media	Valor-F	Valor-P
Variedades	4	126.204	31.551	25.263	<.0001
Auxina	4	122.916	30.729	24.605	<.0001
Citoquinina	2	2.036	1.018	.815	.4446
Variedad * Auxina	16	31.351	1.959	1.569	.0838
Variedad * Citoquinina	8	7.076	.884	.708	.6840
Auxina * Citoquinina	8	10.764	1.346	1.077	.3820
Variedad * Auxina * Citoquinina	32	49.236	1.539	1.232	.2029
Diferencia	150	187.333	1.249		

* Las siglas GL representan Grados de Libertad. Se puede observar en los valores-P que si hay una diferencia significativa de las variedades entre si (el signo < representa significancia). Se puede observar que si hay diferencia significativa entre las concentraciones de auxina. El signo * representa interacción. La interacción variedad * auxina demuestra que si hay relación entre las dos variables, pero no con la citoquinina (variedad * citoquinina) ni entre hormonas (auxina * citoquinina).

Tabla #4. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Amarillo

AMARILLO				
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	4	1	3	53,3
0.01 + 4	1	2	5	53,3
0.01 + 5	5	3	5	86,7
0.03 + 3	4	5	4	86,7
0.03 + 4	4	5	5	93,3
0.03 + 5	3	5	5	86,7
0.05 + 3	5	5	5	100,0
0.05 + 4	5	5	5	100,0
0.05 + 5	4	5	5	93,3
0.07 + 3	5	5	5	100,0
0.07 + 4	5	5	5	100,0
0.07 + 5	5	5	5	100,0
0.09 + 3	5	5	5	100,0
0.09 + 4	5	5	4	93,3
0.09 + 5	5	5	5	100,0

* Se observa el porcentaje de formación de callo de la variedad Amarillo obtenida de 3 repeticiones (I, II, III) para todas las combinaciones hormonales. La mayoría de las combinaciones demostraron un alto rendimiento. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #5. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Mora

MORA				
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	5	3	4	80,0
0.01 + 4	0	1	0	6,7
0.01 + 5	0	0	3	20,0
0.03 + 3	0	5	0	33,3
0.03 + 4	1	0	0	6,7
0.03 + 5	4	0	3	46,7
0.05 + 3	4	0	0	26,7
0.05 + 4	5	1	2	53,3
0.05 + 5	3	3	2	53,3
0.07 + 3	2	3	4	60,0
0.07 + 4	5	3	4	80,0
0.07 + 5	1	4	4	60,0
0.09 + 3	3	3	3	60,0
0.09 + 4	5	4	0	60,0
0.09 + 5	4	3	1	53,3

* Se observa el porcentaje de formación de callo de la variedad Mora obtenida de 3 repeticiones (I, II, III) para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que la formación de callo para todas las combinaciones hormonales tiene un bajo rendimiento. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #6. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Negro

NEGRA	I	II	III	%
#1	3	2	4	60,0
#2	3	3	4	66,7
#3	2	3	4	60,0
#4	4	4	5	86,7
#5	4	3	4	73,3
#6	4	4	4	80,0
#7	5	5	5	100,0
#8	5	3	3	73,3
#9	5	4	5	93,3
#10	4	5	4	86,7
#11	5	5	5	100,0
#12	5	4	5	93,3
#13	5	5	5	100,0
#14	5	5	4	93,3
#15	3	5	4	80,0

*Se observa el porcentaje de formación de callo de la variedad Negro obtenida de 3 repeticiones para todas las combinaciones hormonales. La mayoría de las combinaciones demostraron un alto rendimiento.

Tabla #7. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Redondo

REDONDO	I	II	III	%
#1	0	2	2	26,7
#2	1	1	2	26,7
#3	2	0	1	20,0
#4	5	4	5	93,3
#5	3	5	2	66,7
#6	4	3	3	66,7
#7	5	5	4	93,3
#8	3	5	5	86,7
#9	4	4	5	86,7
#10	5	5	5	100,0
#11	4	5	5	93,3
#12	4	0	4	53,3
#13	5	4	4	86,7
#14	5	5	4	93,3
#15	4	5	5	93,3

* Se observa el porcentaje de formación de callo de la variedad Redondo obtenida de 3 repeticiones para todas las combinaciones hormonales. Se destaca la combinación hormonal # 10 (0.07 ppm ANA y 3 ppm BAP).

Tabla #8. Porcentaje de Formación de Callo de la Variedad Puntón

PUNTÓN	I	II	III	%
#1	0	2	4	40,0
#2	2	1	5	53,3
#3	3	5	3	73,3
#4	5	5	2	80,0
#5	2	1	5	53,3
#6	3	4	3	66,7
#7	3	4	5	80,0
#8	5	4	5	93,3
#9	5	4	5	93,3
#10	5	5	5	100,0
#11	5	5	4	93,3
#12	5	4	5	93,3
#13	4	5	5	93,3
#14	5	5	5	100,0
#15	4	5	5	93,3

* Se observa el porcentaje de formación de callo de la variedad Mora obtenida de 3 repeticiones para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que las combinaciones hormonales #10 y #14 tuvieron el mayor índice de formación de callo.

Tabla #9. Promedios y Rangos de Significación entre las Concentraciones de la Auxina para la Formación de callo

Concentración auxinas (ppm)	Promedio (número)	Rango
0.07	4.37	A
0.09	4.33	A
0.05	4.08	A
0.03	3.40	B
0.01	2.42	B

* Se puede observar que la concentración de la auxina ANA al 0.07 ppm fue la que mejor actuó entre las otras concentraciones de la auxina, pero tiene un resultado muy parecido a la concentración de 0.09 y 0.05 ppm. Por otro lado las concentraciones de 0.03 y 0.01 ppm de ANA son similares entre si. La concentración de 0.01 ppm de la auxina fue la que menor porcentaje de formación de callo presentó. Las concentraciones que tienen la letra A significa que son similares entre si y las concentraciones que tienen la letra B significa que son similares entre ellas.

Tabla #10. Promedios y Rangos de Significación entre las Concentraciones de la Citoquinina para la Formación de callo

Concentraciones BAP (ppm)	Promedio (número)	Rango
3	3.85	A
4	3.63	A
5	3.69	A

* Se puede observar que ninguna concentración de la citoquinina BAP presentó diferencia significativa entre si, para la formación de callo. Las tres concentraciones son similares entre si. Todas las concentraciones tienen la letra A, esto significa que son similares entre si.

Tabla #11. Análisis de Varianza de Regeneración de Retoño

Variedades	GL	+ de los cuadrados	Media	Valor-F	Valor-P
Variedades	4	110.889	27.722	4.077	.0036
Auxina	4	112.311	28.078	4.129	.0033
Citoquinina	2	33.707	16.853	2.478	.0873
Variedad * Auxina	16	30.578	1.911	.281	.9973
Variedad * Citoquinina	8	3.271	.409	.060	.9999
Auxina * Citoquinina	8	33.049	4.131	.608	.7705
Variedad * Auxina * Citoquinina	32	128.196	4.006	.589	.9596
Diferencia	150	1020.000	6.800		

* Las siglas GL representan Grados de Libertad. Se puede observar en los valores-P que si hay una diferencia significativa de las variedades entre si. Se puede observar que si hay diferencia significativa entre las concentraciones de auxina. El signo * representa interacción. La interacción variedad * auxina demuestra que no hay relación entre las dos variables, al igual que con la citoquinina (variedad * citoquinina) ni entre hormonas (auxina * citoquinina).

Tabla #12. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Amarillo

AMARILLO				Media
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	0	0	10	3,3
0.01 + 4	1	0	2	1,0
0.01 + 5	2	0	0	0,7
0.03 + 3	0	0	5	1,7
0.03 + 4	0	5	0	1,7
0.03 + 5	0	3	2	1,7
0.05 + 3	1	2	0	1,0
0.05 + 4	0	1	1	0,7
0.05 + 5	0	0	5	1,7
0.07 + 3	3	2	1	2,0
0.07 + 4	0	6	7	4,3
0.07 + 5	7	5	4	5,3
0.09 + 3	7	8	0	5,0
0.09 + 4	0	3	3	2,0
0.09 + 5	0	3	0	1,0

* Se observa el promedio de regeneración de retoños de la variedad Amarillo obtenida de 3 (I, II, III) repeticiones para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que las combinaciones hormonales 0.07 ppm de auxina + 4 ppm de citoquinina, 0.07 ppm de auxina + 5 ppm de citoquinina y 0.09 ppm de auxina + 3 ppm de citoquinina tuvieron el mayor índice de regeneración de retoños. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #13. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Negra

NEGRA				Media
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	0	0	19	6,3
0.01 + 4	5	0	5	3,3
0.01 + 5	3	1	1	1,7
0.03 + 3	0	9	0	3,0
0.03 + 4	2	2	3	2,3
0.03 + 5	4	4	2	3,3
0.05 + 3	0	0	10	3,3
0.05 + 4	2	0	2	1,3
0.05 + 5	3	3	3	3,0
0.07 + 3	6	9	3	6,0
0.07 + 4	4	3	6	4,3
0.07 + 5	5	5	5	5,0
0.09 + 3	3	2	3	2,7
0.09 + 4	5	3	6	4,7
0.09 + 5	4	3	3	3,3

* Se observa el promedio de regeneración de retoños de la variedad Negro obtenida de 3 repeticiones (I, II, III) para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que las combinaciones hormonales 0.07 ppm de auxina + 3 ppm de citoquinina, 0.07 ppm de auxina + 4 ppm de citoquinina y 0.07 ppm de auxina + 5 ppm de citoquinina tuvieron el mayor índice de regeneración de retoños. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #14. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Redondo

REDONDO				Media
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	4	4	2	3,3
0.01 + 4	0	0	0	0,0
0.01 + 5	3	1	1	1,7
0.03 + 3	0	0	4	1,3
0.03 + 4	1	3	1	1,7
0.03 + 5	2	0	3	1,7
0.05 + 3	1	1	3	1,7
0.05 + 4	2	0	3	1,7
0.05 + 5	0	4	3	2,3
0.07 + 3	0	8	6	4,7
0.07 + 4	0	0	6	2,0
0.07 + 5	2	0	2	1,3
0.09 + 3	0	4	1	1,7
0.09 + 4	4	0	2	2,0
0.09 + 5	0	0	4	1,3

* Se observa el promedio de regeneración de retoños de la variedad Redondo obtenida de 3 repeticiones (I, II, III) para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que la combinación hormonal 0.07 ppm de la auxina + 3 ppm de la citoquinina tuvo el mejor promedio de regeneración de retoños. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #15. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Mora

MORA				Media
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	3	0	5	2,7
0.01 + 4	0	0	0	0,0
0.01 + 5	0	0	3	1,0
0.03 + 3	0	5	0	1,7
0.03 + 4	1	0	0	0,3
0.03 + 5	0	0	1	0,3
0.05 + 3	5	0	0	1,7
0.05 + 4	1	1	1	1,0
0.05 + 5	0	0	0	0,0
0.07 + 3	4	2	3	3,0
0.07 + 4	2	4	2	2,7
0.07 + 5	0	6	5	3,7
0.09 + 3	0	0	4	1,3
0.09 + 4	3	3	0	2,0
0.09 + 5	0	4	0	1,3

* Se observa el promedio de regeneración de retoños de la variedad Mora obtenida de 3 repeticiones (I, II, III) para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que las combinaciones hormonales 0.07 ppm de auxina + 3 ppm de citoquinina, 0.07 ppm de auxina + 4 ppm de citoquinina y 0.07 ppm de auxina + 5 ppm de citoquinina tuvieron el mayor índice de regeneración de retoños. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #16. Promedio de Regeneración de Retoños de la Variedad Puntón

PUNTÓN				Media
C. H. (ppm)	I (# de callo)	II (# de callo)	III (# de callo)	%
0.01 + 3	0	6	0	2,0
0.01 + 4	2	0	1	1,0
0.01 + 5	4	4	2	3,3
0.03 + 3	7	7	0	4,7
0.03 + 4	0	0	5	1,7
0.03 + 5	0	6	0	2,0
0.05 + 3	0	2	3	1,7
0.05 + 4	1	1	0	0,7
0.05 + 5	0	4	0	1,3
0.07 + 3	3	2	3	2,7
0.07 + 4	4	4	4	4,0
0.07 + 5	4	0	5	3,0
0.09 + 3	3	3	4	3,3
0.09 + 4	0	2	6	2,7
0.09 + 5	5	3	2	3,3

* Se observa el promedio de regeneración de retoños de la variedad Mora obtenida de 3 repeticiones para todas las combinaciones hormonales. Se puede observar que las combinaciones hormonales 0.03 ppm de la auxina + 3 ppm de la citoquinina y 0.07 ppm de la auxina + 4 ppm de la citoquinina tuvieron el mayor índice de regeneración de retoños. Las siglas C.H. representan Combinación Hormonal entre una concentración de la auxina ANA + una concentración de la citoquinina BAP.

Tabla #17. Promedios y Rangos de Significación para la Regeneración de Retoños

Variedad	Promedio callosidad (%)	Rango
Negro	3.58	A
Puntón	2.49	B
Amarillo	2.20	B
Redondo	1.89	B
Mora	1.51	B

* Se puede observar que la variedad Negro es significativamente diferente que el resto de las variedades. Es la que mayor promedio presentó para la regeneración de retoños. Las demás actuaron bastante similar entre si. Las variedades que tienen la letra A significa que son similares entre si y las variedades que tienen la letra B significa que son similares entre ellas.

Tabla #18. Promedios y Rangos de Significación entre las Concentraciones de la Auxina para la Regeneración de Retoños

Concentración auxinas (ppm)	Promedio (número)	Rango
0.07	3.60	A
0.09	2.50	A
0.01	2.09	B
0.03	1.93	B
0.05	1.53	B

* Se puede observar claramente que la concentración de 0.07 ppm de la auxina ANA es significativamente diferente que el resto de concentraciones y la que mayor promedio de regeneración de retoños presentó. Las concentraciones de 0.01, 0.03 y 0.05 ppm son similares entre si. Las concentraciones que tienen la letra A significa que son similares entre si y las concentraciones que tienen la letra B significa que son similares entre ellas.

Tabla #19. Promedios y Rangos de Significación entre las Concentraciones de la Citoquinina para la Regeneración de Retoños

Concentración BAP (ppm)	Promedio	Rango
3	2.87	A
4	2.17	A
5	1.96	A

* Se puede observar que no hay una diferencia significativa entre las tres concentraciones. Sin embargo, la concentración 3 ppm es la que mayor promedio de regeneración de retoños tiene. Todas las concentraciones tienen la letra A, esto significa que son similares entre si.

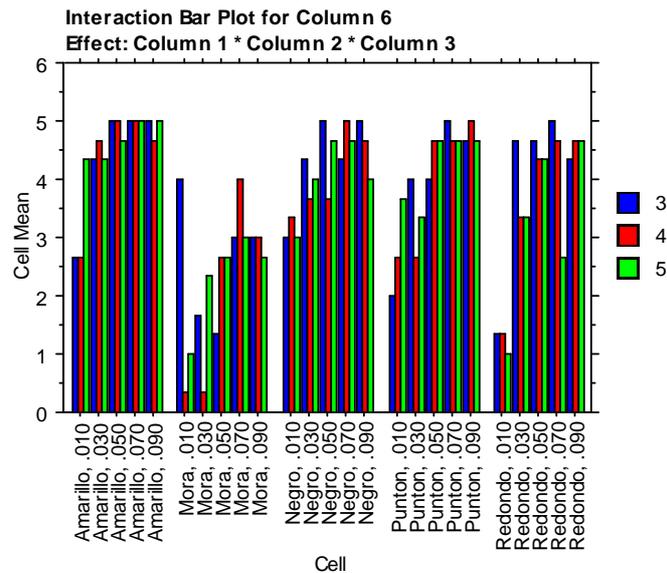
Tabla #20. Promedios y Rangos de Significación para la Callosidad

Variedad	Promedio callosidad (%)	Rango
Amarillo	4.49	A
Negro	4.16	AB
Puntón	4.02	BC
Redondo	3.62	C
Mora	2.33	D

* La variedad Amarillo y Negro respondieron bastante similar, presentando el mayor porcentaje para la formación de callo. Por otro lado, la variedad Mora presentó una diferencia significativa entre las demás variedades siendo la que menor porcentaje de formación de callo presentó. Las variedades que tienen como rango la misma letra mayúscula, significa que son similares entre si.

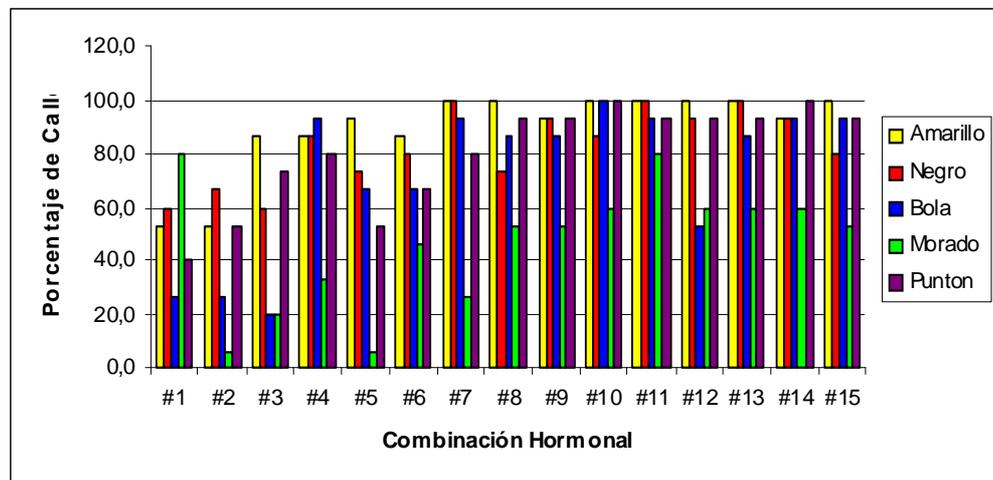
13. FIGURAS.

Figura #1. Interacción de las Variedades con la Auxina y la Citoquinina para la Formación de Callo



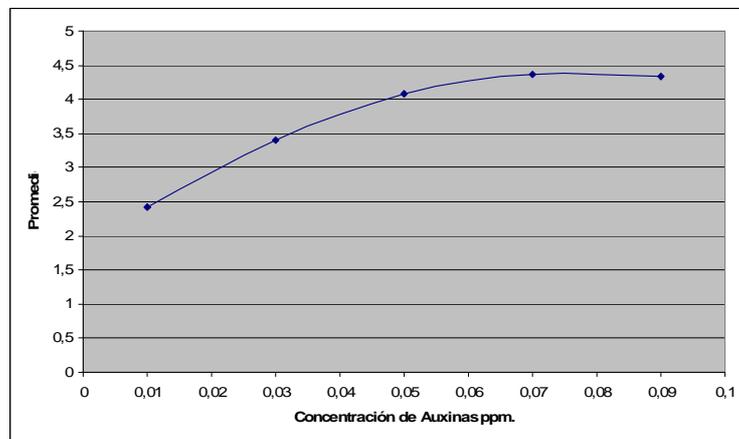
* Las barras nos indican la hormona citoquinina BAP. Cada color representa una concentración diferente de la citoquinina BAP y como esta interactúa con cada variedad y con cada concentración de la auxina ANA, para la formación de callo.

Figura #2. Comparación de las Combinaciones Hormonales vs el Porcentaje de Callosidad de las 5 Variedades



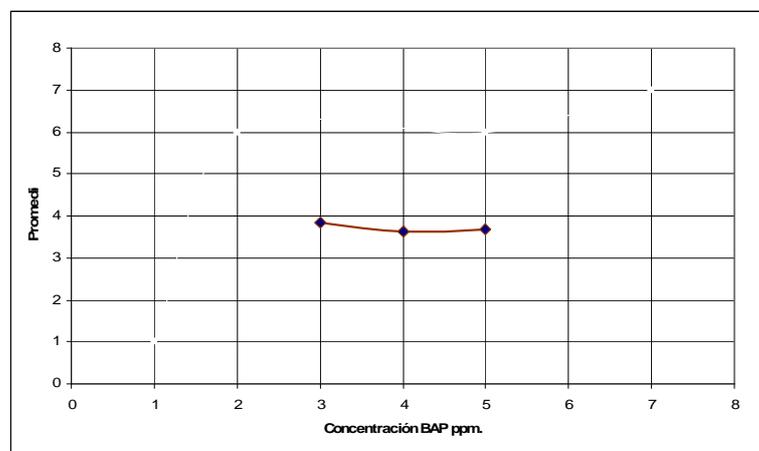
* Se observa el porcentaje de formación de callo que tuvo cada variedad con respecto a todas las combinaciones hormonales. Las combinaciones hormonales #10 y #11, son las que proporcionaron el mejor porcentaje. Se puede observar que la variedad Amarillo fue la que mejor porcentaje de formación de callo tuvo para todas las combinaciones hormonales.

Figura #3. Comparación de las Concentraciones de Auxina para la Formación de Callo



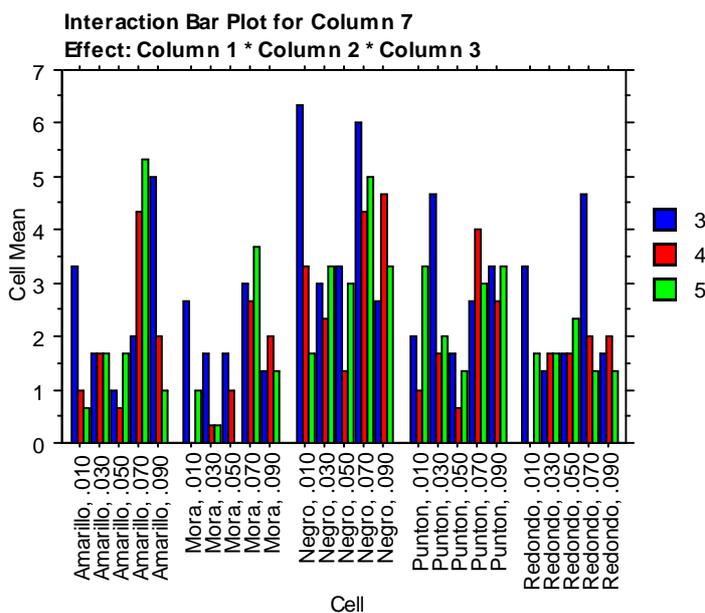
* Se observar que una concentración de 0.07 ppm. para la auxina ANA presentó el mayor promedio para la formación de callo.

Figura #4. Comparación de la Concentración de BAP para la Formación de Callo



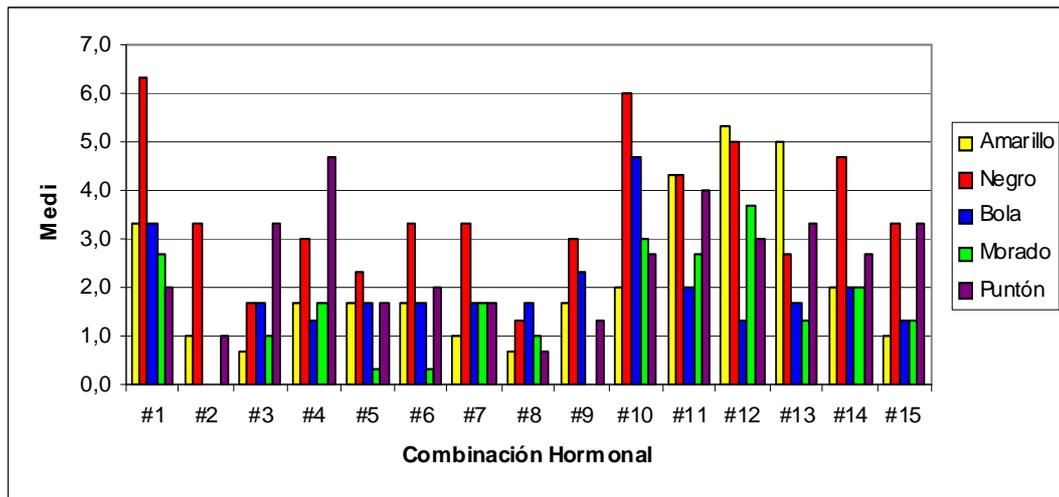
* Se observa que no existe una diferencia significativa entre las tres concentraciones de la hormona BAP para la formación de callo.

Figura #5. Interacción de las Variedades con la Auxina y la Citoquinina para la Regeneración de Retoños



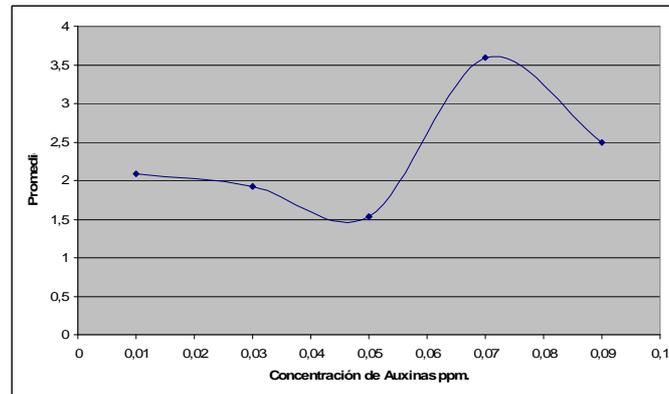
* Las barras nos indican la hormona citoquinina BAP. Cada color representa una concentración diferente de la citoquinina BAP y como esta interactúa con cada variedad y con cada concentración de la auxina ANA, para la regeneración de retoños.

Figura #6. Comparación de las Combinaciones Hormonales vs el Promedio de Regeneración de Retoño de las 5 Variedades



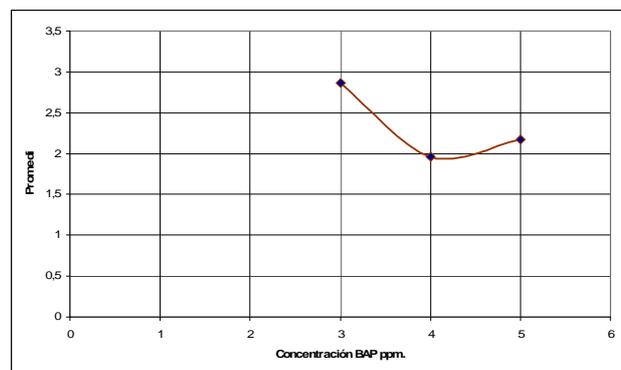
* Se observa el promedio de regeneración de retoños que tuvo cada variedad con respecto a todas las combinaciones hormonales. Las combinaciones hormonales #10, #11 y #12 son las que proporcionaron el mejor porcentaje. Se puede observar que la variedad Negro fue la que mejor porcentaje de formación de callo tuvo para todas las combinaciones hormonales.

Figura #7. Comparación de la Combinación de Auxinas para la Regeneración de Retoño



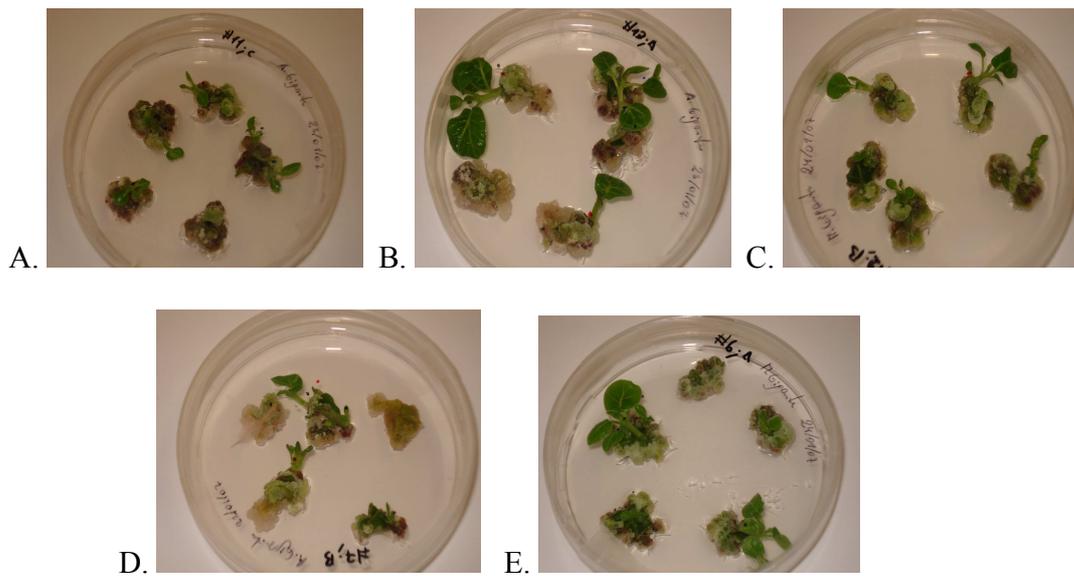
* Se observar que una concentración de 0.07 ppm. para la auxina ANA presentó el mayor promedio para la regeneración de retoños.

Figura #8. Comparación de la Combinación de BAP para la Regeneración de Retoños



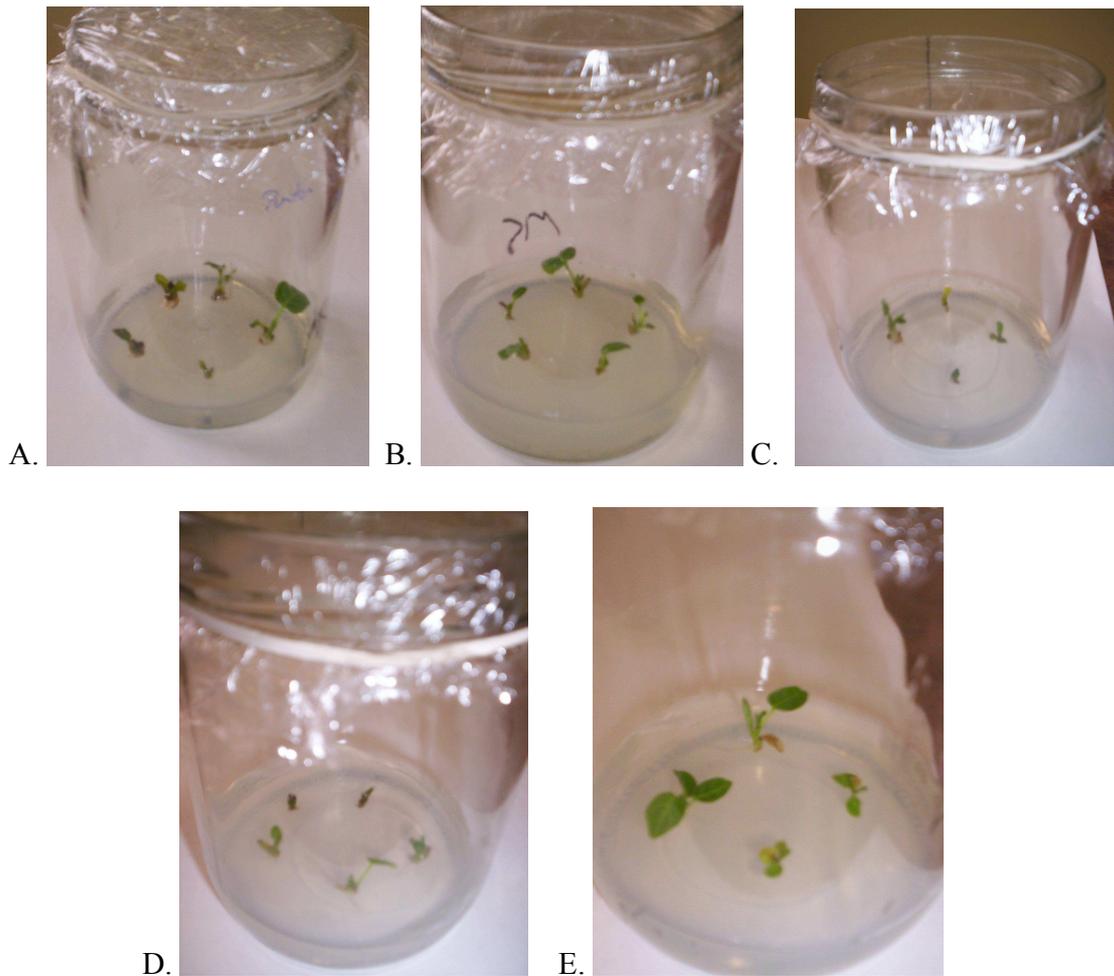
* Se observa que no existe una diferencia significativa entre las tres concentraciones de la hormona BAP para la regeneración de retoños.

Figura #9. Formación de Callo de las 5 Variedades Ecuatorianas



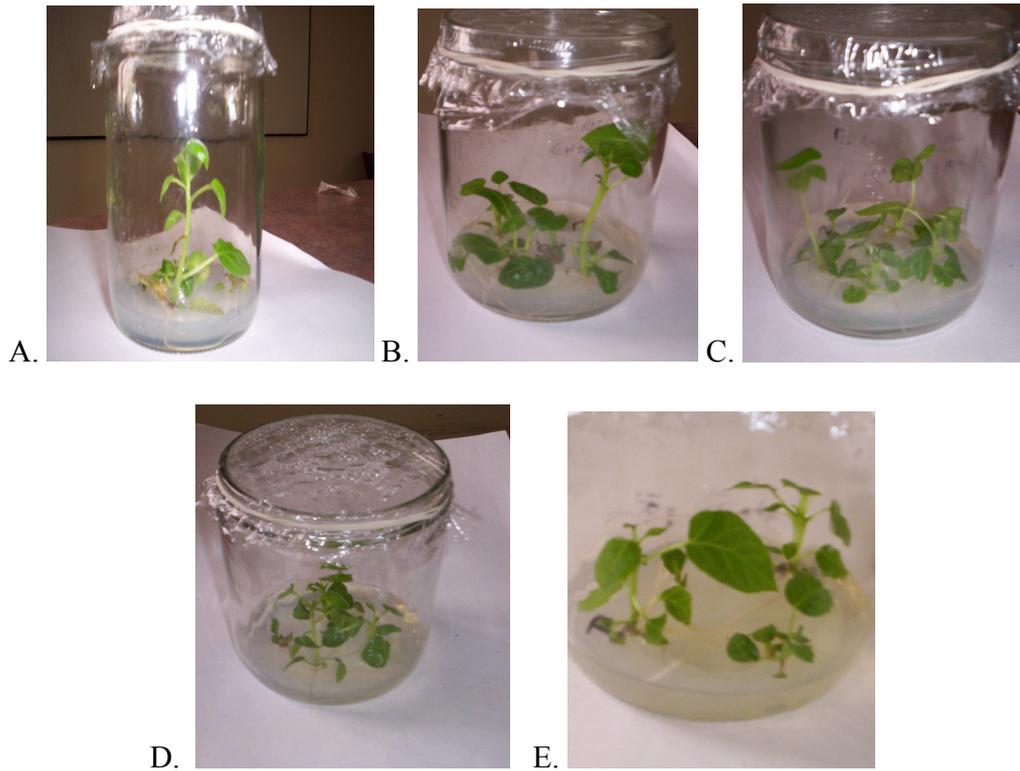
* Se observan formación de callo de las cinco variedades con distintas combinaciones hormonales. A. Variedad Amarillo en combinación hormonal de 0.07 ppm de auxina ANA y 4 ppm de la citoquinina BAP. B. Variedad Negro en combinación hormonal de 0.09 ppm de auxina ANA y 3 ppm de la citoquinina BAP. C. Variedad Redondo en combinación hormonal de 0.07 ppm de auxina ANA y 5 ppm de la citoquinina BAP. D. Variedad Mora en combinación hormonal de 0.05 ppm de auxina ANA y 3 ppm de la citoquinina BAP y E. Variedad Puntón en combinación hormonal de 0.03 ppm de auxina ANA y 5 ppm de la citoquinina BAP.

Figura # 10. Regeneración de Retoño de las 5 Variedades



* Se observan la regeneración de retoños de las cinco variedades con distintas combinaciones hormonales. A. Variedad Amarillo en combinación hormonal de 0.07 ppm de auxina ANA y 3 ppm de la citoquinina BAP. B. Variedad Negro en combinación hormonal de 0.07 ppm de auxina ANA y 5 ppm de la citoquinina BAP. C. Variedad Redondo en combinación hormonal de 0.03 ppm de auxina ANA y 5 ppm de la citoquinina BAP. D. Variedad Mora en combinación hormonal de 0.05 ppm de auxina ANA y 5 ppm de la citoquinina BAP y E. Variedad Puntón en combinación hormonal de 0.07 ppm de auxina ANA y 4 ppm de la citoquinina BAP.

Figura #11. Enraizamiento de las 5 Variedades



* Se observan el enraizamiento de las cinco variedades. A. Variedad Amarillo. B. Variedad Negro. C. Variedad Redondo. D. Variedad Mora y E. Variedad Puntón. Las plántulas tienen una altura promedio de 5 cm², Están listas para se aclimatadas.