



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**AUTOR: OSCAR MAURICIO MIRANDA BUENAÑO**

**TEMA: EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES  
PROMISORIOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.),  
RESISTENTES/TOLERANTES A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp*).**

**DIRECTOR: ING. GUSTAVO NUÑEZ, Mg. Sc.**

**CODIRECTOR: ING. PATRICIO VACA, Mg.**

**BIOMETRISTA: ING. VINICIO UDAY, Mg. Sc.**

**SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS-ABRIL 2014**

## CERTIFICACIÓN

Los suscritos docentes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Santo Domingo, certificamos que el proyecto de investigación de grado titulado “EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES PROMISORIOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.), RESISTENTES/TOLERANTES A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp.*)”, cumple las disposiciones reglamentarias establecidas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Esta investigación desarrollada por el egresado OSCAR MAURICIO MIRANDA BUENAÑO fue guiada en forma permanente por nuestra parte y en las conclusiones y recomendaciones de este documento, se destaca la importancia para la obtención de variedades resistentes/tolerantes de tomate de árbol a antracnosis.

Santo Domingo, abril del 2014

-----  
Ing. Gustavo Nuñez, Mg. Sc.

DIRECTOR

-----  
Ing. Patricio Vaca, Mg.

CODIRECTOR

## AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

OSCAR MAURICIO MIRANDA BUENAÑO

Declaro que:

El proyecto de investigación de grado denominado “EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES PROMISORIOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.), RESISTENTES/TOLERANTES A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp.*)”, fue desarrollado con base a una investigación profunda, respetando derechos intelectuales de terceros, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente todas las ideas y criterios emitidos en la presente investigación son de absoluta y exclusiva responsabilidad de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Santo Domingo, abril del 2014

-----

Oscar Mauricio Miranda Buenaño

## AUTORIZACIÓN

Yo, Oscar Mauricio Miranda Buenaño.

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE la publicación en la biblioteca virtual de la institución el trabajo “EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES PROMISORIOS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.), RESISTENTES/TOLERANTES A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp.*)”, manifestando que el contenido, ideas y discusiones son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Santo Domingo, abril del 2014

-----  
Oscar Mauricio Miranda Buenaño

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES PROMISORIOS DE  
TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.), RESISTENTES/TOLERANTES  
A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum* spp.)

OSCAR MAURICIO MIRANDA BUENAÑO

REVISADO Y APROBADO

-----  
ING. ALFREDO VALAREZO

DIRECTOR DE CARRERA

INGENIERÍA AGROPECUARIA

-----  
Ing. Gustavo Núñez, Mg. Sc.

DIRECTOR

-----  
Ing. Patricio Vaca, Mg.

CODIRECTOR

-----  
Ing. Vinicio Uday, Mg. Sc.

BIOMETRÍSTA

-----  
Dr. Ramiro Cueva Villamarín

SECRETARIO ACADÉMICO

## **DEDICATORIA**

A mis padres Lida y Flavio por ser la fuente de mi inspiración, gracias a su tenacidad y templanza he culminado uno de mis anhelos.

## AGRADECIMIENTO

A mis padres que con su inmenso amor y apoyo lograron encaminarme y guiarme en el cumplimiento de mis metas y objetivos.

A mi madre Lida por ser mi fuente de inspiración y la persona que más admiro su constante esfuerzo y apoyo incondicional ha sido fundamental para alcanzar mis sueños.

A mi padre Flavio por ser mi guía y de quien admiro su tenacidad y convicción, gracias por las enseñanzas y consejos.

A mi hermana Erika por el apoyo incondicional y por los momentos compartidos, gracias por ser mi confidente.

A mi abuelito Aníbal, a todos mis tíos en especial a Nivito, Dina, Bolívar, Enrique, Fabiola, a mis primos en especial a Javier, tíos políticos gracias por su constante apoyo y deseos para alcanzar mis metas,

A la Ing. Jaqueline Benítez técnica del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) y al Dr. Eduardo Morillo, líder del DNB por brindarme la oportunidad de ser miembro de un grupo de trabajo excelente, gracias por sus consejos y colaboración científica para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al INIAP en especial al programa Nacional de Fruticultura, a su líder el Dr. Wilson Vásquez y sus colaboradores Ing. Pablo Viteri, Ing. Willian Viera por ser partícipes activos de mi proyecto por su colaboración y la apertura para desarrollar mi trabajo.

A mis inolvidables amigos de INIAP con quien compartí muchas experiencias que se plasmaron en mi vida: Andy, Dianita I, Magus, Víctor, Santiago, Salomé, Dianita V, Andrea, Jhoana, Ligia, Naty, Sory, Katty, Gaby, Señor Geo y Señor Mary gracias por todo el cariño y momentos compartidos.

Al Ing. Gustavo Nuñez, Ing. Patricio Vaca e Ing. Vinicio Uday por su guía y tutoría en la realización de mi trabajo investigativo, gracias por sus acertadas recomendaciones e indicaciones y su colaboración constante en la culminación de mi proyecto.

A la ESPE en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias Santo Domingo por convertirse en mi casa durante varios años de mi vida estudiantil, donde tuve la oportunidad de conocer grandes amigos, compañeros, colaboradores y gente muy importante.

A todos mis amigos y mis compañeros de universidad en especial Amanda y Carlos, con quien compartí tantos momentos y anécdotas que quedarán grabadas en mi mente, gracias por las palabras de aliento por su motivación.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 GENERALIDADES DEL TOMATE DE ÁRBOL.....	6
2.2 CULTIVO DE TEJIDOS.....	12
2.2 SELECCIÓN <i>in vitro</i> .....	20
2.4 ANTRACNOSIS ( <i>Colletotrichum spp.</i> ).....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	29
3.2. MATERIALES.....	31
3.3. MÉTODOS.....	33
IV. RESULTADOS.....	49
V. DISCUSIÓN.....	87
VI. CONCLUSIONES.....	96
VII. RECOMENDACIONES.....	100
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	101
IX. ANEXOS.....	111

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°-	PÁGINA
Cuadro 1.	Tratamientos para la determinación de un medio de cultivo.....34
Cuadro 2.	Tratamientos para la inoculación de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....39
Cuadro 3.	Tratamientos para la determinación de un medio de Enraizamiento.....46
Cuadro 4.	Cuadrados medios y nivel de significancia.....50
Cuadro 5.	Porcentaje de explantes necrosados/oxidados.....50
Cuadro 6.	Porcentaje de explantes contaminados.....53
Cuadro 7.	Porcentaje de explantes vivos.....55
Cuadro 8.	Porcentaje de explantes con presencia de brotes.....59
Cuadro 9.	Promedio de longitud de explantes.....66
Cuadro 10.	Cuadrados medios y nivel de significancia.....70
Cuadro 11.	Porcentajes de resistencia, tolerancia y susceptibilidad A los 8 días.....75
Cuadro 12.	Porcentajes de resistencia, tolerancia y susceptibilidad A los 12 días.....76
Cuadro 13.	Cuadrados medios y nivel de significancia.....77
Cuadro 14.	Porcentajes con emisión de raíz.....78
Cuadro 15.	Promedio del número de raíces.....81
Cuadro 16.	Promedio de longitud de raíz.....84
Cuadro 17.	Medio de cultivo uno (M1).....111
Cuadro 18.	Medio de cultivo dos (M2).....112
Cuadro 19.	Medio de enraizamiento uno (ME1).....114
Cuadro 20.	Medio de enraizamiento dos (ME2).....114

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°-	PÁGINA
Figura 1.	Ubicación Estación Experimental Santa Catalina.....29
Figura 2.	Porcentaje de explantes necrosados.....51
Figura 3.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable necrosis.....51
Figura 4.	Prueba de Tukey para segregantes, variable necrosis.....52
Figura 5.	Prueba de Tukey para medios de cultivo, variable necrosis.....52
Figura 6.	Porcentaje de explantes contaminados.....54
Figura 7.	Porcentaje de explantes vivos.....55
Figura 8.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes vivos A los treinta días.....56
Figura 9.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes vivos A los cuarenta y cinco díaS.....57
Figura 10.	Prueba de Tukey para segregantes, variable explantes vivos A los treinta días.....57
Figura 11.	Prueba de Tukey para segregantes, variable explantes vivos A los cuarenta y cinco días.....57
Figura 12.	Prueba DMS para medios de cultivo, variable explantes vivos A los treinta días.....58
Figura 13.	Prueba DMS para medios de cultivo, variable explantes vivos A los cuarenta y cinco días.....58
Figura 14.	Porcentaje de explantes con brotes.....60
Figura 15.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes con Brotos a los treinta días.....60

Figura 16.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes con Brotes a los cuarenta y cinco días.....	61
Figura 17.	Prueba de Tukey para segregantes, variable explantes con Brotes a los treinta días.....	61
Figura 18.	Prueba de Tukey para segregantes, variable explantes con Brotes a los cuarenta y cinco días.....	62
Figura 19.	Prueba DMS para medios de cultivo, variable explantes con Brotes a los treinta días.....	62
Figura 20.	Prueba DMS para medios de cultivo, variable explantes con Brotes a los cuarenta y cinco días.....	63
Figura 21.	Tasa de multiplicación.....	63
Figura 22.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable tasa de Multiplicación a los cuarenta y cinco.....	64
Figura 23.	Prueba de Tukey para interacción SxM, variable Tasa de multiplicación a los cuarenta y cinco días.....	65
Figura 24.	Promedio de longitud de explantes.....	66
Figura 25.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable longitud de Explantes a los treinta días.....	67
Figura 26.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable longitud de Explantes a los cuarenta y cinco días.....	67
Figura 27.	Prueba de Tukey para interacción SxM, variable Longitud de explantes a los treinta días.....	68

Figura 28.	Prueba de Tukey para interacción SxM, variable Longitud de explantes a los cuarenta y cinco días.....	68
Figura 29.	Promedio de días, variable inicio de síntomas.....	70
Figura 30.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable inicio de Síntomas.....	71
Figura 31.	Promedio de días, variable inicio de signos.....	72
Figura 32.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable inicio de signos.....	72
Figura 33.	Porcentaje de incidencia.....	73
Figura 34.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable incidencia.....	74
Figura 35.	Porcentaje de interacción a los ocho días.....	75
Figura 36.	Porcentaje de interacción a los doce días.....	75
Figura 37.	Porcentajes de explantes con emisión de raíz.....	78
Figura 38.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes Con emisión de raíz a los treinta días.....	79
Figura 39.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable explantes Con emisión de raíz a los cuarenta y cinco días.....	79
Figura 40.	Prueba DMS para medios de enraizamiento, variable Explantes con emisión de raíz a los treinta días.....	80
Figura 41.	Prueba DMS para medios de enraizamiento, variable Explantes con emisión de raíz a los cuarenta y cinco días.....	80
Figura 42.	Promedio del número de raíces.....	81
Figura 43.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable número de Raíces a los treinta días.....	82

Figura 44.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable número de Raíces a los cuarenta y cinco días.....	82
Figura 45.	Prueba DMS para medios de enraizamiento, variable Número de raíces a los treinta días.....	83
Figura 46.	Prueba DMS para medios de enraizamiento, variable Número de raíces a los cuarenta y cinco días.....	83
Figura 47.	Promedio de longitud de raíz.....	84
Figura 48.	Prueba de Tukey para tratamientos, variable longitud De raíz a los cuarenta y cinco días.....	85
Figura 49.	Prueba DMS para segregantes, variable longitud De raíz a los cuarenta y cinco días.....	85
Figura 50.	Prueba DMS para medios de enraizamiento, variable Longitud de raíz a los cuarenta y cinco días.....	85

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°-	PÁGINA
Anexo 1.	Desinfección del material. Protocolo Simple Desinfección.....111
Anexo 2.	Medios de Cultivo selectivo (ME).....111
Anexo 3.	Escala para evaluar daño causado por <i>Colletotrichum spp</i> .....112
Anexo 4.	Fórmula para calcular la suspensión de conidias/ml.....113
Anexo 5.	Medios de Enraizamiento.....114
Anexo 6.	Reporte fotográfico.....114

## RESUMEN

La presente investigación complementa investigaciones anteriores, donde se persigue introducir una variedad de Tomate de árbol resistente/tolerante al ataque de la antracnosis enfermedad catalogada de mayor incidencia e importancia económica en el país. El estudio tuvo lugar en la estación experimental Santa Catalina en el Departamento Nacional de Biotecnología ubicado en las coordenadas 00° 22'00" S y 79° 32'00" W, bajo el direccionamiento del Programa Nacional de Fruticultura del INIAP en condiciones controladas de laboratorio. El objetivo de esta investigación fue evaluar y seleccionar *in vitro* materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) resistentes/tolerantes a antracnosis (*Colletotrichum spp.*). Se establecieron tres fases para cumplir con los objetivos específicos, la primera se refiere a la introducción y multiplicación *in vitro* en la que se evaluaron dos medios de cultivo para determinar condiciones de adaptación al cultivo de tejidos, la segunda corresponde a la inoculación del hongo *Colletotrichum acutatum* donde se seleccionaron los materiales con mejores características de resistencia/tolerancia y finalmente la fase de enraizamiento donde se evaluó dos medios para establecer la respuesta al enraizamiento *in vitro*. En la fase de introducción y multiplicación destaca el segregante N<sup>o</sup>-11 cultivado en medio uno. En la interacción de *Colletotrichum acutatum*/planta se seleccionó al segregante N<sup>o</sup>-09 como el segregante con mayores características de resistencia seguido del N<sup>o</sup>-18. Finalmente el segregante No-18 responde favorablemente al proceso de enraizamiento en un medio M&S con vitaminas y sin la presencia de reguladores de crecimiento.

**Palabras Clave:** Tomate de árbol, medio de cultivo, cultivo de tejidos, segregante, resistencia/tolerancia.



## SUMMARY

This research complements previous research, which persecute introduce a variety of tamarillo resistant/tolerant to anthracnose disease attack cataloged highest incidence and economic importance in the country tree. The study took place in the Santa Catalina experiment station at the National Department of Biotechnology at coordinates 00 ° 22'00 " S and 79 ° 32'00 " W, under the National Programme Addressing Fruticultura INIAP under controlled laboratory. The objective of this research was to evaluate and select materials *in vitro* promising tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) Resistant/tolerant to anthracnose (*Colletotrichum spp.*). Three phases to meet the specific objectives were established, the first refers to the introduction and *in vitro* multiplication in two culture media were evaluated for conditions of tissue culture adaptation, the second corresponds to the inoculation of the fungus *Colletotrichum acutatum* where materials with better characteristics of resistance/tolerance and finally the rooting phase where two means was evaluated to establish the *in vitro* rooting response were selected. In the introduction phase and multiplication No-11. In the interaction of *Colletotrichum acutatum*/plant to segregating No-09 was selected as the segregating with higher strength characteristics followed by No-18. Finally segregating No-18 unresponsive to rooting process in M&S medium with vitamins and without the presence of growth regulators

**Keywords:** Tamarillo, culture medium, tissue culture, segregating, resistance/tolerance.

**EVALUACIÓN Y SELECCIÓN *in vitro* DE MATERIALES PROMISORIOS  
DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.),  
RESISTENTES/TOLERANTES A LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum* spp.)**

## **I. INTRODUCCIÓN**

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.), es un frutal andino promisorio y de grandes oportunidades para los productores, gracias a que en los últimos años el consumo de tomate de árbol ha tenido un incremento sustancial. En el 2009, la demanda fue de 1,98 kg/persona/año, comparado con el 2006 que apenas fue de 0,90 kg/persona/año, para consumo en fresco y uso agroindustrial (Lucas *et al.*, 2010), consecuentemente se aprecia un incremento sostenido de la superficie cosechada, de 4062 ha en el 2002 a 7172 en el 2010, siendo las principales zonas de producción: Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Azuay (MAGAP-INEC-ESPAC, 2010).

El principal problema que enfrenta el cultivo de tomate de árbol en nuestro país, es la susceptibilidad a enfermedades fungosas que deriva en una tendencia a la baja en los rendimientos, ubicándose en 13,8 t/ha en el 2002 y 5,5 t/ha en el 2010. La antracnosis (*Colletotrichum* spp.) es una de las enfermedades más importantes, este hongo está ampliamente distribuido en las zonas productoras y es considerado por muchos productores como el causante de la enfermedad más destructiva del cultivo, ocasionando pérdidas entre el 50% y 100% (INIAP, 2004), limitando de esta manera el cultivo en importantes áreas de producción, y obligando a los productores al establecimiento de huertos en superficies “libres” del patógeno, que en poco tiempo también son infectadas (Proaño, 2008). Para poder enfrentar el aumento de la

incidencia del hongo, es necesario aumentar la tolerancia en las plantas y la mejor forma de hacerlo es mediante el desarrollo y utilización de material resistente (Duvick, 1999).

Estudios de variabilidad genética realizados en las variedades de tomate de árbol cultivados en el Ecuador han determinado una reducida diversidad genética en cuanto a resistencia o tolerancia al patógeno (Peñañiel 2007). Este hallazgo plantea una limitación para programas de mejoramiento tradicional mediante cruces entre las diferentes variedades. La limitada variabilidad genética observada en el tomate de árbol sugiere la necesidad de buscar fuentes alternativas de diversidad y resistencia. Por esta razón, es importante el desarrollo de otras técnicas que permitan el mejoramiento del tomate de árbol rebasando la limitación de la diversidad genética entre las variedades.

Actualmente las investigaciones se están orientando hacia la búsqueda de resistencia horizontal con el objetivo de incorporarla en materiales avanzados junto con caracteres agronómicos deseables, ampliando así la variabilidad genética. En el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP, se está realizando investigaciones enfocadas principalmente a establecer fuentes de resistencia a antracnosis. Para esto se ha procedido a identificar fuentes de resistencia, basados en estudios de mejoramiento genético realizados por CORPOICA con germoplasma de tomate de árbol y especies relacionadas, en los que encontraron genes de resistencia en la especie silvestre *Cyphomandra uniloba* y *Cyphomandra materna* (Lobo *et al.*, 2000).

Estos materiales se utilizaron en un plan de cruzamientos con variedades comerciales de tomate de árbol mediante la selección masal e hibridación con el fin de combinar las mencionadas fuentes de resistencia para obtener líneas específicas y con características deseadas (Proaño, 2008).

En el Ecuador, en el 2008-2010 en la Granja Tumbaco del INIAP, se evaluaron y seleccionaron plantas de segregantes de cruzamientos interespecíficos entre *Solanum betaceum* por *Chyphomandra uniloba* y *Chyphomandra materna* por *Solanum betaceum*. Resultado de estas evaluaciones se dispone de 20 materiales promisorios, que tienen el potencial para desarrollar una variedad, que presentan resistencia/tolerancia a antracnosis y buena calidad de fruta (INIAP, 2009). No obstante para este frutal los procedimientos de mejoramiento y propagación convencional no son sencillos de ejecutar debido a su naturaleza alógama, existiendo una polinización cruzada del 40 al 60% (Bosh, 1994), que conduce a una disminución en la base genética traduciéndose en la pérdida de características deseadas y genotipo selecto (Tapia, 2004). Consecuentemente la biotecnología representa una alternativa por el potencial de conservar las características genéticas y calidad sanitaria de las plantas por medio de la técnica de cultivo de tejidos que permite obtener plantas idénticas a su progenitor, garantizando calidad genética, sanitaria y fisiológica (Olmos *et al.*, 2008; Lozada, 2010). La regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis y embriogénesis somática o zigótica es un prerequisite indispensable para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas (McKersie y Brown, 1996).

Durante los últimos años, se ha considerado la importancia de integrar a los esquemas clásicos de investigación, técnicas modernas y métodos de la biotecnología, con la finalidad de acelerar el mejoramiento genético y contar con variedades sobresalientes (Ligarreto, 2001). Las tendencias actuales tratan de diferenciar entre métodos de mejoramiento tradicionales y métodos modernos que utilizan técnicas relacionadas con la biotecnología. En los primeros el manejo de individuos y los cruzamientos siguen el sistema natural; en los segundos, se emplean técnicas especiales para modificar individuos y permitir así combinaciones genéticas que no se dan en forma natural. La selección *in vitro* como alternativa en la obtención de variedades resistentes a enfermedades se ha incrementado por el avance en los estudios tanto de los procesos de la planta y la biología de los patógenos, como del entendimiento de las interacciones planta-patógeno (Pérez, 1998).

Los métodos convencionales de mejoramiento de la selección en campo que buscan resistencia a enfermedades son altamente demandantes de tiempo, costo y dependen de las fluctuaciones naturales en la abundancia del inóculo, además el principal inconveniente es la dispersión del patógeno, la infección, el desarrollo y expresión de la enfermedad lo que puede influir en la manifestación de una falsa resistencia (Patiño, 2010). Por otro lado, la selección *in vitro* puede ofrecer una alternativa, debido a que es una técnica donde se puede mantener unidades experimentales bajo ambientes definidos y rigurosamente controlados que permiten identificar de manera eficiente la resistencia a la enfermedad, por la cualidad de ser expuestos fácil, uniforme y directamente sin interacción con otros factores los

agentes infectivos a parte que requiere menos esfuerzo y una menor implementación logística (Patiño *et al.*, 2007).

Para el desarrollo de la investigación se plantearon los siguientes objetivos

### **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar y seleccionar *in vitro* materiales promisorios de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) resistentes/tolerantes a antracnosis (*Colletotrichum spp*)

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la respuesta de materiales promisorios de tomate de árbol a dos medios de cultivo para obtener la mayor tasa de multiplicación en laboratorio
- Seleccionar *in vitro* los materiales promisorios de tomate de árbol con mayor grado de resistencia/tolerancia al ataque de *Colletotrichum spp*.
- Evaluar la respuesta de materiales promisorios de tomate de árbol a dos medios de enraizamiento para la obtención de plántulas completas en laboratorio.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. GENERALIDADES DEL TOMATE DE ÁRBOL

#### 2.1.1. Origen y Distribución

El tomate de árbol es una planta perteneciente a la familia de las Solanáceas. El nombre científico del tomate de árbol se fijó definitivamente como *Solanum betaceum* Cav; en el año de 1995, en sustitución del anterior *Cyphomandra betacea* Sendt, es originaria de los bosques templados andinos, que todavía se encuentra en estado silvestre en Colombia, Ecuador y Perú, es una planta de 2 a 3 metros, de altura; tiene cualidades físicas, nutritivas y organolépticas, con un alto contenido de proteína, vitamina A y C (Feicán *et al*, 1999).

Al ser un cultivar autóctono ecuatoriano, el tomate de árbol posee algunas variedades propias, seleccionadas y domesticadas a lo largo de los años por los pobladores y luego por colonizadores y agricultores, por lo que según Soria (2006) se desarrolla entre 600 y 3300 msnm, desde zonas secas con 400 mm/año o menos con riego complementario, hasta en la selva oriental con más de 1000 mm/año, demostrando la gran capacidad adaptativa de este frutal.

Actualmente el tomate de árbol (*S. betaceum*. Cav), no se conoce en forma silvestre y la información acerca de él proviene de ejemplares cultivados; es decir, que esta especie es la única que se cultiva comercialmente en este género, hay que mencionar que el tomate de árbol pertenece a las sección *Chyphomandra* del género *Solanum* que tiene cerca de 35 especies, la misma que está dividida en cinco grupos

de acuerdo a sus características de evolución como homología, polimorfismo, variación y convergencia (Bosh, 1994).

*Cyphomandra uniloba* y *Chyphomandra materma* corresponden a materiales silvestres que se hallan estrechamente relacionados con *Solanum betaceum* y por ser resistentes/tolerantes a la antracnosis, son actualmente utilizadas en programas de mejoramiento genético, que buscan derivar las características genéticas de resistencia a la antracnosis y otros genes favorables presentes en las taxa silvestres relacionadas, ya que entre las tres especies hay relaciones de compatibilidad que permiten obtener semilla viable a partir de las hibridaciones. El proceso de domesticación y selección de tomate de árbol en diferentes nichos y bajo diversos criterios socio-culturales, permitieron la selección de varios tipos comerciales o ecotipos de tomate de árbol que comúnmente se conocen como variedades locales, las cuales pueden ser cultivadas y explotadas comercialmente (García *et al*, 2002).

La resistencia o tolerancia al patógeno dentro de la especie cultivada y taxa relacionadas ha sido poco explorada, existiendo informes escasos que señalan completa susceptibilidad al patógeno por parte de los pocos materiales evaluados en este sentido (Tamayo, 1985), siendo importante señalar que la resistencia es un mecanismo básico de los sistemas de manejo integrado de plagas y enfermedades, precisándose disponer de suficiente variabilidad para ubicar y utilizar el mismo.

Para que el atributo de resistencia tenga impacto en la producción del tomate de árbol, es necesario realizar una serie de investigaciones complementarias, las cuales



incluyen: evaluación de la resistencia a diferentes razas del patógeno, persistencia de la misma, caracterización genética del atributo, estudios de expresión de la característica en la especie cultivada, evaluación de características con alto grado de ligamiento al gene o genes de resistencia, en el material domesticado y posibilidades de desarrollo de los híbridos interespecíficos, ya que los mismos, si exhiben resistencia, deben presentar alta heterocigosis, la cual de ser favorable y producir frutos comerciales, podría clonarse a través de procedimientos de multiplicación masiva vía cultivo de tejidos (Hoyos, hoyosnador,1998).

### **2.1.2. Polinización y Propagación**

Su polinización puede ser autogámica así como alogámica, ya que sus flores son abiertas y muy visitadas por abejas melíferas que buscan néctar y polen, razón por la cual se ha visto semillas híbridas de cruzamientos intervarietales en cultivos realizados en campos abiertos (Albornoz, 1989).

La propagación sexual consiste en utilizar semillas de frutos seleccionados, sin embargo debido a su capacidad alogámica, se ha obtenido plántulas genéticamente diferentes unas de otras, por lo que se puede concluir que mediante este medio, en el país no se mantiene un grado aceptable de pureza varietal (Albornoz, 1989), por lo tanto el método asexual, mediante estacas, chupones, acodos, injertos o procedimientos de laboratorio como el cultivo de tejidos *in vitro* se ha convertido en un herramienta muy útil para propagar esta especie por la cualidad de obtener plantas idénticas a su progenitor (Amaya, 2006).

### **2.1.3. Obtención de Variedades Resistentes**

El desarrollo de una agricultura sostenible en el mundo actual pasa, a través de la lucha biológica y la siembra de nuevas variedades con niveles de resistencia utilizando las técnicas biotecnológicas. La resistencia es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y/o desarrollo del parásito después de que se ha iniciado o establecido el contacto con la planta (Proaño, 2005). Si se expone una gran población del hospedante al ataque de un patógeno, se distinguirán los individuos resistentes que pueden ser empleados como fuentes de resistencia en un programa de mejoramiento. En casos en que no existen individuos resistentes dentro de una especie, se debe buscar resistencia en las especies cercanas (emparentadas) inclusive en plantas silvestres parientes de la especie cultivada, presentándose dos métodos para la obtención de poblaciones resistentes, la selección e hibridación (Proaño, 2005).

#### **2.1.4.1 Selección Masal**

La selección se debe iniciar cuando existe población heterogénea, es decir en la cual se observa variabilidad. La selección masal se basa en la selección de fenotipos, por eso su efectividad en gran medida depende de la herencia de las características deseadas. Cuando la heredabilidad es alta, existe mayor oportunidad de éxito, y en las siguientes generaciones la descendencia corresponderá a la seleccionada inicialmente. Si la heredabilidad es baja, es posible que la descendencia sea sustancialmente distinta de la seleccionada. La selección masal merece consideración

como un método rápido y económico de selección en nuevas áreas y complementario de otros métodos más complejos y costosos (Narváez, 2009).

#### **2.1.4.2 Hibridación**

El termino hibridación incluye a todas las actividades que realizan los fitomejoradores, las cuales originan poblaciones segregantes de plantas a partir de las cuales se pueden seleccionar individuos superiores para el mejoramiento de los cultivos (Proaño, 2005).

El fitomejoramiento recurre a la hibridación cuando ciertos caracteres deseables como la resistencia al frío, enfermedades o plagas no se encuentran presentes en las especies que se están mejorando, pero que están presentes en altos niveles en algunas especies emparentadas estrechamente (Proaño, 2005).

#### **2.1.4.3 Retrocruzamientos**

El retrocruzamiento es la operación de volver a cruzar un híbrido F1 con uno de sus parentales (Proaño, 2005). El retrocruzamiento es relacionado como un método por el cual evolucionan las especies de cultivo y da resultados que son predecibles y repetibles. En este método se transfieren ciertas características de la especie AA a la especie Aa sin cambiar la integridad de la especie Aa. Se presenta en la naturaleza cuando los productos procedan de un cruce de las dos especies, donde, se cruza varias veces, durante diversas generaciones a la especie Aa. Los repetidos cruces con las especies Aa significa que la población toma las características Aa. Sin embargo, por azar o por selección natural, algunas características de aa sobreviven el proceso y

se añaden a la especie Aa. Cuando este proceso es controlado con precisión, se llama el método de cría retrocruzamiento. La especie Aa se llama el padre recurrente y a la especie aa es el padre donante (INIAP 2004; Proaño, 2005).

La resistencia de parientes silvestres se introduce mediante retrocruzamientos repetidos hacia el cultivar élite. Para cada generación de retrocruzamientos se puede utilizar otro cultivar como padre recurrente. Tales procedimientos de retrocruzamientos ayudan a eliminar varios caracteres indeseables de las especies donantes, especialmente si estos están fuertemente ligados al gen de resistencia (Proaño, 2005).

#### **2.1.4. Importancia Económica**

Dentro de las especies frutícolas ubicadas en los climas frío y templado, sobresale el tomate de árbol, en los últimos años el cultivo de esta especie ha crecido. Hay mucho interés por el tomate de árbol en mercados europeos y Estados Unidos de América, pero las limitaciones en determinadas instancias son los volúmenes requeridos, la residualidad por pesticidas, la incidencia de plagas y enfermedades y los controles legales sanitarios para exportación; pero la ventaja comparativa respecto a otros países radica en que las condiciones para el desarrollo del cultivo son naturales por su origen (MAGAP, 2001).

Para poder exportar el tomate se requiere cambiar el esquema del manejo del cultivo mediante la incorporación de tecnología ecológica, lo cual implica nuevos sistemas de control de plagas y enfermedades, nutrición adecuada y en general un

manejo con enfoque ecológico o integrado que permita compatibilizar la demanda con la oferta que puede hacer nuestro país (Soria, 2009).

### **2.1.5. Uso y Consumo**

La utilidad primordial del tomate de árbol es el consumo directo como fruta fresca. Es una fruta muy versátil respecto a su consumo, se prepara como jugo o bebida refrescante, es un excelente complemento para ensaladas de frutas, y otros usos en repostería o en conservas (Amaya, 2006). En el sector industrial es utilizado en la fabricación de mermeladas, compotas, helados, jaleas, enlatados, jugos y una variedad de dulces. En usos medicinales es un antioxidante, fortalece el cerebro y la memoria, beneficia el sistema circulatorio, fortalece el sistema inmunológico y la visión, y ayuda en programas de reducción de peso (MAGAP, 2001).

## **2.2. CULTIVO DE TEJIDOS**

### **2.2.1 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* se basa principalmente en diseñar un medio de cultivo ideal para la sobrevivencia y desarrollo de la especie a tratar, el cual contiene sales esenciales para el crecimiento de un explante, en condiciones estériles, libres de contaminación, pues al no ser un medio selectivo para plantas se puede generar crecimiento bactericida o fúngico necrosando el explante. Esta técnica se la realiza a tamaño micro, en donde se evalúan diferentes condiciones ideales para el crecimiento de una determinada especie, ya estandarizada la metodología ofrece ventajas productivas como menores tiempos de multiplicación; mayor control de

sanidad, facilita el transporte de material y permite multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Roca y Mroginski, 1993).

Actualmente esta técnica tiene numerosas aplicaciones, siendo la principal la propagación masiva de plantas. Al partir de tejido somático se genera clonación de individuos, es decir con genotipos y fenotipos similares con características agronómicas deseables durante todo el año, en donde se incluye que estén libres de contaminación bacterial, viral o fúngica. Es así que la obtención de plantas élites para diversos estudios fisiológicos se da en base, producción de plántulas haploides o propagación clonal por meristemos y yemas axilares (Pierik, 1990).

En cuanto a mejora genética vegetal que ofrece esta técnica, el cultivo de tejidos vegetales muestra su propia relevancia en la aplicación de técnicas como conservación de germoplasma, la obtención y el cultivo de híbridos somáticos, la selección *in vitro*, entre otras aplicaciones que son denominadas “nuevas biotecnologías” (Evans, 2003).

### **2.2.2 Micropropagación**

La micropropagación de una especie *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica, pues permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados en medios nutritivos con concentraciones específicas, y condiciones ambientales ideales de temperatura, humedad y luz. Una vez estandarizados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso para

llevarlo a una mayor escala de producción. Esta micropropagación se la puede realizar a través de dos principales métodos, el primero incluye la utilización de las células sexuales, conocido como embriogénesis cigótica; y el segundo involucra el uso de la totipotencialidad de las células, a través del cultivo de meristemas o propagación clonal (asexual) (Pierik, 1990).

### **2.2.2.1 Cultivo de Meristemas**

La propagación clonal por cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura puesto que se puede propagar masivamente plantas en vías de extinción, o plantas difíciles de propagar por otros métodos, o para clonar individuos que tienen características agronómicas deseables (mejores frutos, resistentes, etc.), para obtener plantas libres de virus, para conservar la diversidad genética de una población, entre otras aplicaciones (Frid, 2009).

La reproducción de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que las células vegetales son totipotenciales. Esto significa que las células vegetales poseen la capacidad de desarrollar un nuevo individuo completo, sin que sea necesaria la unión de células sexuales. El uso de yemas, ápices y meristemas para micropropagación de especies ha tomado gran acogida debido a la gran regeneración de especies que otorga; es por esto que son materiales ideales para desarrollar plántulas a menor tiempo y libres de contaminación, manteniendo el genotipo y fenotipo de la especie élite. Plántulas que se obtienen *in vitro* generan ramas axilares, las cuales pueden ser subcultivadas en medio ideal para micropropagar la especie de

manera más eficiente; teóricamente, los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares o enraizar (Roca y Mroginski, 1993).

#### **2.2.2.2 Totipotencialidad Celular**

La capacidad necesaria de varias células para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin la participación de una fusión de células sexuales o gametas se denomina totipotencialidad, se encuentra en células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. La totipotencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta y la edad que tenga la planta (Lozada, 2010).

#### **2.2.3 Etapas de la Micropropagación Clonal *in vitro***

La propagación de plantas *in vitro* o micropropagación, es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica e incluye varias etapas bien definidas (Frid, 2009).

##### **2.2.3.1. Etapa 0. Selección de plantas donadoras**

La mayoría de proyectos basados en cultivo *in vitro* utilizan como explante yemas apicales y axilares por poseer tejido meristemático, el cual mientras más joven y menos diferenciado sea, mejor será la respuesta *in vitro*; por ejemplo ápice, hoja o



segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, entre otros es decir se trabaja con material de plantas jóvenes en donde sus células no tengan reducido su potencial de crecimiento por senescencia. Otro motivo de la utilización de estos explantes es que no se genera variación somaclonal por ser un tejido somático, originando una certeza de que se está reproduciendo una planta con idéntica carga génica que la madre (Roca y Mroginski, 1993).

#### **2.2.3.2. Etapa 1. Desinfección del material vegetal**

Los explantes extraídos de las plantas madre pueden ser yemas, porciones de hojas, raíces o semillas. La desinfección de los fragmentos de planta madre trata de eliminar los contaminantes externos, siendo los más comunes hongos y bacterias que habitan en forma natural en el ambiente; cabe decir que existen especies que traen contaminación endógena que no se expresa inmediatamente después de la siembra (Roca y Mroginski, 1993). Se utiliza para la desinfección principalmente agua estéril, jabón, hipoclorito de sodio, fungicidas y etanol. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia con el uso de las cámaras de flujo laminar (Pierik, 1990).

#### **2.2.3.3. Etapa 2. Establecimiento del material *in vitro***

Estandarizado el método de desinfección las yemas que se va a utilizar como explante se colocan en medio de cultivo estéril. La formulación del medio cambia según lo se quiera obtener, ya sea un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. En esta

etapa se trabaja con un medio basal, el cual va a acostumbrar a los explantes a un sistema *in vitro*, en donde se trabaja con condiciones ambientales y nutritivas controladas, originando que las plántulas que se desarrollen no sean totalmente autótrofas (Lozada, 2010).

En esta etapa se obtienen muchas formulaciones de medios de cultivo según el tipo de planta y el explante con el cual se trabaje. Por ejemplo el medio MS, o de Murashige y Skoog, es el más empleado por su equilibrio nutricional; razón por la cual el medio de cultivo empleado es uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogénica deseada. (Pierik, 1990). En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

#### **2.2.3.4. Etapa 3. Multiplicación de brotes**

Ya estandarizado el medio de cultivo ideal para la especie, y acostumbrada al sistema *in vitro* se procede a la multiplicación de la misma, es decir en el medio de cultivo se introduce la utilización de reguladores de crecimiento o fitohormonas, con las cuales se va a obtener las morfologías deseadas para la investigación. La etapa de establecimiento genera principalmente brotes de procedencia axilar o adventicia con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema, material con el cual se desarrollara subcultivos con distintas concentraciones de biorreguladores para obtener una metodología estandarizada para una futura producción masiva de la especie (Roca y Mroginski, 1993). En esta etapa ya se tienen dominados los problemas de oxidación y contaminación que genera la especie en la etapa de

establecimiento, por lo cual se trabaja solo con plántulas sobrevivientes y sanas (Lozada 2010)

Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar, que nos permite mantener condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2004).

#### **2.2.3.5. Etapa 4. Enraizamiento de explantes**

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente explantes individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2004).

#### **2.2.3.6. Etapa 5. Aclimatación de plántulas**

Las plántulas recién enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En

esta etapa las plántulas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales (Lozada, 2010).

En el momento en que se extraen las plántulas enraizadas están poco adaptadas a crecer en un invernáculo, puesto que han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar su desecación. Las plántulas enraizadas, deben ser aclimatadas a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Devlin, 1976).

Estas plántulas se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plántulas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia (Lozada, 2010).

### 2.3. SELECCIÓN *in vitro*

Las mayores posibilidades de las técnicas biotecnológicas están dadas en la mejora de la resistencia a patógenos que se pueden cultivar *in vitro* y produzcan toxinas, y que el sistema de generación a nivel celular este desarrollado (Pérez, 1998). El método más apropiado para determinar la expresión diferencial en cuanto a la resistencia de las células a un patógeno es comparar la respuesta *in vitro* de variedades resistentes y susceptibles a dicho patógeno (García, 2000). Probablemente el método más común, para el desarrollo de sistemas de selección para buscar resistencia a enfermedades fúngicas con el empleo de técnicas de cultivo de tejidos ha sido, la utilización de la toxina del hongo patógeno como agente selectivo. Es ampliamente conocido que los hongos patógenos producen toxinas durante los procesos de infección. Un gran número de metabolitos tóxicos han sido estudiados, así como su rol en la patogénesis en las plantas. Sin embargo, no todas las toxinas producidas por los hongos patógenos están bien caracterizadas y para algunos solo el filtrado del cultivo ha sido aplicado en los procesos de selección (Svanová y Lebeda, 2005).

De forma general, en la selección *in vitro* se han empleado como agente selectivo el hongo patógeno, filtrados del cultivo de estos, extractos crudos, toxinas y componentes de la pared celular de los hongos (elicitores de la respuesta de resistencia). El empleo del hongo patógeno en sí mismo es el acercamiento más directo entre el agente causal de la enfermedad y el tejido de la planta *in vitro* (Kosky, 1998).

Para ser realmente útil dentro de cualquier esquema de mejoramiento genético, los métodos *in vitro* deben satisfacer dos criterios: se deben producir plantas que merezcan entrar en un programa de mejoramiento o de evaluación y competir ventajosamente con plantas producidas por métodos convencionales; la planta mejorada debe ser económica y eficiente, de tal manera que los métodos empleados encajen y no entorpezcan la rutina usual de los métodos de selección y evaluación requiriendo a la vez, de un mínimo de equipos y recursos humanos (Pérez, 1998).

La selección *in vitro* debe cumplir algunos principios tales como: la acción del metabolito (filtrado del cultivo, toxina) debe ser irreversible, es decir no debe actuar como un inhibidor del crecimiento. El agente selectivo no debe ser degradado en el medio de cultivo por otros factores, si es degradado las células susceptibles deben morir antes de su degradación. Otro principio es que el único estrés en las células debe ser causado por el agente selectivo. La respuesta debe manifestarse a nivel celular y debe existir una correlación positiva con la respuesta de la planta desarrollada (Kosky, 1998).

Los grandes avances de la selección *in vitro* respecto a los sistemas tradicionales es que permiten con facilidad tratar gran número de individuos con un determinado agente selectivo, lo cual brinda la posibilidad de ahorro de tiempo y trabajo desde los inicios. Además todos estos procesos selectivos se desarrollan bajo condiciones ambientales controladas, todo esto hace que se obtengan resultados más rápidos y eficientes que con las técnicas convencionales de mejoramiento, por otro lado también representa una ventaja importante ya que es un método que permite la

reducción de las poblaciones, eliminando la mayor parte de las formas susceptibles (Pérez, 1998).

A pesar de la aparente popularidad y utilidad de este método para la obtención de líneas resistentes a enfermedades muy pocas variedades han sido liberadas, parte de este problema es simple, ya que la mayoría de los estudios realizados no han pasado de nivel de laboratorio y casas de cultivo (Kosky, 1998).

## **2.4. ANTRACNOSIS (*Colletotrichum spp*).**

### **2.4.1. Taxonomía**

Agrios (1995), clasifica al género *Colletotrichum* como un hongo imperfecto, que carece de reproducción sexual, pertenece a la clase Coelomycetes, orden Melanconiales y lo describe como un organismo que posee esporas asexuales que se forman en acérvulos, presenta un micelio enramado inmerso, septado de color blanco. Acérvulos cerosos, de color salmón, a menudo las esporas son tan numerosas que pueden formar masas brillantes de color rosado (Botero, 1999).

El género *Colletotrichum* presenta un número diverso de especies que incluyen los patógenos y saprófitos. Las especies de este género son consideradas como las más exitosas dentro de los hongos patógenos de plantas debido a que las estrategias físicas y químicas de defensa de las plantas se presentan cuando la infección ha avanzado significativamente y el hongo ha invadido las células casi en su totalidad, lo que demuestra la efectividad del ataque fitoquímico del hongo que prácticamente pasa desapercibido por las plantas y se presentan tanto en zonas templadas como

tropicales (Femenía, 2007). Su capacidad para causar infecciones latentes o quiescentes lo ubican dentro de los patógenos más importantes (Jeffries *et al*, 1990).

#### **2.4.2. Características del Género *Colletotrichum spp.***

Uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en el tomate de árbol es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum spp.* Este patógeno puede afectar gran parte de los tejidos, órganos de la planta en desarrollo y frutos en cualquier estado de desarrollo. El hongo permanece latente en las hojas más viejas, y de ahí infecta las ramas y los frutos (CORPOICA, 2001). En las hojas se presentan lesiones localizadas especialmente en los márgenes de las más viejas y a lo largo de las nervaduras, y se presentan como manchas necróticas de color negro, siendo más notorio en el envés (Alarcón, 2008). A medida que la enfermedad avanza se desarrollan anillos concéntricos en los cuales los acérvulos se hacen visibles principalmente en el haz de la hoja como pequeños puntos negros (Rodríguez, 2007).

El hongo también afecta los brotes y ramas débiles, en los que las lesiones se presentan inicialmente como manchas amarillas y al poco tiempo se extienden a lo largo de la rama, causando finalmente necrosis apical (Alarcón, 2008). La enfermedad puede causar la muerte descendente de las plantas, haciendo que las hojas cambien de color amarillo a negro y eventualmente se secan y caen (Rodríguez, 2007). En los frutos los síntomas se manifiesta con mayor frecuencia en el ápice o en los puntos en que varios frutos de un mismo racimo quedan en contacto, debido a que allí hay acumulación de agua por tiempo más prolongado, lo cual favorece el desarrollo inicial del hongo. El daño consiste en manchas ligeramente



hundidas de color negro, que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Bajo condiciones favorables al hongo, aparece un polvillo rosado en la superficie de la lesión, formado por esporas del patógeno. Cuando el ataque ocurre sobre frutos pequeños, estos se momifican y quedan adheridos al árbol. Si se presenta en frutos ya formados pero todavía verdes, aparece una coloración amarillenta de maduración prematura, con exhibición posterior de las manchas negras en el exterior. En caso de afectar frutos próximos a recolección, las manchas son pequeñas o aun inexistentes, pero el daño se manifiesta durante el transporte o el almacenamiento (Botero, 1999)

Aránzazu y Rondón, (1999), han indicado que la enfermedad produce una disminución en el período productivo de los árboles de cinco a dos o tres años, incrementándose en más del 50% los costos de producción, por efecto de la aplicación de medidas de control, las cuales causan contaminación ambiental. Saldarriaga *et al.*, (1997), afirmaron que cuando no se aplican medidas de control las pérdidas son totales y que en cultivos comerciales, bajo condiciones de uso continuo de fungicidas, se estiman pérdidas que oscilan entre el 10 y 25% de los frutos cosechados. La antracnosis de los frutos es considerada como la enfermedad más destructiva, debido a su amplia distribución y a la magnitud de las pérdidas que ocasiona la misma.

La literatura hace énfasis en el control de la enfermedad a través de aplicación de agroquímicos y remoción de frutos enfermos que se complementa con recomendaciones de control cultural (Lobo et al., 2000). Rondón (1999), presentó una serie de recomendaciones para el control de la enfermedad incluyendo: manejo

de la arquitectura del árbol buscando regular su altura, podas de follaje, medidas de rehabilitación de plantas afectadas mediante podas severas, remoción de frutos enfermos y control químico del patógeno. Recomendaciones similares fueron formuladas por Tamayo (1985) y Aranzazu (1999) concluyendo los autores que era necesario evaluar nuevos productos para control tomando como referencia el umbral de daño, validar la acción sinérgica de otros organismos y tener en cuenta el estado fisiológico de los árboles para la aplicación de medidas de control.

### **2.4.3. Desarrollo de la Enfermedad**

#### **2.4.3.1. Germinación y Formación del Apresorio**

En la mayoría de los casos el inóculo llega a los hospederos por medio del agua o dispersión de conidios, el inóculo se adhiere a la cutícula de la planta, y germina en un lapso de 12-24 horas, produciendo el tubo germinal para formar el apresorio terminal, que penetra la cutícula (Contreras, 2006).

#### **2.4.3.2. Formas de Penetración**

Dentro de las formas de penetración de las especies de *Colletotrichum spp.*, a la superficie de las plantas tenemos, a través de aberturas naturales como los estomas y lenticelas, a través de heridas naturales y penetración directa de la barrera cuticular, la forma más común. Después de la penetración en los frutos, el crecimiento del hongo se restringe en la capa dérmica, hasta que ciertos tejidos producidos en la maduración promuevan la reactivación del patógeno (Contreras, 2006).

### **2.4.3.3. Infección y Colonización de Tejidos Vegetales**

Es uno de los microorganismos con mayor eficacia, debido a que sus hifas pueden presentarse por dentro de las células, dentro de la pared celular y en espacios intercelulares, provocando una gran cantidad de tejido destruido (Botero, 1999).

Este hongo presenta un proceso infectivo de dos fases, una fase asintomática inicial, durante la cual el patógeno se establece en los tejidos del hospedero, seguido por una fase destructiva visible (Contreras, 2006).

### **2.4.3.4. Reproducción Necrotrófica**

Cuando los tejidos son colonizados exitosamente, el patógeno crece y se desarrolla a través del hospedero con un comportamiento necrotrófico clásico (Contreras, 2006). La fase necrotrófica es responsable de los síntomas típicos de la antracnosis (Botero, 1999).

### **2.4.4. Condiciones que Favorecen el Desarrollo de *Colletotrichum spp.***

El proceso infectivo que desarrolla el patógeno causante de la antracnosis es favorecido por altas precipitaciones, alta humedad ambiental y altas temperaturas (Hartung *et al*, 1981). Respecto al efecto de la temperatura en el crecimiento radial de *Colletotrichum spp*, la temperatura óptima para su desarrollo es a 20°C, con un

menor crecimiento a 27°C y un escaso desarrollo a los 5°C, 10°C y 30°C (Hartung *et al.*, 1981).

En el tomate de árbol se pueden desarrollar copas voluminosas con excesivo follaje, esto hace que se den condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la antracnosis, porque en ese sitio la humedad ambiental es alta, hay poca penetración de la radiación solar y baja ventilación, se crea un microclima húmedo, favorable para el desarrollo de la enfermedad. En tomate de árbol se deben realizar podas de formación cuando la planta tenga una altura de 50 cm, con el fin de suministrar una mayor iluminación y aireación al cultivo, evitando así el desarrollo de la antracnosis (Saldarriaga *et al.*, 1997).

Existen factores agronómicos que favorecen el desarrollo del patógeno: 1). Distancias de siembre inapropiada. La distancia a utilizar depende de la variedad a plantar, cuando se utilizan distancias cortas, las copas de los árboles se entrecruzan y se crean condiciones de alta humedad ambiental. 2). Frecuencias cortas de fertilización y dosis inadecuada, principalmente de nitrógeno. 3). En el cultivo de tomate de árbol en algunos huertos no se realizan podas, y los árboles desarrollan una copa cerrada, el crecimiento es rápido y hay fuente de inóculo permanente (Saldarriaga *et al.*, 1997).

#### **2.4.5. Métodos Diagnósticos**

Aunque los métodos tradicionales no permiten diferenciar entre las especies y subespecies de *Colletotrichum.*, las herramientas moleculares han ganado

popularidad la última década siendo empleados exitosamente para diferenciar las poblaciones de *Colletotrichum* de muchos hospederos. Dentro de las técnicas moleculares empleadas se encuentran: el análisis DNA (rRNA) ribosomal; primers específicos han sido designados principalmente de acuerdo con las disimilitudes en la secuencia de las regiones ITS de diferentes aislamientos de *Colletotrichum*., dichos primers se han usado para diferenciar entre *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloesporioides* por medio de la amplificación de fragmentos con PCR (Freeman *et al*, 1998).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

##### 3.1.1 Ubicación Política

El estudio se realizó en los laboratorios de cultivo de tejidos y biología molecular del Dpto. de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía parroquia Cutuglagua. El material de tomate de árbol fue suministrado por el Programa Nacional de Fruticultura, ubicado en la Granja Experimental Tumbaco.



**Figura 1.** Ubicación de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

### **3.1.2 Ubicación Geográfica**

La Estación Experimental Santa Catalina del INIAP se encuentra en las siguientes coordenadas (Figura 1)

**-Latitud:** 00° 22'00" S

**-Longitud:** 79° 32'00" W

**-Altitud:** 3058 m.s.n.m.

### **3.1.3 Ubicación Ecológica**

#### **3.1.3.1 Clima**

El área destinada para la investigación presenta las siguientes características climáticas según los datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba.

Clima: Frío-Templado

Temperatura: 12,04° C

Precipitación: 1487 mm

Humedad Relativa: 79%

#### **3.1.3.2 Condiciones específicas del laboratorio**

Temperatura promedio: 20±2°C

Horas Luz: 16

Intensidad luminosa: 2000-3000 lux

Humedad relativa: 80 %

## **3.2 MATERIALES**

### 3.2.1 Material Vegetal y biológico

- Brotes tiernos de siete materiales promisorios y una variedad comercial de tomate de árbol (testigo).
- Inóculo de *Colletotrichum acutatum*

### 3.2.2 Materiales de Campo

- Tijera de podar
- Fundas plásticas y Ziploc.
- Papel absorbente

### 3.2.3 Materiales de Laboratorio

- Agitador
- Agua destilada estéril
- Alcohol
- Bisturís y Pinzas
- Cinta rollopac y parafilm
- Frascos y cajas petri de vidrio
- Mechero
- Micropipeta
- Probetas
- Cajas petri plásticas
- Tubos de ensayo
- Triángulos de vidrio.

### 3.2.4 Reactivos

- Medio Murashige y Skoog (MS)
- Ácido ascórbico.
- Pantotenato de Calcio.
- 6-Benzilamino purina (BAP).
- Ácido Naftalenacético (ANA).
- Hipoclorito de Sodio.
- Tween 20.
- Ácido Giberélico (GA3).
- Azúcar.
- Papa-Dextrosa-Agar (PDA).



- Phytigel.
- Ácido láctico.
- Coctel de extracción de ADN
- Kit de identificación de *Colletotrichum gloesporioides* y *Colletotrichum acutatum*.
- Gel de agarosa
- Ácido indolbutírico (IBA).

### 3.2.5 Equipos de Laboratorio

- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cuarto de crecimiento
- Dispensador de medio
- Fotodocumentador
- pH metro
- Termociclador
- Plato de agitación
- Refrigerador
- Vortex

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Fase I Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de Materiales Promisorios de Tomate de Árbol a través de Cultivo de Tejidos.

##### 3.3.1.1 Diseño experimental

##### 3.3.1.1.1 Factores en estudio

#### A. Segregantes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav).

- S1= Segregante No- 4
- S2= Segregante No- 6
- S3= Segregante No- 7
- S4= Segregante No- 9
- S5= Segregante No- 11
- S6= Segregante No- 14
- S7= Segregante No- 18
- S8=Testigo(Anaranjado gigante)

**Fuente:** (Proaño, 2008).

#### B. Medio de cultivo selectivo<sup>1</sup>

**M1**= M&S + BAP (0,25mg/l) + GA3 (0,20mg/l) + Pantotenato de Ca (2mg/l) + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3,5g/l)

**M2**=M&S + BAP (0,4mg/l) + GA3 (0,6mg/l) + ANA (0,2mg/l) + Tiamina (0,4mg/l) + Sacarosa (20g/l) + Phytigel (3,5g/l)

**Fuente:** (Navarro, 2005).

---

<sup>1</sup>M&S: Sales de Murashige&Skoog; GA3: Ácido Giberélico; BAP: 6Benzilamino purina; ANA: ácido naftalenacético

### 3.3.1.1.2 Tratamientos

Cuadro 1. Tratamientos para la determinación de un medio de cultivo para inducción de brotes *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP, 2013.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1M1	Segregante N°- 4 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T2	S1M2	Segregante N°- 4 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T3	S2M1	Segregante N°- 6 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T4	S2M2	Segregante N°- 6 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T5	S3m1	Segregante N°- 7 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T6	S3M2	Segregante N°- 7 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T7	S4M1	Segregante N°- 9 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T8	S4M2	Segregante N°- 9 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T9	S5M1	Segregante N°- 11 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T10	S5M2	Segregante N°- 11 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T11	S6m1	Segregante N°- 14 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T12	S6M2	Segregante N°- 14 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T13	S7M1	Segregante N°- 18 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T14	S7M2	Segregante N°- 18 Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel
T15	S8M1	Segregante Testigo Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + Pant. de Ca + Sacarosa + Phytigel
T16	S8M2	Segregante Testigo Cultivado en: M&S + BAP + GA3 + ANA +Tiamina + Sacarosa + Phytigel

### 3.3.1.1.3 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 8x2.

### 3.3.1.1.4 Número de repeticiones

El ensayo contempló quince observaciones o repeticiones

### **3.3.1.1.5 Características de la unidad experimental**

La unidad experimental estuvo conformada por un tubo de ensayo de 2,0 cm de diámetro y 15 cm de alto con 5ml de medio de cultivo, conteniendo un explante proveniente de yemas axilares o apicales jóvenes de cada uno de los materiales promisorios y la variedad comercial de tomate de árbol destinados para la investigación

### **3.3.1.2 Análisis estadístico**

Se realizó la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos, segregantes e interacción (SxM) y DMS para medios de cultivo de las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresó en porcentaje

### **3.3.1.3 VARIABLES A MEDIR**

#### **Necrosis/oxidación (%)**

Se estableció mediante la relación entre el número de explantes necrosados y/u oxidados y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). La evaluación fue de forma visual considerando un valor de cero (0) para explantes con presencia de tejido sano y un valor de uno (1) para explantes que presentaron tejidos necrosados. Se evaluó a los 30 días.

### **Contaminación (%)**

Se estableció mediante la relación entre el número de explantes contaminados y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). Visualmente se determinó los explantes que presentaron contaminación asignándoles el valor de uno (1) y aquellos que no mostraron contaminación el valor de cero (0). Se evaluó a los 15 y 30 días.

### **Explantes vivos (%)**

Se estableció mediante la relación entre el número de explantes vivos y el número total de explantes sembrados en el medio de cultivo (MC). Por simple inspección se asignó el valor de uno (1) para aquellos explantes sobrevivientes y el valor de cero (0) para los que presentaron muerte del explante. Se evaluó a los 30 y 45 días.

### **Explantes con brotes (%)**

Se estableció el porcentaje de explantes con yemas brotadas mediante la relación entre el número de explantes que presenten brotes y el número total de explantes sembrados en medio de cultivo (MC). Se asignó el valor de uno (1) cuando el explante presentaba brotes y de cero (0) cuando este no los presentaba. Se evaluó a los 30 y 45 días.

### **Tasa de multiplicación de explantes**

Para el cálculo de la tasa de multiplicación (TM), se tomó en cuenta el número total de explantes y/o brotes que se transfirieron de un subcultivo a otro y en todo el proceso de multiplicación. Se evaluó cada 45 días.

### **Longitud del explante (cm)**

Se determinó la longitud de cada explante regenerado y se obtuvo un promedio de la longitud de explantes por cada tratamiento. Se evaluó a los 30 y 45 días.

#### **3.3.1.4 Métodos específicos de manejo del experimento**

##### **Obtención del material**

El material evaluado fue colectado de siete segregantes de tomate de árbol, existentes en el Programa Nacional de Fruticultura en la Granja Experimental Tumbaco y la variedad comercial de una plantación en producción. Los explantes colectados en invernadero fueron colocados en papel húmedo dentro de una funda plástica con cierre hermético, para evitar la deshidratación hasta ser trasladada al laboratorio.

##### **Introducción del material a condiciones *in vitro***

En esta etapa los materiales seleccionados fueron sometidos a un proceso de desinfección descrito por Navarro (2005) para tomate de árbol (Anexo 1). Posteriormente bajo condiciones de flujo laminar, se procedió a eliminar las hojas y las áreas necrosadas por efecto de la desinfección, con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles hasta obtener ápices de 0,7 a 1,0 cm de longitud que comprende el meristemo, los primordios foliares y las primeras hojas en desarrollo. Posteriormente, se sembraron en los medios descritos para la investigación. La descripción de los medios se detalla en el Anexo 2

## **Incubación**

Los tubos de ensayo sembrados fueron colocados en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 16 horas luz de fotoperiodo, durante siete semanas.

### **3.3.2 Fase II. Selección de Materiales Promisorios de Tomate de Árbol en Función de la Resistencia/Tolerancia a Antracnosis a través de la Inoculación de *Colletotrichum acutatum*.**

#### **3.3.2.1 Diseño experimental**

##### **3.3.2.1.1 Factores en estudio**

#### **A. Segregantes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav)**

**S1** = Segregante N<sup>o</sup>-4

**S5** = Segregante N<sup>o</sup>-11

**S2** = Segregante N<sup>o</sup>-6

**S6** = Segregante N<sup>o</sup>-14

**S3** = Segregante N<sup>o</sup>-7

**S7** = Segregante N<sup>o</sup>-18

**S4** = Segregante N<sup>o</sup>-9

**S8** = Testigo (Anaranjado Gigante)

#### **B. Cepa de Hongo**

**H2** = *Colletotrichum acutatum*

### 3.3.2.1.2 Tratamientos

Cuadro 2. Tratamientos para inoculación de *Colletotrichum acutatum*, en siete segregantes y una variedad comercial anaranjado gigante (testigo) de tomate de árbol. INIAP-2012

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1H2	Segregante N°- 4. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T2	S2H2	Segregante N°- 6. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T3	S3H2	Segregante N°- 7. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T4	S4H2	Segregante N°- 9. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T15	S5H2	Segregante N°- 11. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T6	S6H2	Segregante N°- 14. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T7	S7H2	Segregante N°- 18. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>
T8	S8H2	Segregante testigo. Inoculado con <i>Colletotrichum acutatum</i>

### 3.3.2.1.3 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA).

### 3.3.2.1.4 Número de repeticiones

El ensayo contempló seis observaciones o repeticiones

### 3.3.2.1.5 Características de la unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio con 30 ml de medio de cultivo en el cual se sembraron cuatro explantes provenientes de los materiales promisorios y un testigo de tomate de árbol regenerados en la primera fase que fueron inoculados con el hongo *Colletotrichum acutatum*.

### 3.3.2.2 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos de las variables en estudio que presentaron diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresó en porcentaje.



Se calcularon los promedios de los materiales promisorios de acuerdo con el porcentaje de sobrevivencia después de la interacción con el hongo. Las interacciones fueron evaluadas de acuerdo con la escala de calificación definida por Granados (1988), que se detalla en la tabla N°-1 y Anexo 3.

Tabla 1. Compatibilidad Hongo/Cultivar

Interacción	Clase	Descripción
INCOMPATIBLE	1	Sin daño (sana)
	2	Daño ligero
TOLERANTE	3	Daño medio
COMPATIBLE	4	Muy dañada
	5	Daño severo o total

El tipo de interacción se clasificó como incompatibilidad (resistencia) cuando los cultivares presentaron los síntomas de los niveles 1, 2 y la reacción fue clasificada de compatibilidad (susceptibilidad) cuando presentaron los síntomas de los niveles 4-5.

El nivel 3 tolerancia fue considerado el momento en que los cultivares presentaron un nivel medio de resistencia. Se determinó el porcentaje de las interacciones compatibles e incompatibles, de acuerdo al nivel de susceptibilidad de los materiales promisorios y de la agresividad del inóculo de *Colletotrichum acutatum* a la dilución de  $1 \times 10^5$  conidias/ml propuesta para la investigación. La dilución fue seleccionada de acuerdo a pruebas de patogenicidad realizadas en investigaciones anteriores (Contreras, 2006).

### 3.3.2.3 Variables a medir

#### **Iniciación de síntomas de antracnosis (días)**

Se registró el número de días que transcurrieron desde la inoculación de los explantes hasta el aparecimiento de los primeros síntomas (necrosis) de la enfermedad en hojas y/o tallos. Es decir cuando se presentaron las manchas o depresiones características de la enfermedad.

#### **Iniciación de signos de la enfermedad (días)**

Se registró el número de días que transcurrieron desde la inoculación hasta el aparecimiento de los primeros signos de la enfermedad en los explantes. Es decir cuando se observó la esporulación del hongo caracterizada como un polvillo rosado salmón.

#### **Incidencia de la enfermedad (%)**

Durante el crecimiento del explante, en cada frasco, se contabilizó el número de explantes que presentaron la enfermedad, además se obtuvo el porcentaje de explantes infectados en relación al total de explantes inoculados. La lectura se realizó a los 8 y 12 días después de la inoculación.

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Suma de explantes enfermos}}{\text{Suma total de explantes}} \times 100$$

#### 3.3.2.4 Métodos específicos de manejo del experimento

##### **Preparación del material vegetal *in vitro* para determinar la resistencia a *Colletotrichum acutatum*, en materiales promisorios de tomate de árbol.**

Para preparar el material vegetal para la inoculación *in vitro* se trasladó el material sano y libre de contaminación de los tubos de ensayo a frascos de vidrio de un diámetro de 10 cm, con medio básico de cultivo M&S. Cada frasco contenía cuatro cortes de yemas adventicias o axilares, con un espacio de separación de 2 a 3 cm., entre cortes y entre paredes internas del frasco. Las condiciones de crecimiento *in vitro* fueron de 20° C, 16 horas luz y 8 de oscuridad. Las plantas que presentaron buen crecimiento y de 2 a 3 hojas son las que se seleccionaron para la inoculación.

##### **Recolección de muestras**

Los aislamientos se obtuvieron a partir de frutos infectados de tomate de árbol muestreados en campo, y que presentaron las lesiones típicas de la antracnosis. Las muestras fueron colectadas en la provincia de Pichincha sector Tumbaco donde se reporta la incidencia del patógeno. Para su recolección se utilizaron fundas plásticas selladas, las cuales se identificaron y almacenaron, para su posterior traslado al laboratorio.

##### **Aislamiento de la cepa**

Para realizar esta investigación se utilizó cepas del hongo causante de la antracnosis (*Colletotrichum spp*), muestreadas en campo, aisladas y purificadas en el laboratorio de Biología Molecular del DNB, con la colaboración del Departamento

de Protección Vegetal. Para el aislamiento del hongo, a partir de frutos infectados, se prepararon secciones de tejido semiafectado de aproximadamente  $0.3 \text{ cm}^2$ , las cuales fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante dos minutos con el fin de eliminar la flora normal presente en el tejido, e inmediatamente se enjuagó con agua destilada esterilizada. En la cámara de flujo laminar se depositaron cinco secciones en forma equidistante en cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) que mantiene un pH 5.6. Las cajas petri se sellaron con parafilm, se etiquetaron y por último se transfirieron a una cámara de crecimiento a  $24^\circ \text{ C}$  en oscuridad durante 5 - 8 días hasta observar el desarrollo de las colonias del hongo.

### **Purificación de la cepa**

Transcurridos ocho días se procedió a seleccionar las mejores colonias, en base a características macroscópicas como el color, que debe ser gris claro en el caso de *Colletotrichum gloesporioides.*, y rosado o salmón para *Colletotrichum acutatum.*, la forma del micelio, típicamente veloso y sumergido en el medio de cultivo; y microscópicas como la forma de las conidias, que deben ser cilíndricas. Identificado la esporulación, se procedió a realizar un cultivo monospórico, sembrando en una caja con PDA una suspensión diluida de conidias para obtener colonias que se originan de una sola conidia, Los aislamientos monospóricos fueron multiplicados en PDA para la inoculación.

### **Identificación molecular del género *Colletotrichum spp.***

Aislado, purificado y reconocido el género *Colletotrichum spp.* se identificó la especie mediante técnicas de identificación molecular. Para establecer si las cepas correspondían a la especie *gloeosporioides* o *acutatum* que son las de mayor incidencia en el tomate de árbol.

### **Preparación de la concentración del inóculo**

A partir de un cultivo de *Colletotrichum acutatum.*, puro en caja, el inóculo se preparó añadiendo agua estéril a las cajas petri y raspando las conidias con una espátula, posteriormente se filtró la solución usando una capa gruesa de gasa como filtro hasta obtener 100 ml de solución de conidias, luego se determinó la concentración de conidias de la suspensión en una cámara de Neubauer, registrando así el número de esporas/ml de agua. Para calcular la concentración de  $1 \times 10^5$  conidias/ml se utilizó la fórmula  $C1V1=C2V2$ . (Anexo 4). (Contreras, 2006).

### **Inoculación**

Para la inoculación *in vitro*, dos hojas de cada explante fueron inoculadas mediante una pipeta de 10uL. Se colocó una gota por hoja de una suspensión de  $1 \times 10^5$  conidias/ml, sobre el lado adaxial. Una vez realizada la inoculación, las plántulas se colocaron en cámara de incubación a una temperatura de 20-22 °C y a una humedad relativa sobre el 90% con 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Ocho días después de la inoculación se realizó la primera evaluación. La preparación del

inóculo y la inoculación fueron desarrolladas en condiciones estériles. Se anotaron los resultados de resistencia y susceptibilidad a los 8 y 12 días post-inoculación.

### **Evaluación de la resistencia**

Se evaluó el grado de infección que presentaron los explantes de acuerdo a la tabla No-1 se determinó el material con mayor grado de resistencia en base a la presencia de síntomas y signos.

#### **3.3.3 Fase III. Inducción de Raíces en Materiales Promisorios de Tomate de Árbol, Seleccionados en Función de su Resistencia/Tolerancia a *Colletotrichum acutatum*.**

Esta fase contempló el manejo de los materiales promisorios No- 09 y No- 18 que fueron los segregantes que presentaron las mejores características de resistencia/tolerancia a antracnosis con la finalidad de establecer el medio indicado para obtener una mayor tasa de enraizamiento. Es importante mencionar que los medios de enraizamiento propuestos al inicio de la investigación no reportaron resultados favorables por tanto bajo recomendaciones técnicas de Benítez (2012) se propuso dos nuevos medios sin la presencia de hormonas sintéticas y cuyos resultados se reportan en la presente investigación.

### 3.3.3.1 Diseño experimental

#### 3.3.3.1.1 Factores en estudio

##### A. Segregantes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav)

S1 = Segregante No-1

S2 = Segregante No-2

##### B. Medio de Enraizamiento

E1= M&S básico + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3.5g/l)

E2= M&S con vitaminas + Sacarosa (30g/l) + Phytigel (3.5g/l)

Fuente: Benítez, (2012).<sup>2</sup>

#### 3.3.3.1.2 Tratamientos

Cuadro 3. Tratamientos para la determinar el medio de cultivo adecuado para inducción de raíces *in vitro* de materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2012.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	S1E1	Segregante seleccionado N <sup>o</sup> -1 Cultivado en: M&S/básico + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T2	S2E1	Segregante seleccionado N <sup>o</sup> -2 Cultivado en: M&S/básico + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T3	S1E2	Segregante seleccionado N <sup>o</sup> -1 Cultivado en: M&S/vitaminas + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).
T4	S2E2	Segregante seleccionado N <sup>o</sup> -2 Cultivado en: M&S/vitaminas + Azúcar (30g/l) + Phytigel (3.5g/l).

#### 3.3.3.1.3 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 2x2

#### 3.3.3.1.4 Número de repeticiones

El ensayo contempló 10 observaciones por tratamiento

<sup>2</sup>Benítez, J. 2012. Responsable del Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Dpto. de Biotecnología INIAP. Com. Pers.

### **3.3.3.1.5 Características de la unidad experimental**

La unidad experimental fue conformada por un tubo de ensayo de 2.0 cm de diámetro y 15 cm de alto con 5 ml de medio de enraizamiento, conteniendo un brote de cada uno de los materiales promisorios de tomate de árbol seleccionados.

### **3.3.3.3 Análisis estadístico**

Se realizó la prueba de Tukey al 5%, para tratamientos y DMS para medios de cultivo, segregantes e interacción SxE de las variables en estudio que presenten diferencias estadísticas significativas. El coeficiente de variación (CV) se expresó en porcentaje.

### **3.3.3.4 Variables a evaluar**

#### **Número de explantes con emisión de raíces (%)**

Se contabilizó el número de plántulas que desarrollaron raíces a los 30 y 45 días de haber sido sembrado el brote en medio de enraizamiento (ME).

$$\text{Brotos con raíces} = \frac{\text{Nro. brotes con emisión de raíces}}{\text{Nro. de brotes sembrados en ME}} \times 100$$

#### **Número de raíces**

Se contabilizó el número de raíces de cada brote, a los 30 y 45 días de haber sido sembrados en ME.



### **Longitud de raíces (cm)**

Se determinó la longitud de la raíz principal a los 45 días haber sido sembrado el brote en medio de enraizamiento. Se utilizó una regla, y la medida se expresó en centímetros.

#### **3.3.3.5 Manejo específico del experimento**

##### **Sembrado de brotes**

Los brotes obtenidos de los materiales promisorios de tomate de árbol seleccionados fueron cultivados en medios de enraizamiento, los cuales fueron un medio básico M&S, y un medio M&S con vitaminas, estos medios son sintetizados industrialmente y con características específicas propias del fabricante (Anexo 5). El pH del medio se ajustó a 5.7 y posteriormente, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 PSI (1.5Kg cm<sup>-2</sup>) de presión durante 20 minutos.

##### **Incubación**

Los tubos sembrados se colocaron en el cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas de 25±1°C de temperatura, 16 horas luz de fotoperiodo, durante 30 días. Durante un periodo de 7 semanas.

## RESULTADOS

### 4.1 FASE I Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de Materiales Promisorios de Tomate de Árbol a través de Cultivo de Tejidos.

La fase I de establecimiento y multiplicación de los materiales promisorios de tomate de árbol evaluados se llevó a cabo considerando seis variables importantes que permitieron establecer el medio de cultivo apropiado de introducción/multiplicación y los segregantes con mejores características de adaptación a condiciones *in vitro*. Durante la etapa de introducción de los explantes provenientes de campo se evaluó un solo protocolo de desinfección descrito por Navarro (2005). Las variables discretas binarias y las variables cuantitativas fueron analizadas mediante comparación de medias, análisis de varianza (ADEVA), la prueba de Tukey para tratamientos, segregantes e interacción (SxM) y DMS para medios de cultivo, cuando se presentó diferencia estadística ( $\alpha=0,05$ ). Los datos obtenidos en las variables fueron transformados para el análisis de varianza, debido a que no se ajustaron a la normalidad ya que se obtuvieron varios valores de cero, para ello se empleó la ecuación  $\sqrt{x + 0,5}$  donde x es el valor asignado a cada variable.

En el cuadro 4 se presenta un resumen del análisis de varianza de las variables evaluadas en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*, donde se registra los valores de los cuadrados medios, el nivel de significancia y el coeficiente de variación tanto para tratamientos como para los factores en estudio y su respectiva interacción.

Cuadro 4. Cuadrados medios y nivel de significancia para las variables evaluadas en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*. INIAP-2013.

CM y Nivel de Significancia											
Fuentes de variación	GL	% Necrosis	% Contaminación	% Supervivencia			% Explantes/brotos		Longitud de explantes(cm) TM		
		30 días	15 días	30 días	30 días	45 días	30 días	45 días	30 días	45 días	45 días
Tratamientos	15	0,16 **	0,02 ns	0,03 ns	0,14 **	0,15 **	0,15 **	0,15 **	0,64 **	0,85 **	1,25 **
Segregantes	7	0,14*	0,04 ns	0,04 ns	0,13 *	0,14 *	0,11 *	0,14 *	0,47 **	0,64 **	1,03 **
Medios	1	1,37**	0,04 ns	0,16 ns	1,22 **	1,22 **	1,22**	1,22 **	4,07 **	5,77 **	9,38 **
SxM	7	0,01ns	0,01 ns	0,01 ns	0,01 ns	0,01 ns	0,03 ns	0,01 ns	0,32 **	0,37 **	0,32 *
Error	224	0,06	0,04	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,15
Total	239	0,07	0,03	0,04	0,07	0,07	0,06	0,07	0,09	0,13	0,22
CV		26,08%	24,68%	26,09%	25,37%	25,53%	26,49%	25,53%	23,26%	26,52%	34,40%

#### 4.1.1 Necrosis/Oxidación

Los porcentajes de necrosis/oxidación que presentaron los explantes introducidos indican valores variables entre los tratamientos, donde destacan el T9 ya que presenta un valor de 13,33% de necrosamiento al contrario con el T16 cuyo valor fue de 80%, es decir que la mayoría de explantes se necrosaron u oxidaron, resultados que se aprecian en el cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de explantes necrosados/oxidados y porcentaje de explantes viables en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013.

Tratamientos	Descripción	Necrosis %	Viabilidad %
T1	Segregante N <sup>o</sup> - 04/Medio 1	40,00%	60,00%
T2	Segregante N <sup>o</sup> - 04/Medio 2	66,67%	33,33%
T3	Segregante N <sup>o</sup> - 06/Medio 1	20,00%	80,00%
T4	Segregante N <sup>o</sup> - 06/Medio 2	53,33%	46,67%
T5	Segregante N <sup>o</sup> - 07/Medio 1	46,67%	53,33%
T6	Segregante N <sup>o</sup> - 07/Medio 2	66,67%	33,33%
T7	Segregante N <sup>o</sup> - 09/Medio 1	26,67%	73,33%
T8	Segregante N <sup>o</sup> - 09/Medio 2	53,33%	46,67%
T9	Segregante N <sup>o</sup> - 11/Medio 1	13,33%	86,67%
T10	Segregante N <sup>o</sup> - 11/Medio 2	46,67%	53,33%
T11	Segregante N <sup>o</sup> - 14/Medio 1	20,00%	80,00%
T12	Segregante N <sup>o</sup> - 14/Medio 2	60,00%	40,00%
T13	Segregante N <sup>o</sup> - 18/Medio 1	20,00%	80,00%
T14	Segregante N <sup>o</sup> - 18/Medio 2	53,33%	46,67%
T15	Segregante Testigo/Medio 1	60,00%	40,00%
T16	Segregante Testigo/Medio 2	80,00%	20,00%

En la figura 2 se puede observar que los valores de viabilidad (explantes vivos) destacan en varios tratamientos entre ellos el T9, T11, T13 y T3, los mismos que responden favorablemente a las condiciones *in vitro*.

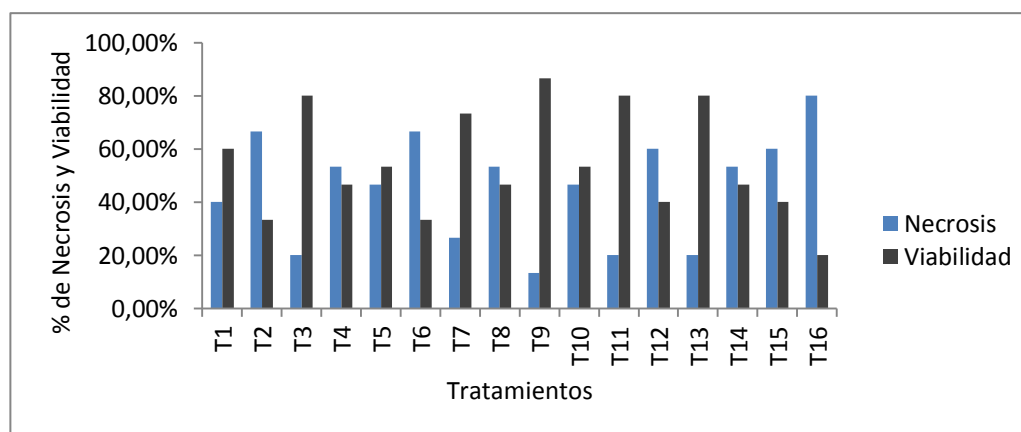


Figura 2. Porcentaje de explantes necrosados en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol.

La prueba de Tukey al 5% indica dos grupos estadísticamente diferentes en la variable necrosis/oxidación, donde T3, T13, T11 y T9 presentaron el menor valor (B), es decir el menor porcentaje de explantes necrosados a los 30 días constituyéndose en los mejores tratamientos en función de esta variable; resultados que se aprecian en la figura 3.

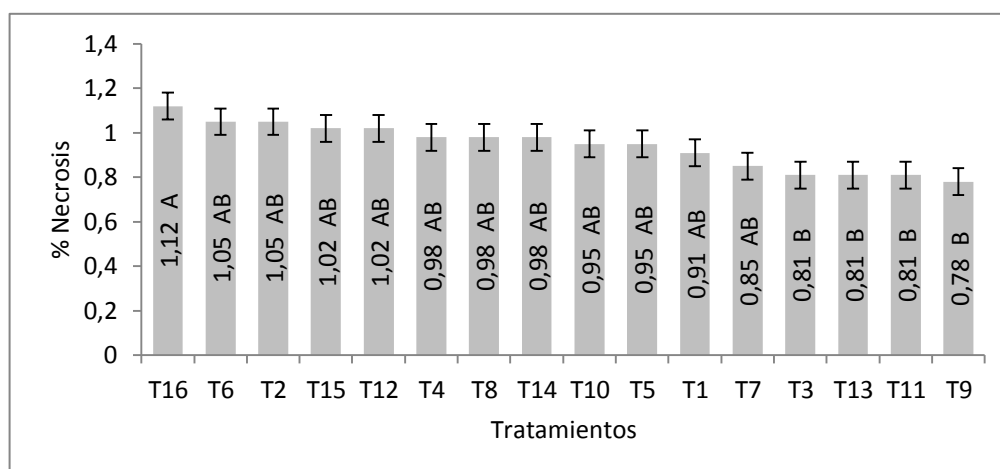


Figura 3. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable necrosis.

La prueba de Tukey al 5% indica dos grupos estadísticamente heterogéneos, donde el segregante S05 que corresponde al material promisorio N<sup>o</sup>-11, presentó el menor valor (B), es decir la menor cantidad de explantes necrosados a los 30 días constituyéndose en el mejor segregante en función de esta variable.

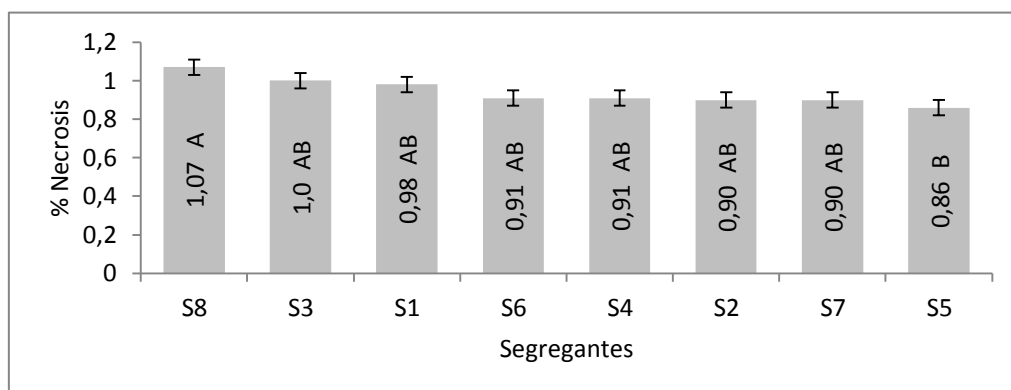


Figura 4. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable necrosis.

La prueba de comparación DMS ( $\alpha=0,05$ ) indica dos grupos estadísticamente heterogéneos, donde el medio uno presentó el menor valor (B), es decir la menor cantidad de explantes necrosados a los 30 días constituyéndose en el mejor medio en función de esta variable.

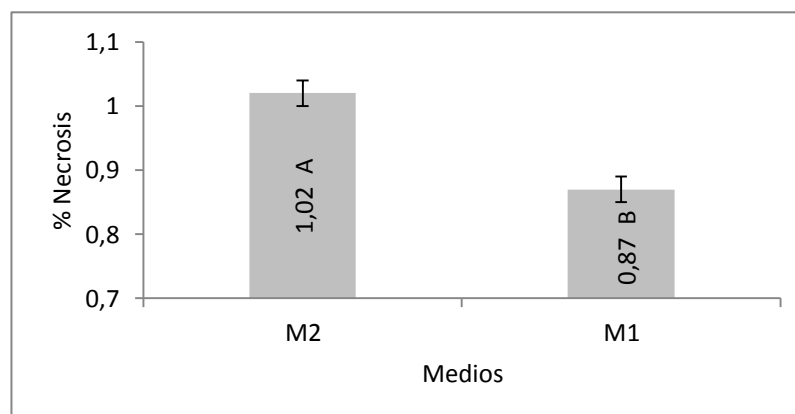


Figura 5. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de cultivo para la variable necrosis.

#### 4.1.2 Contaminación

La contaminación entre los explantes introducidos de tomate árbol presentó rangos de entre 6,67% a 40,00%, tanto en la evaluación a los 15 y 30 días. Estos valores varían según el segregante y el medio evaluado, donde el T15 y T16 que corresponden al testigo (variedad comercial) presentaron el mayor porcentaje de contaminación, como se observa en el cuadro 6. La contaminación de los explantes ocurrió principalmente por la presencia de hongos del género *Cladosporium* en el material vegetal introducido.

Cuadro 6. Porcentaje de explantes contaminados a los 15 y 30 días de su introducción en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013.

Tratamientos	Descripción	% Contaminación	
		15 Días	30 Días
T1	Segregante N°- 04/Medio 1	13,33%	13,33%
T2	Segregante N°- 04/Medio 2	20,00%	26,67%
T3	Segregante N°- 06/Medio 1	6,67%	6,67%
T4	Segregante N°- 06/Medio 2	20,00%	20,00%
T5	Segregante N°- 07/Medio 1	13,33%	26,67%
T6	Segregante N°- 07/Medio 2	20,00%	26,67%
T7	Segregante N°- 09/Medio 1	6,67%	6,67%
T8	Segregante N°- 09/Medio 2	13,33%	20,00%
T9	Segregante N°- 11/Medio 1	6,67%	6,67%
T10	Segregante N°- 11/Medio 2	13,33%	26,67%
T11	Segregante N°- 14/Medio 1	13,33%	20,00%
T12	Segregante N°- 14/Medio 2	26,67%	26,67%
T13	Segregante N°- 18/Medio 1	13,33%	13,33%
T14	Segregante N°- 18/Medio 2	13,33%	26,67%
T15	Segregante Testigo/Medio 1	33,33%	33,33%
T16	Segregante Testigo/Medio 2	33,33%	40,00%

En la figura 6, se observa que los tratamientos T3, T7 y T9 presentaron los menores porcentajes de contaminación tanto a los 15 como a los 30 días, sin embargo los tratamientos T15 y T16 alcanzaron los valores más altos de contaminación.

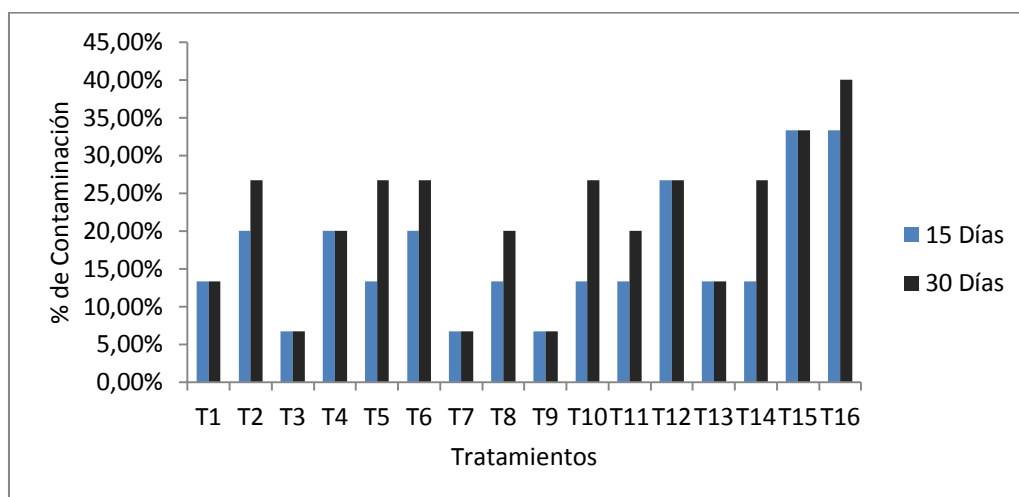


Figura 6. Porcentaje de explantes contaminados en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol.

El análisis de varianza demuestra que no existen diferencias estadísticas significativas tanto entre los tratamientos como en el análisis factorial de segregantes y medios con su respectiva interacción (Cuadro 4), esto demuestra que el protocolo de desinfección descrito por Navarro (2005), refleja resultados alentadores ya que en la mayoría de los tratamientos los valores de contaminación son bajos.

#### 4.1.3 Explantes vivos

El porcentaje de sobrevivencia de los explantes introducidos de los diferentes segregantes es variable tanto en la evaluación a los 30 días como a los 45 días, donde se aprecian en el T9 un valor máximo de 86,67% que demuestra que en su mayoría los explantes sobreviven al sistema de cultivo *in vitro*. En gran parte de los tratamientos la sobrevivencia se mantiene a los 30 y 45 días esto señala que los explantes que superan los 30 días de incubación o crecimiento ya no secretan fenoles que son los causantes de la oxidación y por ende la muerte del explante, por lo general los explantes que mueren a los 45 días es por contaminación bacteriana

endógena y está comprobado que los contaminantes más frecuentes pertenecen a las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, esto se explica, porque estas bacterias gram negativas son abundantes en la superficie aérea de la planta y en el ambiente.

Cuadro 7. Porcentaje de explantes vivos a los 30 y 45 días de su introducción en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013

Tratamientos	Descripción	% Supervivencia	
		30 Días	45 Días
T1	Segregante N°- 04/Medio 1	60,00%	60,00%
T2	Segregante N°-04/Medio 2	33,33%	33,33%
T3	Segregante N°- 06/Medio 1	73,33%	73,33%
T4	Segregante N°-06/Medio 2	46,67%	46,67%
T5	Segregante N°- 07Medio 1	53,33%	46,67%
T6	Segregante N°-07/Medio 2	33,33%	26,67%
T7	Segregante N°- 09/Medio 1	73,33%	73,33%
T8	Segregante N°-09/Medio2	40,00%	40,00%
T9	Segregante N°- 11/Medio 1	86,67%	86,67%
T10	Segregante N°-11/Medio 2	53,33%	53,33%
T11	Segregante N°- 14/Medio 1	66,67%	60,00%
T12	Segregante N°-14/Medio 2	40,00%	40,00%
T13	Segregante N°- 18/Medio 1	80,00%	80,00%
T14	Segregante N°-18/Medio 2	46,67%	40,00%
T15	Segregante Testigo/Medio 1	40,00%	40,00%
T16	Segregante Testigo/Medio 2	20,00%	20,00%

La figura 7 indica que los tratamientos T9 y T13 presentan los valores más altos de supervivencia, los mismos que se siguen afianzando como los mejores tratamientos en cuanto a la respuesta al sistema de cultivo *in vitro*.

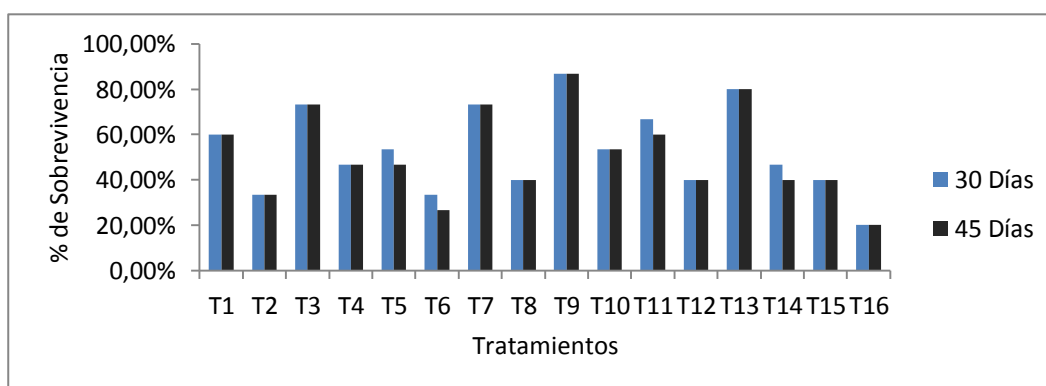


Figura 7. Porcentaje de explantes vivos de los materiales promisorios de tomate de árbol en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*.



El análisis estadístico y la prueba de comparación (Tukey  $\alpha=0,05$ ) demuestran dos grupos estadísticamente heterogéneos, donde destaca el T9 con el mayor valor (A), lo que indica que es el tratamiento con el mayor grado de sobrevivencia de los explantes tanto a los 30 y 45 días de la evaluación, lo contrario ocurre para el T16 que registra el menor valor (B), por consiguiente representa el tratamiento con la menor sobrevivencia de explantes a los 30 y 45 días de crecimiento. Los grupos homogéneos (AB) no presentan diferencias estadísticas en cuanto a sobrevivencia, sin embargo en la figura 8 y figura 9 se aprecia el grado de sobrevivencia en orden descendente de cada uno de los tratamientos es los periodos de 30 y 45 días de desarrollo de los explantes.

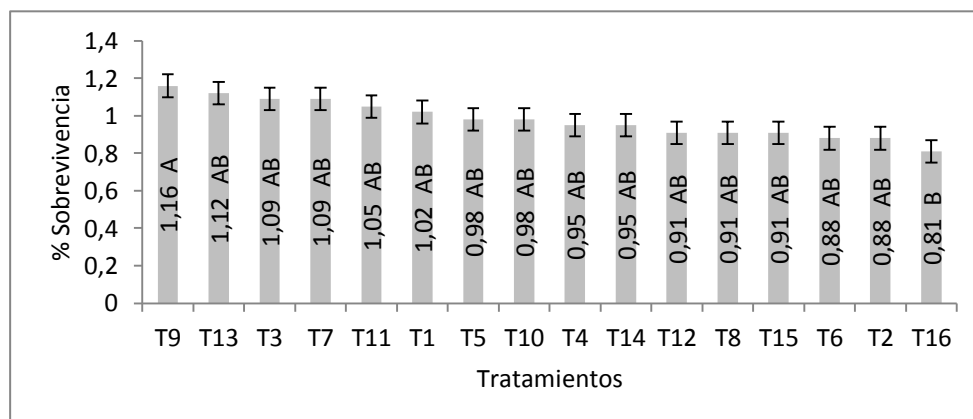


Figura 8. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes vivos a los 30 días de crecimiento de los explantes.

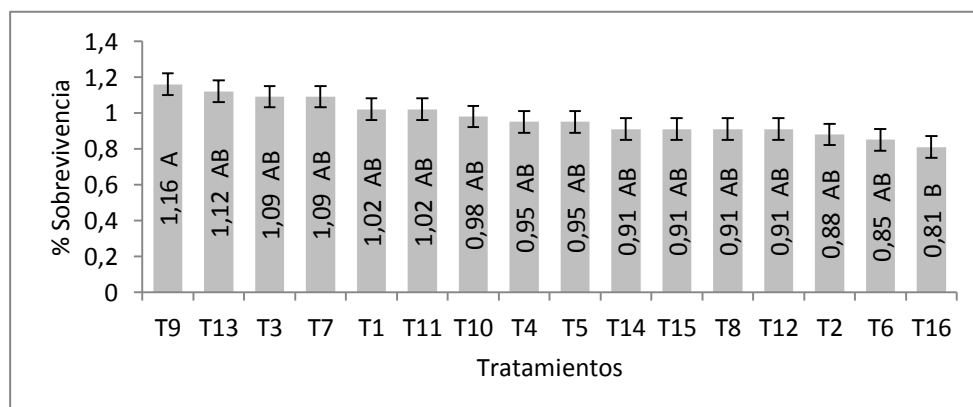


Figura 9. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes vivos a los 45 días de crecimiento de los explantes.

La prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) y el análisis de comparaciones de medias de los segregantes, demuestran dos grupos estadísticamente heterogéneos, donde el segregante S05 que es identificado como el material promisorio No.11 presentó el mayor valor (A), es decir el mayor grado de sobrevivencia tanto a los 30 y 45 días de su evaluación, a diferencia del segregante S08 que corresponde al material testigo (variedad comercial) presentó el menor valor (B), lo que significa un material con un grado menor de sobrevivencia tanto a los 30 y 45 días de su crecimiento.

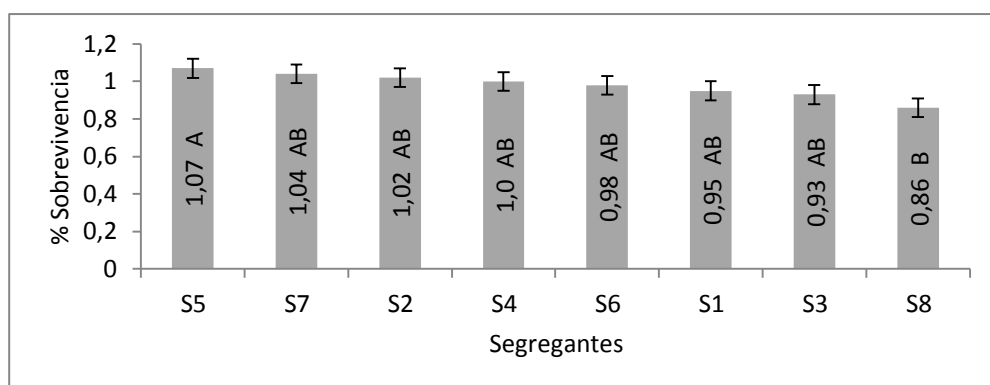


Figura 10. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable explantes vivos a los 30 días de crecimiento de los explantes.

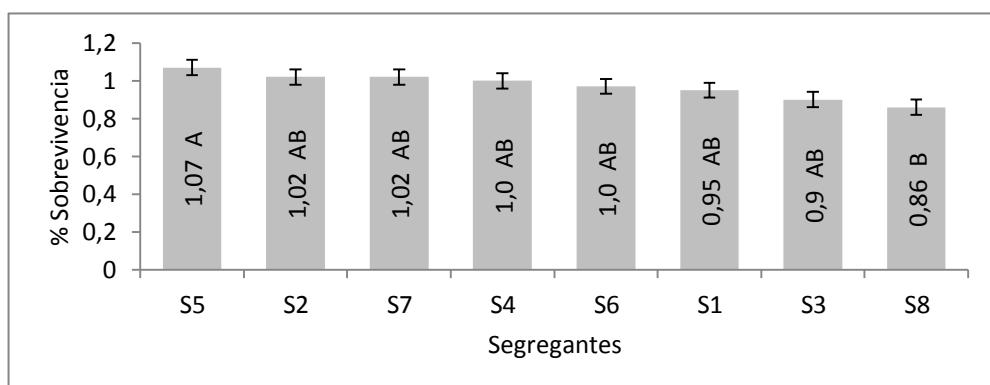


Figura 11. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable explantes vivos a los 45 días de desarrollo de los explantes.

El análisis de varianza indica que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo evaluados, por ello se analizó mediante DMS ( $\alpha=0,05$ ), la prueba indica dos grupos heterogéneos, donde el medio uno (M1) presentó el valor más alto (A), lo que demuestra el mayor grado de sobrevivencia en este medio de cultivo en su evaluación a los 30 y 45 días de crecimiento.

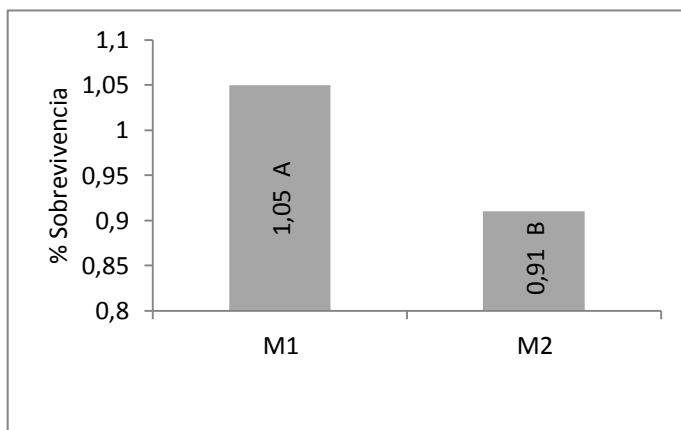


Figura 12. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de cultivo para la variable sobrevivencia a los 30 días de desarrollo de los explantes.

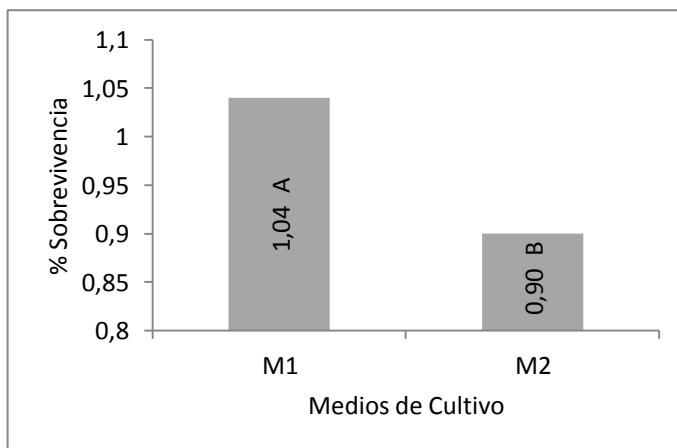


Figura 13. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de cultivo para la variable sobrevivencia a los 45 días de desarrollo de los explantes.

#### 4.1.4 Explantes con brotes

Los datos obtenidos de los explantes que presentaron brotes se realizó en dos lecturas a los 30 y 45 días respectivamente. Los porcentajes más altos de explantes con la presencia de brotes se obtuvieron en los tratamientos T9, T13, T7 y T3 con valores que superan el 70% a los 45 días, mientras que los tratamientos T16, T6 y T2 presentaron valores inferiores al 35% en su evaluación a los 45 días. Es importante resaltar que el apareamiento de mayor cantidad de brotes ocurre a los 45 días de crecimiento de los explantes, lo que influye directamente con la tasa de multiplicación; resultados que se muestran el cuadro 8 y la figura 14.

Cuadro 8. Porcentaje de explantes con presencia de brotes a los 30 y 45 días de su introducción en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013.

Tratamientos	Descripción	% Explantes/brotes	
		30 días	45 días
T1	Segregante N°- 04/Medio 1	46,67%	60,00%
T2	Segregante N°- 04/Medio 2	20,00%	33,33%
T3	Segregante N°- 06/Medio 1	60,00%	73,33%
T4	Segregante N°- 06/Medio 2	20,00%	46,67%
T5	Segregante N°- 07/Medio 1	33,33%	46,67%
T6	Segregante N°- 07/Medio 2	13,33%	26,67%
T7	Segregante N°- 09/Medio 1	53,33%	73,33%
T8	Segregante N°- 09/Medio 2	20,00%	40,00%
T9	Segregante N°- 11/Medio 1	60,00%	86,67%
T10	Segregante N°- 11/Medio 2	33,33%	53,33%
T11	Segregante N°- 14/Medio 1	40,00%	60,00%
T12	Segregante N°- 14/Medio 2	26,67%	40,00%
T13	Segregante N°- 18/Medio 1	73,33%	80,00%
T14	Segregante N°- 18/Medio 2	26,67%	40,00%
T15	Segregante Testigo/Medio 1	20,00%	40,00%
T16	Segregante Testigo/Medio 2	6,67%	20,00%

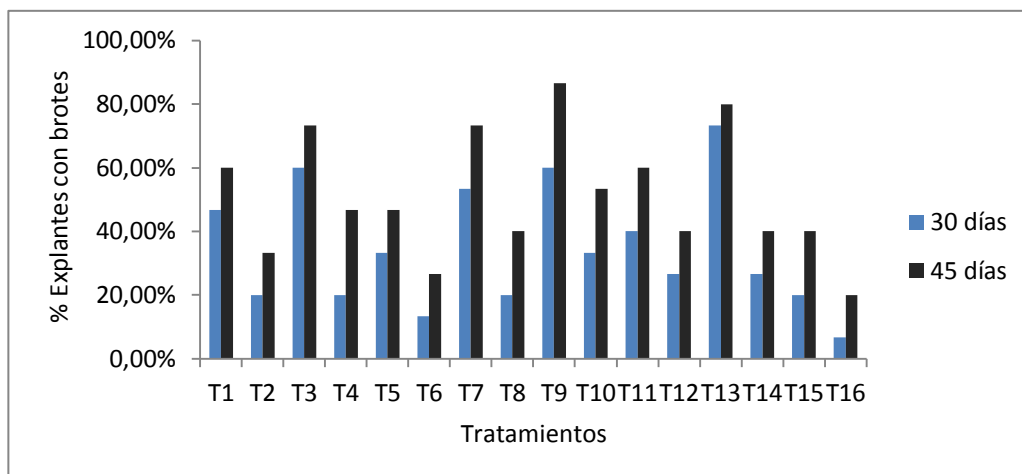


Figura 14. Porcentaje de explantes con brotes evaluados a los 30 y 45 días de crecimiento de los materiales promisorios de tomate de árbol en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*.

El análisis estadístico mediante comparación de medias y la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) indica dos grupos estadísticamente diferentes, donde sobresale el T13 en su evaluación a los 30 días y el T9 en su apreciación a los 45 días ya que presentan el mayor valor (A), lo que se traduce en los tratamientos con mayor capacidad de brotación, de la misma forma se observa que el T16 en las evaluaciones a los 30 y 45 días presenta el menor valor (B), lo que significa que es el tratamiento con la menor capacidad de brotación; resultados que se observan en la figura 15 y figura 16.

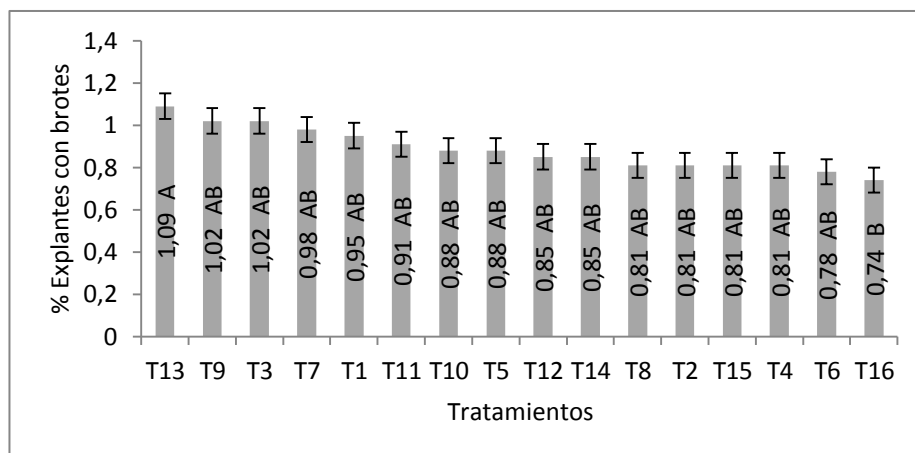


Figura 15. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes con brotes a los 30 días de crecimiento de los explantes.

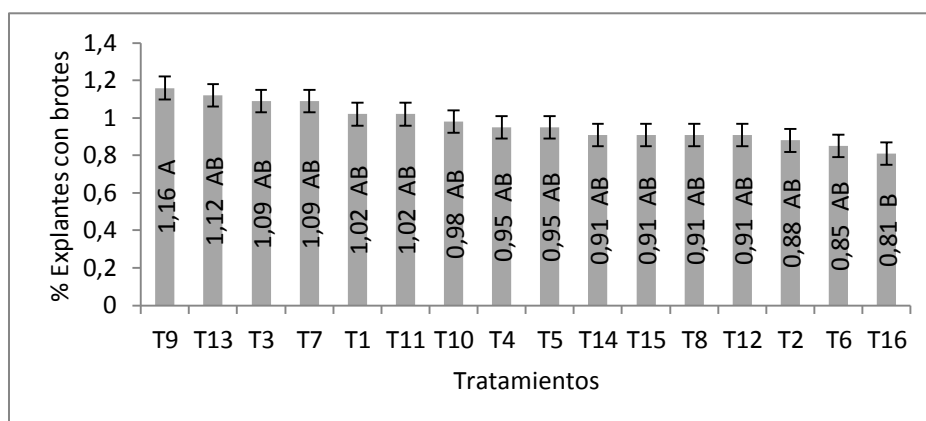


Figura 16. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes con brotes a los 45 días de crecimiento de los explantes.

En el análisis estadístico de los segregantes mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), se observa dos grupos estadísticamente diferentes, en la figura 17 se observa que el segregante N°-18 que se identifica como S07 presentó el mayor valor (A), que se traduce como el material promisorio con la mayor capacidad de brotación en su evaluación a los 30 días y en la figura 18 se aprecia que S05 que corresponde al material promisorio N°-11 presentó el mayor valor (A), por lo tanto se considera que es el segregante con mayor cantidad de explantes con brotes en su evaluación a los 45 días. Cabe mencionar que el material testigo S08 presentó el menor valor (B), lo que demuestra que la capacidad de brotación es menor en su apreciación a los 30 y 45 días.

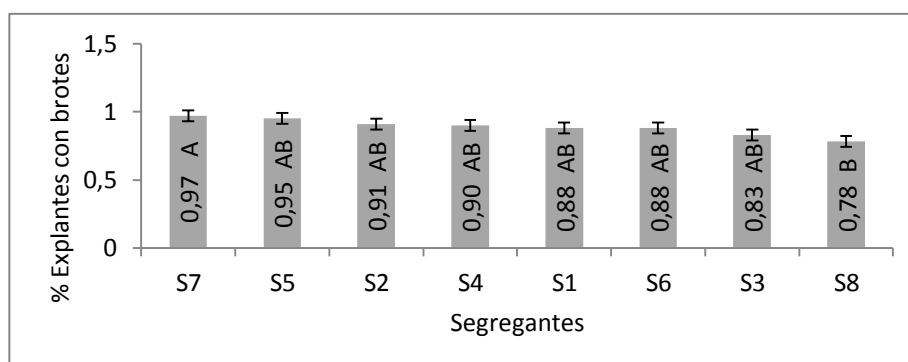


Figura 17. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable explantes con brotes a los 30 días de crecimiento de los explantes.

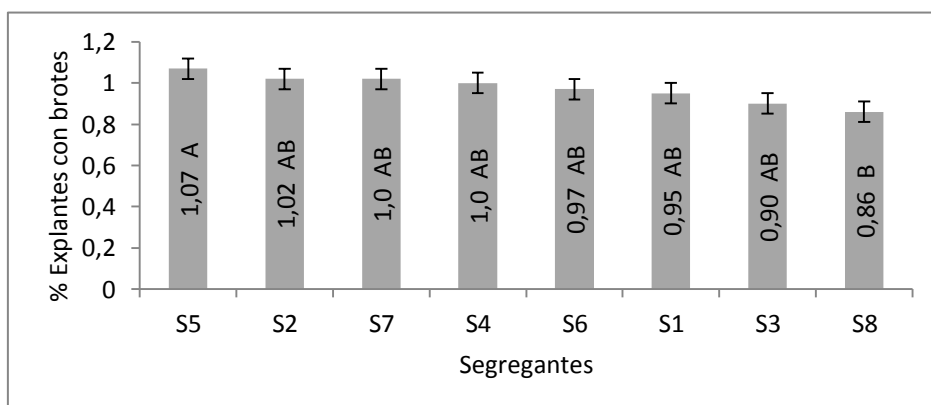


Figura 18. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable explantes con brotes a los 45 días de crecimiento de los explantes.

Las diferencias significativas entre los medios de cultivo permiten analizar los datos mediante DMS ( $\alpha=0,05$ ), la prueba registra al medio uno (M1) como el mejor en cuanto a explantes con presencia de brotes en la apreciación a los 30 y 45 días, ya que presentó el mayor valor (A).

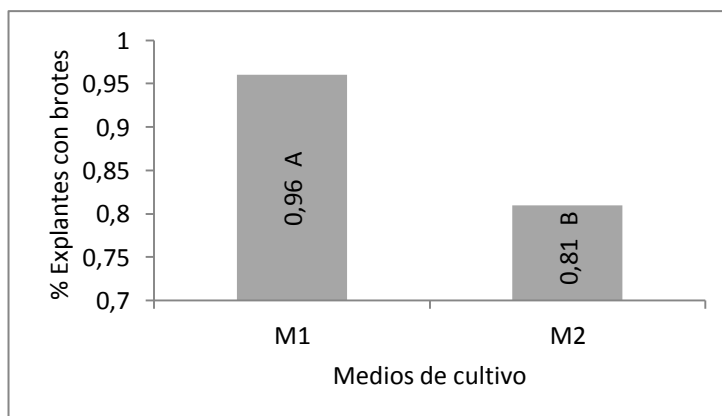


Figura 19. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de cultivo para la variable explantes con brotes a los 30 días de desarrollo de los explantes.

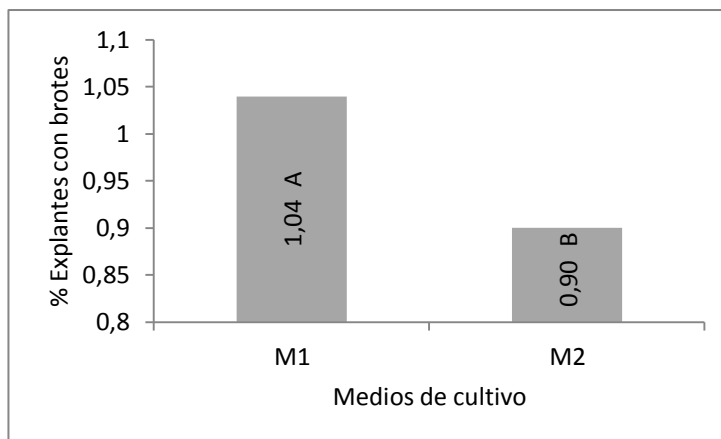


Figura 20. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de cultivo para la variable explantes con brotes a los 45 días de desarrollo de los explantes.

#### 4.1.5 Tasa de multiplicación

La tasa de multiplicación identifica el potencial de una plántula de generar nuevos explantes, es decir la cantidad de explantes y/o brotes que se transfirieron de un subcultivo a otro. En la figura 21 se observa que los valores que presentaron mayor potencial de multiplicación corresponden a los tratamientos T3 y T9 y T13 registrando datos de 3,18 y 2,92 y 2,83 explantes/planta respectivamente.

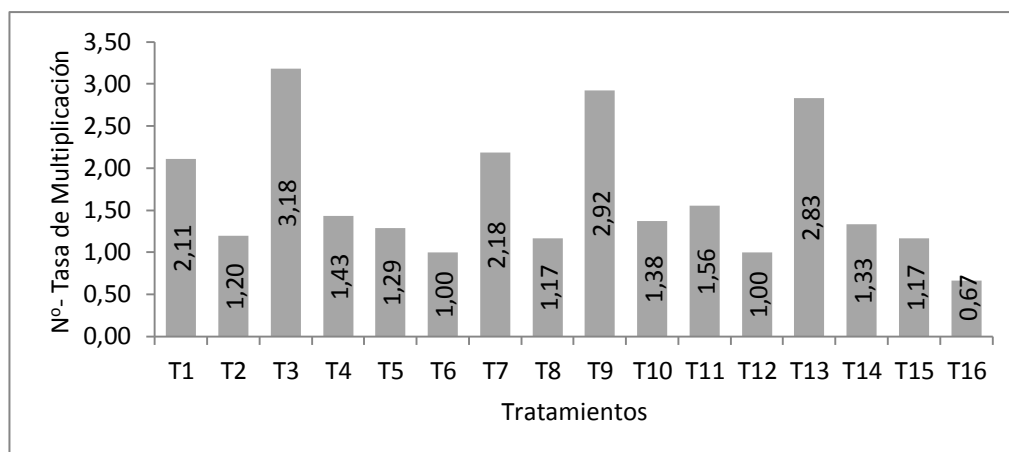


Figura 21. Tasa de multiplicación a los 45 días de crecimiento de los materiales promisorios de tomate de árbol en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*.



El análisis estadístico mediante comparación de medias y la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) indica cuatro grupos diferentes, donde se identifica al T9 como el tratamiento con la mejor tasa de multiplicación pues presenta el mayor valor (A) y al T12, T2, T6 y T16 como los tratamientos con una tasa de multiplicación baja ya que muestran los menores valores (D); resultados que se aprecian en la figura 22.

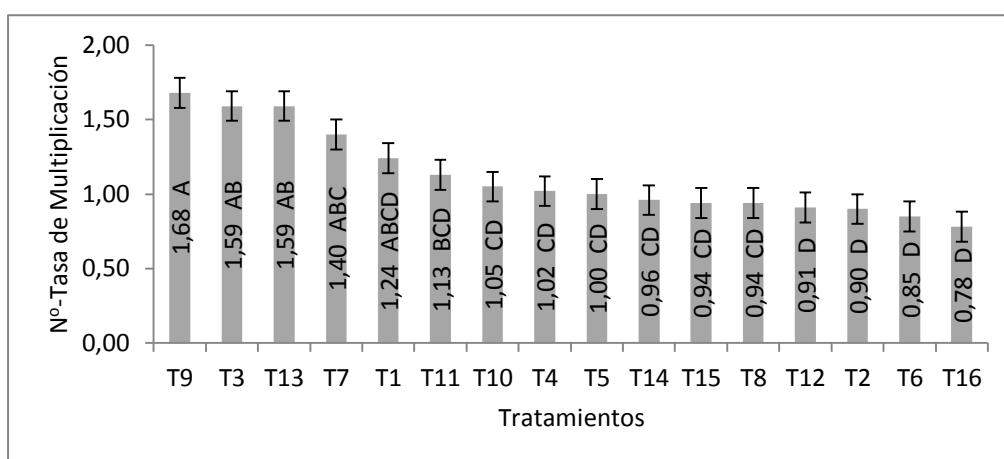


Figura 22. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable tasa de multiplicación a los 45 días de crecimiento de los explantes.

El ADEVA para esta variable (Cuadro 4), indica diferencias estadísticas para la interacción segregante/medio (SxM), por lo tanto es posible realizar el análisis funcional mediante prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), la misma que identifica 4 grupos estadísticamente diferentes donde resalta el segregante S05 que corresponde al material promisorio N<sup>o</sup>.11 cultivado en medio uno (M1) como la mejor interacción en función de la tasa de multiplicación en su apreciación a los 45 días, pues presenta el mayor valor (A), lo contrario ocurre con los segregantes S06, S01, S03 y S08 que corresponden a los materiales promisorios N<sup>o</sup>-14, N<sup>o</sup>-04, N<sup>o</sup>-07 y el testigo respectivamente cultivados en medio dos (M2) como las interacciones con un rango

bajo en cuanto a la tasa de multiplicación en la evaluación a los 45 días, ya que registran el menor valor (D).

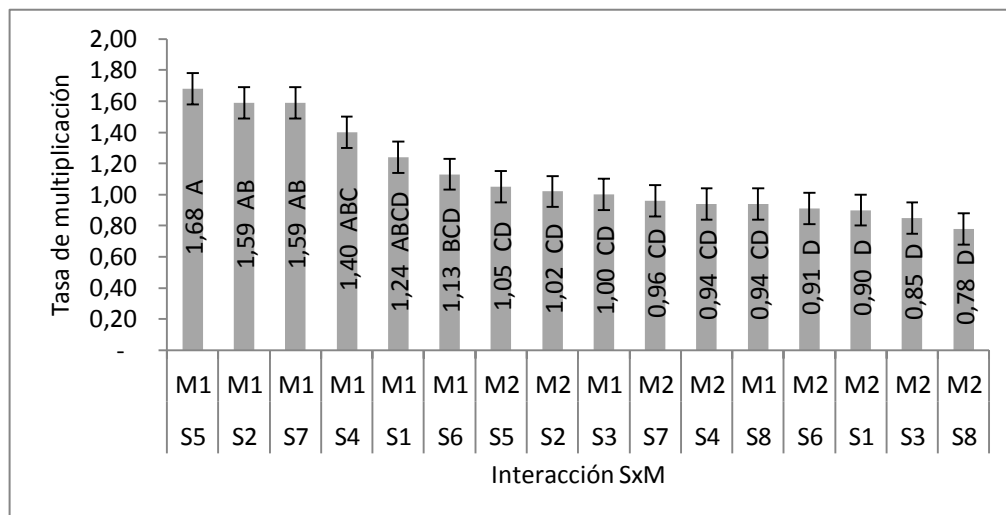


Figura 23. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas para la interacción SxM para la variable tasa de multiplicación a los 45 días de crecimiento de los explante.

#### 4.1.6 Longitud de Explante

Esta variable se obtuvo del promedio de las longitudes de los explantes de cada unidad experimental, a los 30 y 45 días de crecimiento. En el cuadro 9 y figura 24, se indica el tamaño promedio por cada tratamiento, donde los explantes presentan longitudes en un rango de 0,79 cm a 2,82 cm. El mayor tamaño promedio de explantes se presentó en el tratamiento T13 en su apreciación a los 45 días, con un valor de 2,82 cm seguido por el tratamiento T9 con 2,57 y T3 con 2,19 cm; mientras que la longitud de los tratamientos T16 y T6 registran el menor tamaño con valores de 0,85 cm y 0,91 cm respectivamente en su evaluación a los 45 días.

Cuadro 9. Promedio de longitud de explantes a los 30 y 45 días de su introducción en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro* de los materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013

Tratamientos	Descripción	X Long/explantes (cm)	
		30 días	45 días
T1	Segregante N°- 04/Medio 1	1,23	1,51
T2	Segregante N°-04/Medio 2	0,93	1,06
T3	Segregante N°- 06/Medio 1	1,85	2,19
T4	Segregante N°-06/Medio 2	0,98	1,12
T5	Segregante N°- 07Medio 1	0,96	1,07
T6	Segregante N°-07/Medio 2	0,85	0,91
T7	Segregante N°- 09/Medio 1	1,93	2,31
T8	Segregante N°-09/Medio2	0,93	1,07
T9	Segregante N°- 11/Medio 1	2,12	2,57
T10	Segregante N°-11/Medio 2	0,93	1,05
T11	Segregante N°- 14/Medio 1	1,18	1,41
T12	Segregante N°-14/Medio 2	0,86	0,96
T13	Segregante N°- 18/Medio 1	2,41	2,82
T14	Segregante N°-18/Medio 2	0,93	1,07
T15	Segregante Testigo/Medio 1	0,90	1,03
T16	Segregante Testigo/Medio 2	0,79	0,85

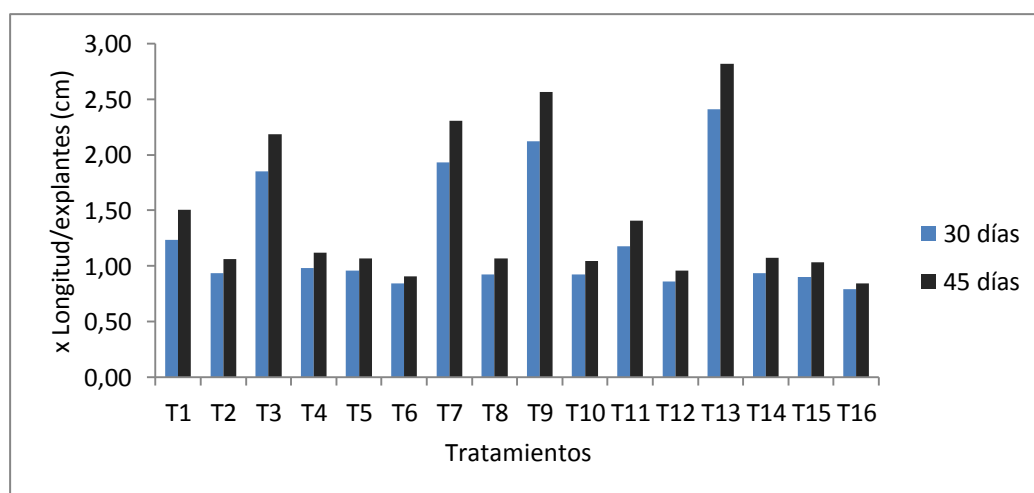


Figura 24. Promedio de longitud de explantes de los materiales promisorios de tomate de árbol en la fase I de establecimiento y multiplicación *in vitro*

El análisis estadístico considerando la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), refleja tres grupos heterogéneos en su evaluación a los 30 días y cuatro grupos diferentes en su apreciación a los 45 días, donde destaca el T9 como el mejor tratamiento tomando en cuenta la longitud promedio de los explantes, el mismo que presenta el mayor valor

(A), a diferencia de los tratamientos que presentan el menor valor (C) a los 30 y (D) a los 45 días, lo que se traduce como los tratamientos con el menor promedio de tamaño de explantes. En la figura 25 y figura 26 se aprecia las medias de los tratamientos en orden descendente.

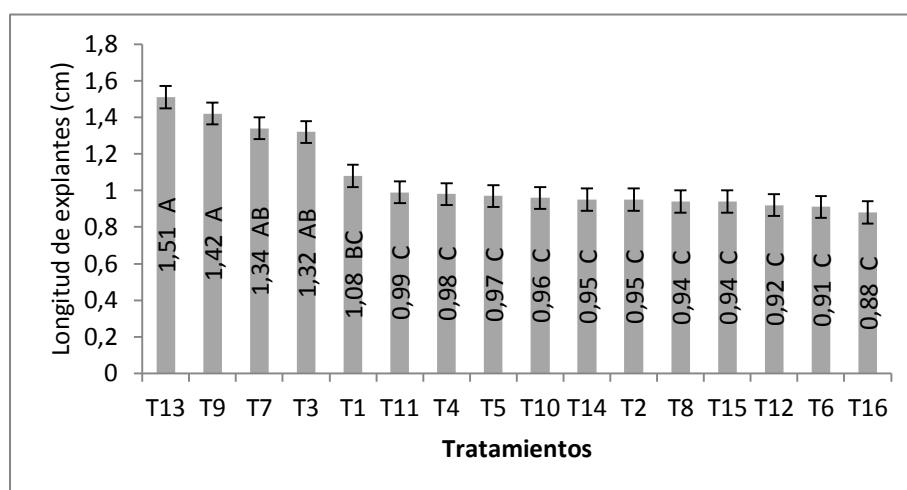


Figura 25. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable longitud de explante a los 30 días de desarrollo.

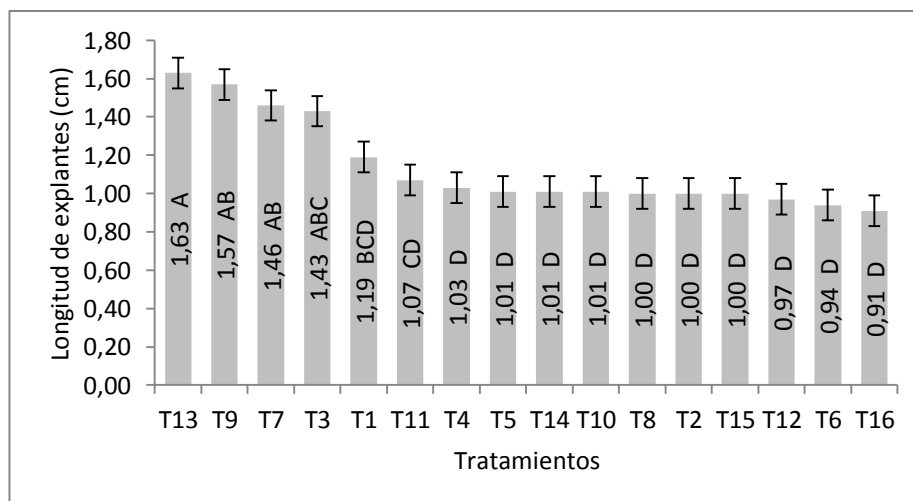


Figura 26. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la longitud de explantes a los 45 días de desarrollo.

El análisis de varianza (Cuadro 4), permite identificar diferencias estadísticas para la interacción segregante/medio (SxM) en la variable longitud de explante, por ello se aplica el análisis funcional mediante prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), el mismo que

demuestra tres grupos estadísticamente diferentes en su evaluación a los 30 días y cuatro grupos heterogéneos en su apreciación a los 45 días, donde se identifica al segregante S07 y S05 que corresponde al material promisorio N<sup>o</sup>-18 y N<sup>o</sup>-11 respectivamente cultivados en medio uno (M1) como la mejor interacción en función de la longitud de explante, pues presenta el mayor valor de (A), a diferencia de los segregantes que presentan el menor valor (C) en la evaluación a los 30 días y (D) en su apreciación a los 45 días, lo que refleja las interacciones con valores bajos considerando el tamaño del explante.

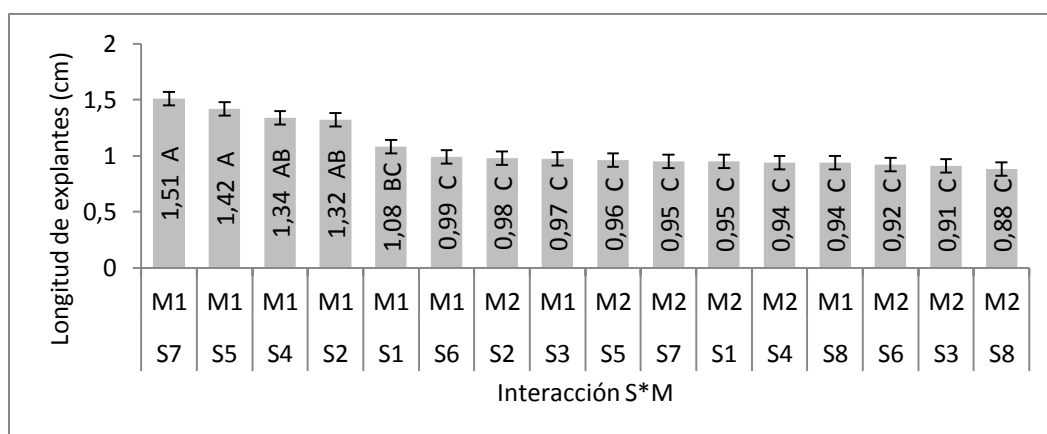


Figura 27. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre la interacción SxM para la variable longitud de explantes a los 30 días de desarrollo.

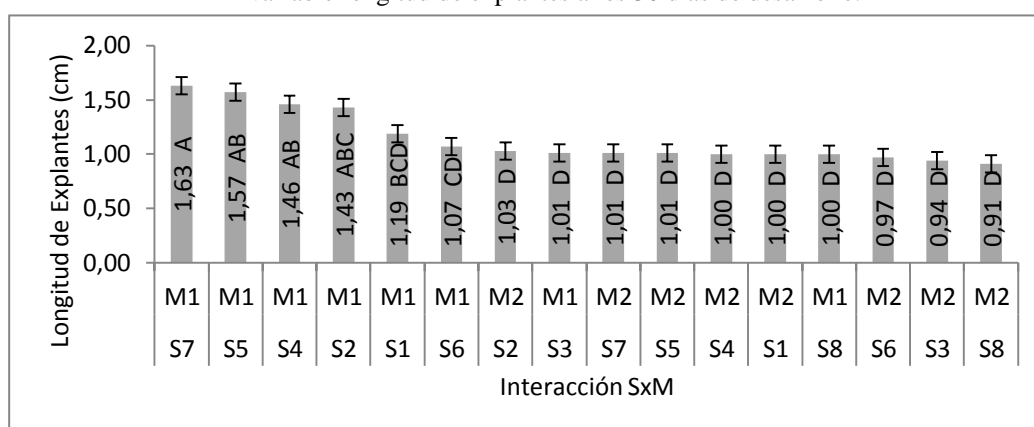


Figura 28. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable longitud de explantes a los 45 días de desarrollo.

#### **4.2 FASE II: Selección de Materiales Promisorios de Tomate de Árbol en función de la Resistencia/Tolerancia a Antracnosis a través de la Inoculación de *Colletotrichum acutatum*.**

La fase II incluyó la evaluación de tres variables y la interacción de los segregantes con el hongo causante de la antracnosis, previo a la inoculación se realizó la identificación molecular de la especie del género *Colletotrichum*, mediante cebadores específicos se determinó que todos los aislamientos correspondieron a la especie *acutatum*. Durante la etapa de inoculación la unidad experimental cambió a un frasco que contenía cuatro explantes de cada segregante incluido el testigo (variedad comercial), la concentración del inóculo de *Colletotrichum acutatum*, se estableció mediante conteo de esporas en la cámara de Neubauer, la misma que corresponde a  $1 \times 10^5$  esporas/ml (Anexo 4). Las variables fueron analizadas mediante comparación de medias, análisis de varianza (ADEVA), y prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) para tratamientos, cabe mencionar que esta fase no hubo análisis factorial por cuanto se dispone de una sola cepa del hongo de las tantas consideradas como causantes de la antracnosis por lo tanto los valores que se presentan corresponden a los tratamientos, es decir la interacción de los segregantes y el testigo con el hongo *Colletotrichum acutatum*.

En el cuadro 10 se muestra un resumen del análisis de varianza (ADEVA), de las variables evaluadas en la fase II, donde se aprecia el valor de los cuadrados medios, el nivel de significancia y el coeficiente de variación para los tratamientos puesto que esta fase no involucra análisis factorial.

Cuadro 10. Cuadros medios y nivel de significancia para las variables evaluadas en la fase II selección de los materiales promisorios. INIAP-2013

Fuentes de Variación	GL	CM		
		Inicio/Síntomas	Inicio/Signos	Incidencia
Tratamientos	7	6,38 **	9,09 **	2,97 **
Error	40	0,55	0,85	0,63
Total	47	1,42	2,08	0,97
CV		10,73%	12,43%	36,96%

#### 4.2.1 Iniciación de síntomas de la antracnosis (días)

Esta variable indica la manifestación en el explante de la enfermedad, es decir los daños que provoca el hongo, en la figura 29 se puede apreciar el promedio de días del apareamiento de los primeros síntomas, donde se puede diferenciar que los tratamientos T5, T6 y T8 presentan el menor promedio, inferior a 6,00 días, es decir corresponde a los segregantes que al interactuar con el hongo se enferman más rápido, a diferencia de los tratamientos T7 y T4 con un promedio superior a 8,00 días donde se percibe un grado de resistencia de los segregantes al tolerar más días la interacción con el hongo.

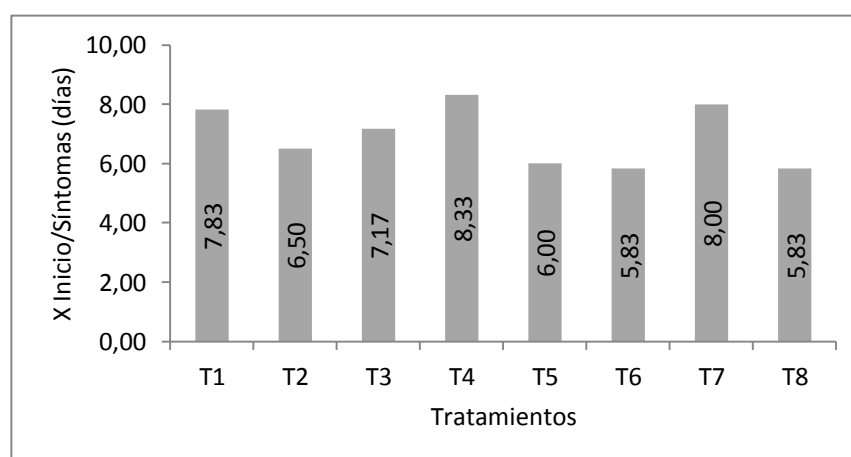


Figura 29. Promedio de días al inicio de los primeros síntomas frente al ataque de *Colletotrichum acutatum*.

El análisis funcional mediante prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) refleja tres grupos estadísticamente diferentes, donde se aprecia al T4 y T7 como los tratamientos con el mayor valor (A), lo que significa que el apareamiento de la sintomatología ocurre en un periodo más largo de tiempo, a diferencia de los tratamientos T5, T8 y T6 que registran los valores más bajos (C), lo que demuestra que los síntomas aparecen de forma más inmediata al momento de la interacción con *Colletotrichum acutatum*.; resultados que se observan en la figura 30.

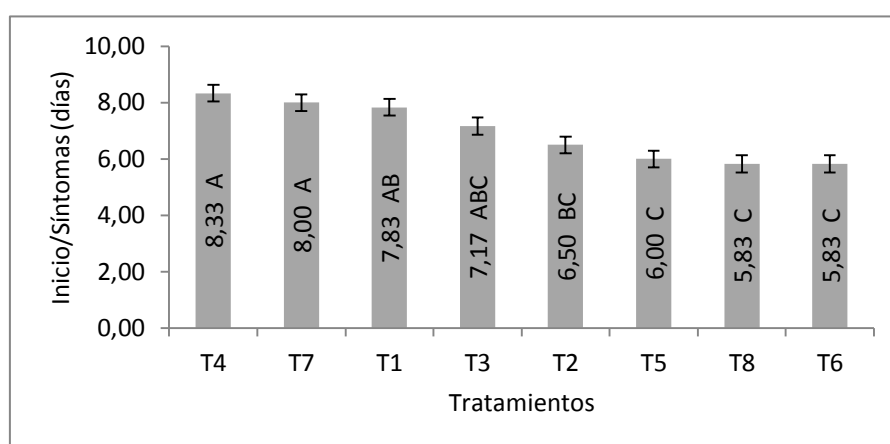


Figura 30. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable inicio de síntomas de la antracnosis.

#### 4.2.2 Iniciación de signos de la antracnosis (días)

Esta variable se refiere a la expresión visible del patógeno, es decir el apareamiento de características del hongo. Se observa en la figura 31 el promedio de días de la presentación de los primeros signos, donde se puede diferenciar a los tratamientos T4, T7 y T1 con los promedios más altos lo que significa que los segregantes responden de mejor manera al ataque del hongo puesto que la manifestación del signo ocurre en mayor tiempo, en tanto T6 y T8 presentan los valores más bajos, lo que demuestra una menor tolerancia por la ocurrencia temprana de los signos.



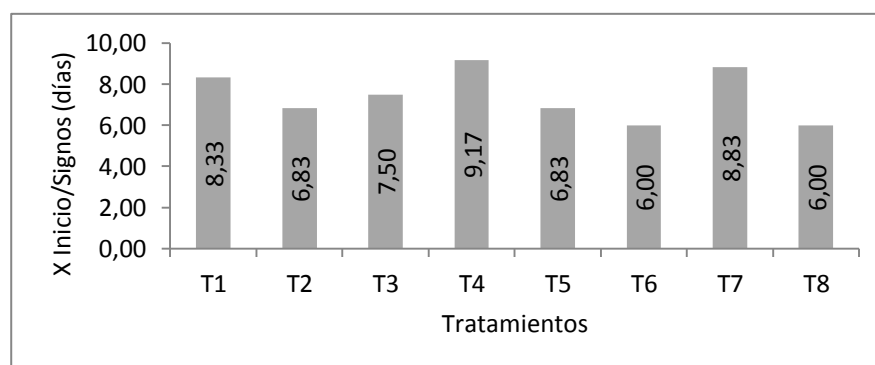


Figura 31. Promedio de días al inicio de los primeros signos frente al ataque de *Colletotrichum acutatum*.

El análisis funcional mediante prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) refleja tres grupos estadísticamente diferentes, donde se diferencia al T4 y T7 como los mejores tratamientos ya que presentan el mayor valor (A), es decir la ocurrencia de los signos de la enfermedad se evidencia en un periodo más largo de tiempo, por el contrario el T6 y T8 se consideran los tratamientos que presentan el menor valor (C), lo que significa que el aparecimiento de los signos ocurre en un tiempo más corto.

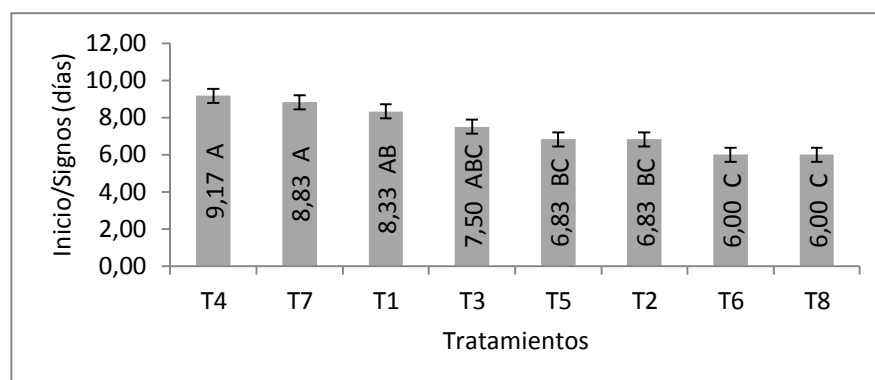


Figura 32. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable inicio de signos de la antracnosis.

#### 4.2.3 Incidencia de la antracnosis

La variable incidencia permite evaluar el número de plantas o partes de la misma que ha sido afectada por la interacción con el hongo, se observa en la figura 32 que

el tratamiento T4 y T7 presentan los valores de 33,33% y 37,50% respectivamente lo que se traduce como los tratamientos con la menor cantidad de explantes infectados, lo que no ocurre con el tratamiento T8 donde se aprecia una alta incidencia con un valor de 87,50% es decir que la mayoría de explantes se infectan al interactuar con el hongo.

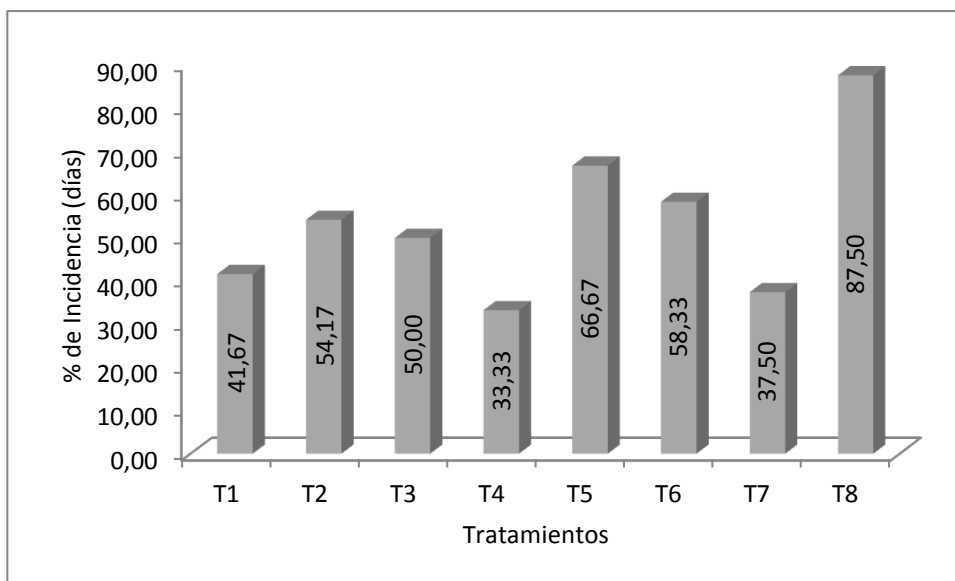


Figura 33. Porcentaje de incidencia de los materiales promisorios de tomate de árbol frente al ataque de *Colletotrichum acutatum*.

El análisis estadístico mediante comparación de medios y la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), refleja dos grupos estadísticamente diferentes, donde resalta el T8 con el mayor valor (A), esto demuestra que es el tratamiento con el nivel más alto de incidencia, a diferencia de T3, T1, T7 y T4 que presentan valores bajos (B), es decir representan los tratamientos donde la incidencia del ataque de *Colletotrichum acutatum* se aprecia en un nivel inferior. En la figura 34 se observa en forma descendente los tratamientos considerando el nivel de incidencia que presentaron.

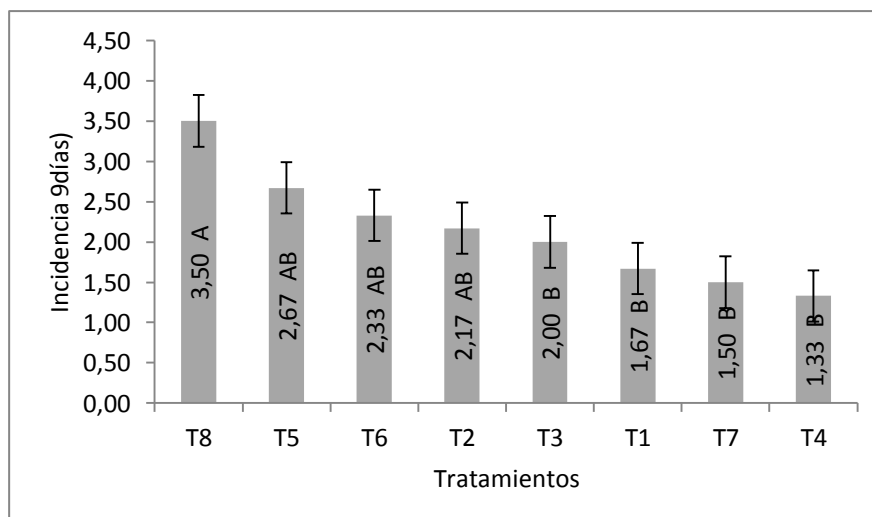


Figura 34. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable incidencia de la antracnosis

El análisis estadístico para la fase II involucró la evaluación de la interacción de los explantes frente al ataque de *Colletotrichum acutatum*., de acuerdo con la escala de clasificación definida por Granados (1998), que se detalla en el Anexo 3.

Se definió dos lecturas de la interacción explante/patógeno a los 8 y 12 días de haber sido inoculados los segregantes, mediante una apreciación visual y considerando las recomendaciones de la escala de clasificación se estableció los materiales promisorios con un grado de resistencia y tolerancia, así como los segregantes susceptibles. En el cuadro 11 se aprecia los porcentajes de cada uno de los materiales promisorios incluyendo el testigo, donde resalta el segregante N°.09 como el material promisorio con el mayor grado de resistencia registrando un valor de 54,17 de resistencia tanto en la apreciación a los 8 y 12 días, este valor indica que a pesar de que varios explantes registraron susceptibilidad es un material con potencial de resistir al ataque de *Colletotrichum acutatum*., en comparación con el testigo donde se aprecia una resistencia nula. Dentro de los materiales promisorios

destaca también el segregante N°.18 que registra una resistencia de 45,83% y 41,67% en su evaluación a los 8 y 12 días respectivamente, estos valores son considerados altos en comparación con el testigo y con otros segregantes que presentan valores altos de susceptibilidad tal es el caso de los segregantes N°-06, N°-11 y N°-14 que registran valores superiores de 50% de explantes susceptibles, resultados que se observan en los cuadros 11 y 12 y las figuras 35 y 36.

Cuadro 11. Porcentajes de resistencia, tolerancia y susceptibilidad a la interacción de los segregantes con *Colletotrichum acutatum* a los 8 días. INIAP-2013

Materiales Promisorios	Tratamientos	Resistente	Tolerante	Susceptible
Segregante N°- 04	T1	33,33%	41,67%	25,00%
Segregante N°- 06	T2	20,83%	29,17%	50,00%
Segregante N°-07	T3	29,17%	45,83%	25,00%
Segregante N°-09	T4	54,17%	25,00%	20,83%
Segregante N°-11	T5	29,17%	37,50%	33,33%
Segregante N°-14	T6	25,00%	33,33%	41,67%
Segregante N°-18	T7	45,83%	33,34%	20,83%
TESTIGO	T8	4,17%	16,66%	79,17%

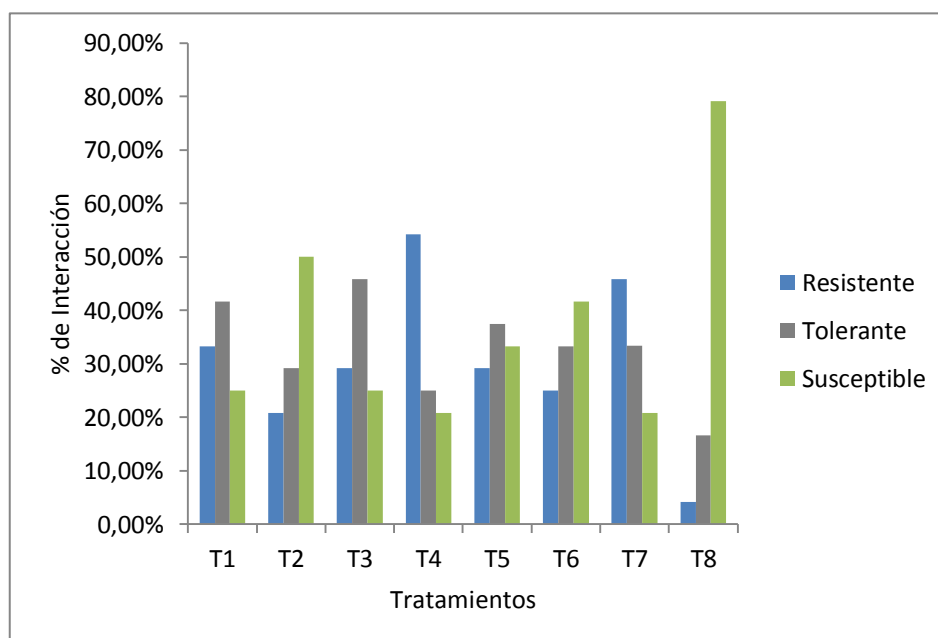


Figura 35. Porcentaje de interacción de los materiales promisorios de tomate de árbol frente al ataque de *Colletotrichum acutatum* a los 8 días

Cuadro 12. Porcentajes de resistencia, tolerancia y susceptibilidad a la interacción de los segregantes con *Colletotrichum acutatum* a los 12 días. INIAP-2013

Materiales Promisorios	Tratamientos	Resistente	Tolerante	Susceptible
Segregante N°- 04	T1	29,17%	41,67%	29,17%
Segregante N°- 06	T2	16,67%	33,33%	50,00%
Segregante N°-07	T3	20,83%	50,00%	29,17%
Segregante N°-09	T4	54,17%	20,83%	25,00%
Segregante N°-11	T5	12,50%	25,00%	62,50%
Segregante N°-14	T6	16,67%	29,17%	54,16%
Segregante N°-18	T7	41,67%	25,00%	33,33%
TESTIGO	T8	0,00%	16,66%	83,34%

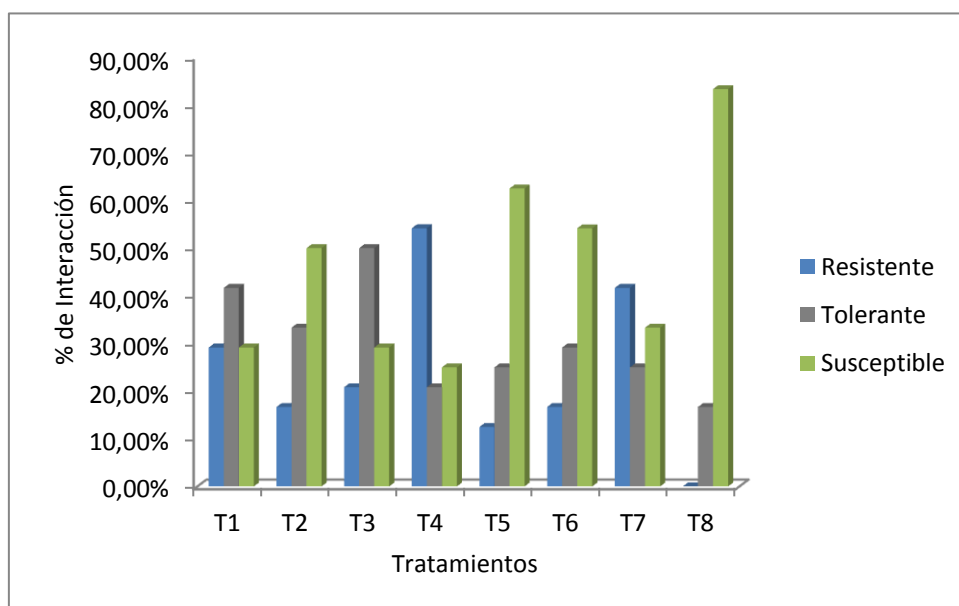


Figura 36. Porcentaje de interacción de los materiales promisorios de tomate de árbol frente al ataque de *Colletotrichum acutatum* a los 12 días.

### 4.3 FASE III: Inducción de Raíces en Materiales Promisorios de Tomate de Árbol, Seleccionados en función de su Resistencia/Tolerancia a *Colletotrichum acutatum*.

En la etapa de enraizamiento *in vitro*, se evaluó los explantes con emisión de raíz, el número de raíces y el tamaño de la raíz expresada en centímetros a los 30 y 45 días de la siembra en medio de enraizamiento, los materiales promisorios evaluados en

esta fase corresponden a los segregantes N<sup>o</sup>-09 y N<sup>o</sup>-18 seleccionados en función de sus características de resistencia/tolerancia al ataque de *Colletotrichum acutatum*. Para el análisis estadístico de las variables se efectuó análisis de varianza (ADEVA), comparaciones de medias con gráficos demostrativos, la prueba de Tukey para tratamientos y DMS para, segregantes, medios de enraizamiento e interacción (SxE), cuando se presentó diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0,05$ ). Para el análisis de varianza, las variables fueron transformadas al no ajustarse a la normalidad ya que ciertos valores fueron identificados con un valor de cero (0), se utilizó la fórmula  $\sqrt{x + 0,5}$ , donde x es el valor asignado a cada variable. En el cuadro 13 se presenta un resumen del análisis de varianza (ADEVA) de cada una de las variables evaluadas en la Fase III de enraizamiento *in vitro*, donde se observa los valores de cuadrados medios, el nivel de significancia y el coeficiente de variación para tratamientos y factores en estudio con su respectiva interacción. El análisis de varianza, refleja que no existen diferencias significativas en cuanto a los segregantes evaluados, por lo tanto no se consideran influyentes en la etapa de enraizamiento.

Cuadro 13. Cuadrados medios y nivel de significancia para las variables evaluadas en la fase III. Inducción de raíces en materiales promisorios. INIAP-2013

Fuentes de variación	GL	CM				
		Brotos con raíz		# de raíces		Longitud de raíz
		30 días	45 días	30 días	45 días	45 días
Tratamientos	3	0,22 *	0,19 *	2,29 **	4,26 **	2,72 **
Segregantes (S)	1	0,06 ns	0,11 ns	1,00 ns	2,48 ns	1,96 *
Medios (E)	1	0,54 **	0,43 *	5,03 **	9,30 **	5,34 **
SxE	1	0,06 ns	0,03 ns	0,85 ns	1,00 ns	0,85 ns
Error	36	0,05	0,06	0,40	0,84	0,40
Total	39	0,06	0,06	0,54	1,10	0,58
CV		24,76%	24,31%	23,14%	21,29%	22,55%

### 4.3.1 Explantes con emisión de raíz

Esta variable se determinó mediante contabilización de los explantes con presencia de raíz en cada tratamiento a los 30 y 45 días de la siembra, en el cuadro 14 y figura 37 se presenta el porcentaje de enraizamiento en cada uno de los tratamientos, se identificó que los brotes a los 30 días mostraron del 10% al 70% donde el tratamiento T4 presentó el porcentaje más alto. La presencia de raíz en las plántulas mostró un incremento a valores de 30% a 90% a los 45 días de cultivo, donde se mantiene la superioridad del tratamiento T4 a diferencia de los tratamientos T1 y T3 que presentan los valores más bajos en cuanto al grado de enraizamiento.

Cuadro 14. Porcentaje de explantes con emisión de raíz a los 30 y 45 días de desarrollo en la fase III de inducción de raíces en materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013

Tratamientos	Descripción	% de explantes con raíz	
		30 Días	45 Días
T1	Segregante N°-09/Medio M&S básico	10%	30%
T2	Segregante N°-09/Medio M&S vitaminas	40%	60%
T3	Segregante N°-18/Medio M&S básico	10%	40%
T4	Segregante N°-18/Medio M&S vitaminas	70%	90%

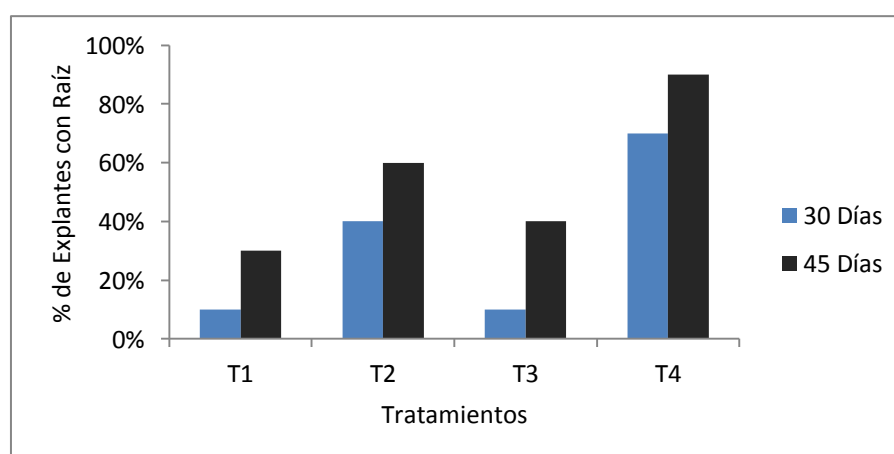


Figura 37. Porcentaje de explantes con emisión de raíz a los 30 y 45 días de desarrollo dentro de la fase III de emisión de raíces en los materiales promisorios de tomate de árbol.

La comparación de medias y la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), demuestra dos grupos estadísticamente diferentes en la presencia de raíz, donde T4 presenta el mayor valor (A), lo que se traduce en el tratamiento con mayor emisión de raíz tanto a los 30 y 45 días de evaluación. En la figura 38 y 39 se presenta los grupos estadísticos en orden descendente de acuerdo al nivel de emisión de raíz en los periodos comprendidos entre los 30 y 45 días de desarrollo.

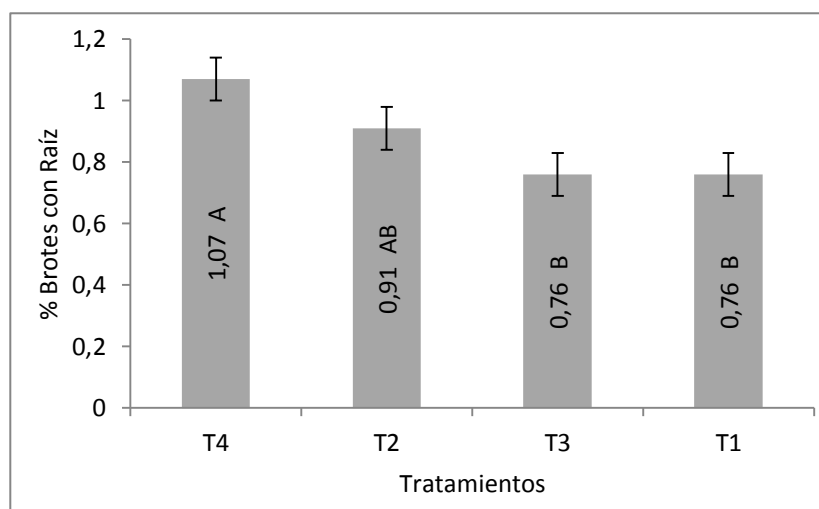


Figura 38. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes con emisión de raíz a los 30 días de crecimiento de los explantes.

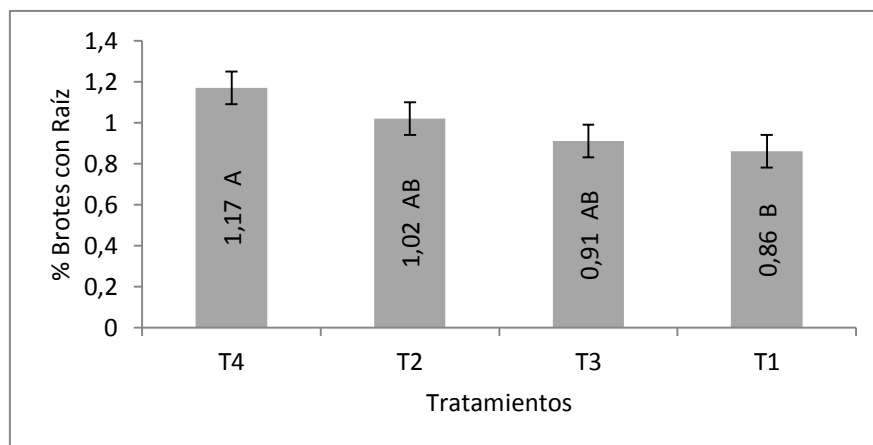


Figura 39. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable explantes con emisión de raíz a los 45 días de crecimiento de los explantes.



La prueba de DMS aplicada para medios de enraizamiento determina el medio dos (E2) como el mejor en relación al nivel de explantes con emisión de raíz tanto en la apreciación a los 30 y 45 días de crecimiento, resultados que se observan en la figura 40 y 41.

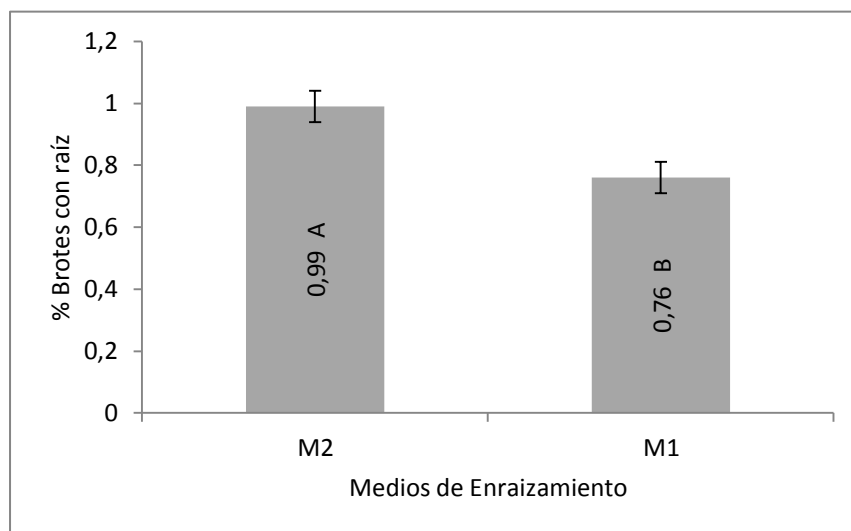


Figura 40. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de enraizamiento para la variable explantes con emisión de raíz a los 30 días de desarrollo.

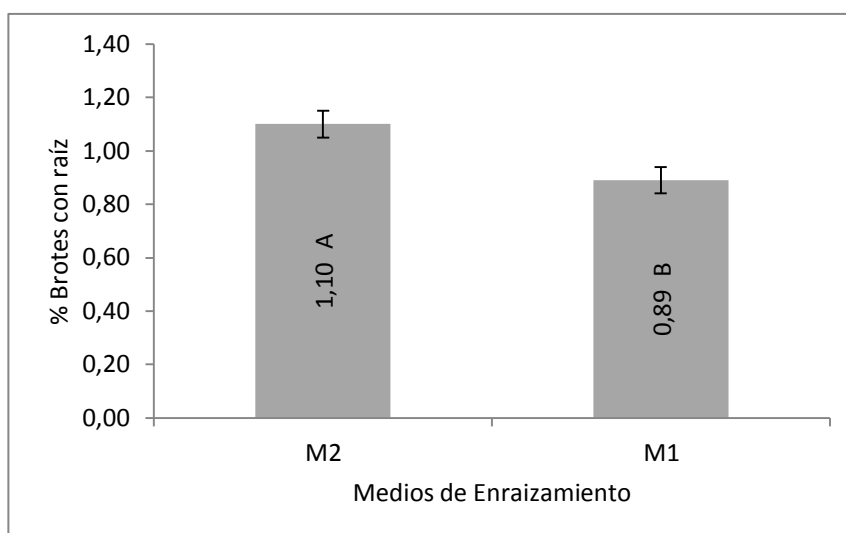


Figura 41. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de enraizamiento para la variable explantes con emisión de raíz a los 45 días de desarrollo.

### 4.3.2 Número de raíces

Dentro de la evaluación del potencial de enraizamiento, se contabilizó el número de raíces que emitieron las plántulas que presentaron raíz, a los 30 y 45 días de desarrollo. Mediante el análisis estadístico de los datos experimentales, se encontró que el tratamiento T4 a los 30 y 45 días presentó el mayor número de raíces; resultados que se aprecian en el Cuadro 15 y Figura 42

Cuadro 15. Promedio del número de raíces de explantes a los 30 y 45 días de desarrollo en la fase III de inducción de raíces en materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP-2013

Tratamientos	Descripción	Promedio Número de raíces	
		30 Días	45 Días
T1	Segregante N <sup>o</sup> -09/Medio M&S básico	3,00	5,33,
T2	Segregante N <sup>o</sup> -09/Medio M&S vitaminas	3,75	6,50
T3	Segregante N <sup>o</sup> -18/Medio M&S básico	4,00	5,50
T4	Segregante N <sup>o</sup> -18/Medio M&S vitaminas	5,14	8,22

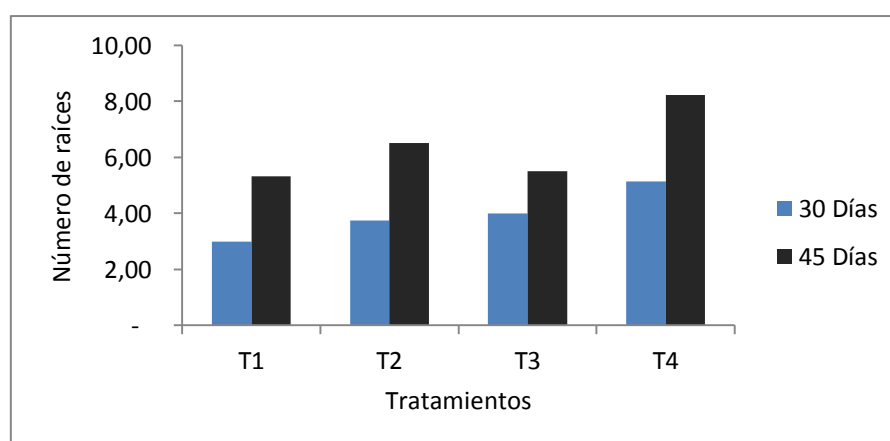


Figura 42. Promedio del número de raíces de explantes a los 30 y 45 días de desarrollo dentro de la fase III de emisión de raíces en los materiales promisorios de tomate de árbol.

Mediante prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), se aprecia dos grupos heterogéneos en cuanto al número de raíces que presentan los explantes, destaca el tratamiento T4 pues presentó el mayor valor (A) en su apreciación a los 30 y 45 días, en la figura 43

y 44 se observa los grupos estadísticos en orden descendente en base al mayor promedio de número de raíces en las evaluaciones a los 30 y 45 días de crecimiento.

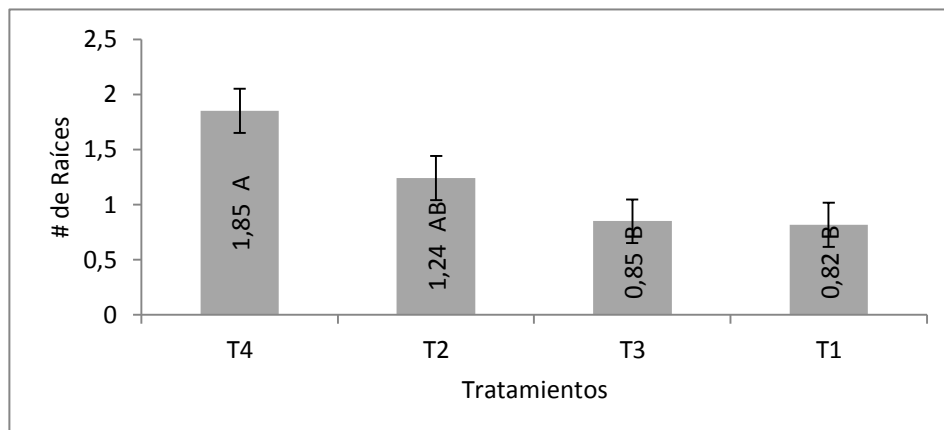


Figura 43. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable número de raíces a los 30 días de crecimiento de los explantes.

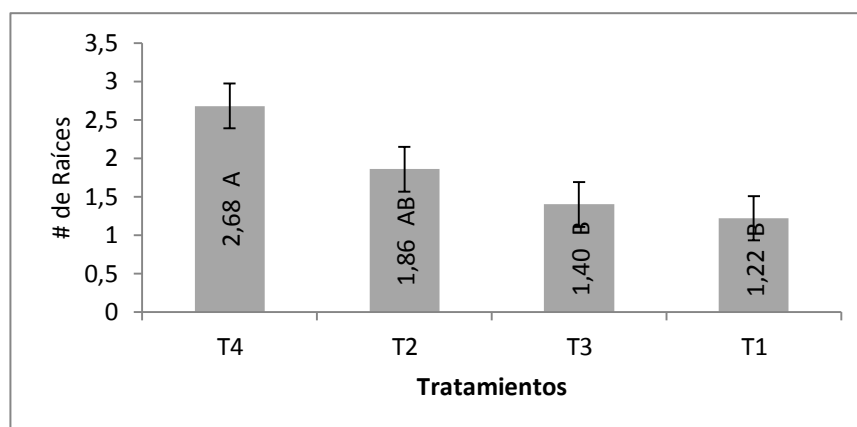


Figura 44. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable número de raíces a los 45 días de crecimiento de los explantes.

El ADEVA (Cuadro 13), indica diferencias estadísticas significativas en cuanto a medios de enraizamiento se refiere, por lo tanto es aplicativa la prueba de DMS, la misma que demuestra al medio dos (E2) como referente en cuanto al número de raíces que presentan los explantes, estos resultados se aprecian en la figura 45 y 46.

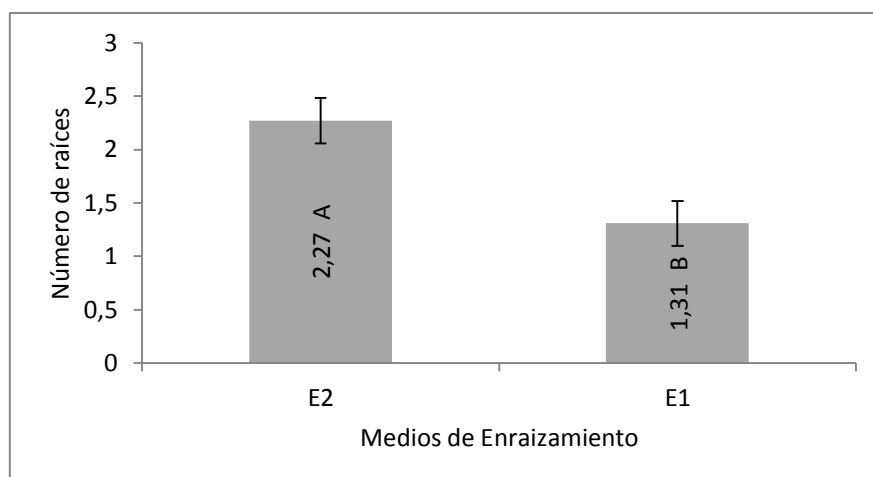


Figura 45. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de enraizamiento para la variable número de raíces a los 30 días de desarrollo.

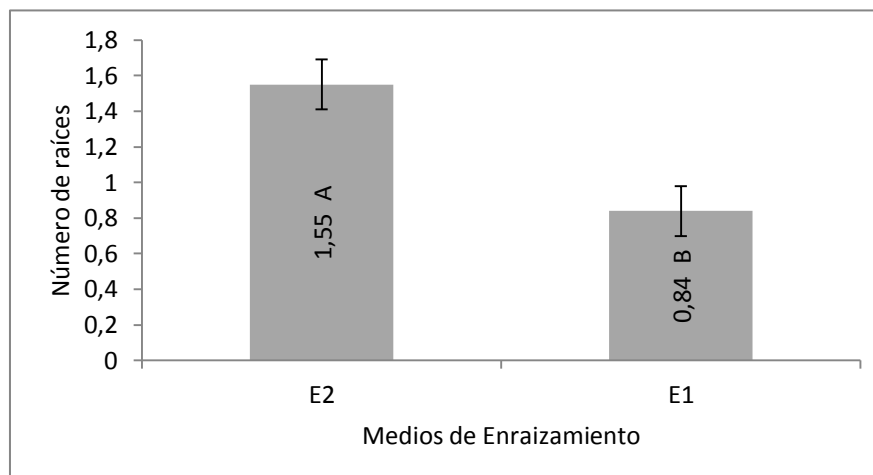


Figura 46. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de enraizamiento para la variable número de raíces a los 45 días de desarrollo.

### 4.3.3 Longitud de raíz (cm)

Esta variable permite identificar el tamaño de la raíz principal de cada explante, la longitud promedio de la raíz de cada tratamiento se presenta en el cuadro 16 y figura 47, donde se observa que a los 45 días de desarrollo el tratamiento T4 obtuvo un promedio de longitud de 5,33 cm de raíz, valor superior a los tratamientos T2, T3 y T1 que registran medidas de 3,55 cm, 3,28 cm y 3,0 cm de raíz respectivamente.

Cuadro 16. Promedio de longitud de raíz a los 45 días de desarrollo en la fase III de inducción de raíces en materiales promisorios de tomate de árbol. INIAP 2013

Tratamientos	Descripción	Promedio Long./Raíz
		45 Días
T1	Segregante N°-09/Medio M&S básico	3,00
T2	Segregante N°-09/Medio M&S vitaminas	3,55
T3	Segregante N°-18/Medio M&S básico	3,28
T4	Segregante N°-18/Medio M&S vitaminas	5,33

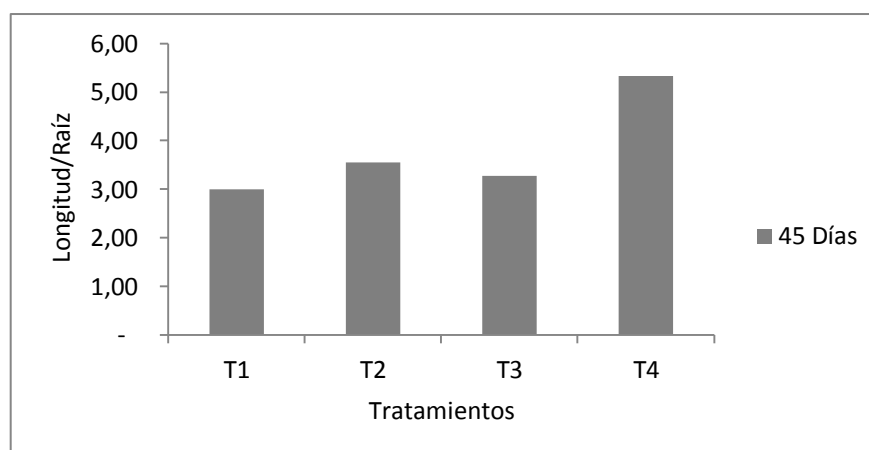


Figura 47. Promedio de longitud de raíz los 30 y 45 días de desarrollo dentro de la fase III de emisión de raíces en los materiales promisorios.

El análisis estadístico mediante comparación de medias y prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ), refleja dos grupos estadísticamente diferentes, donde resalta el tratamiento T4 ya que presentó el mayor valor (A), a los 45 días de crecimiento, en la figura 48 se aprecia los grupos estadísticos en orden descendente de acuerdo al mayor promedio de longitud de raíz en su evaluación a los 45 días.

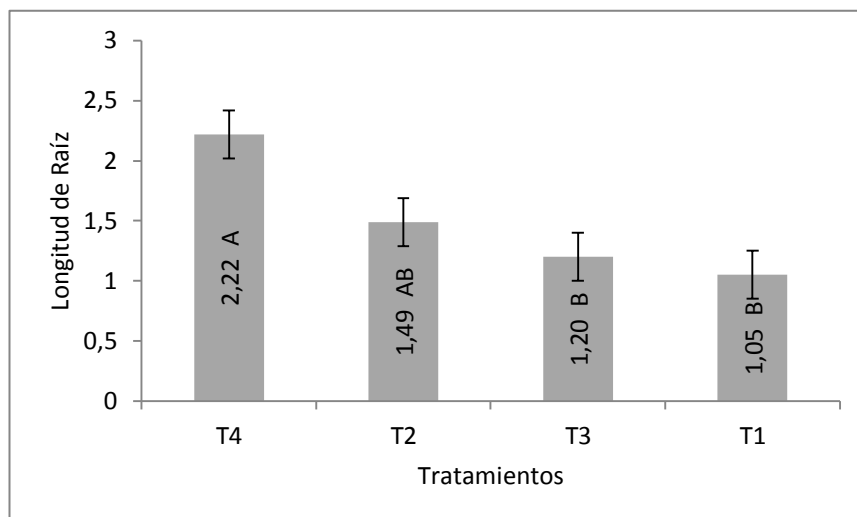


Figura 48. Representación de la prueba de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los tratamientos para la variable longitud de raíz a los 45 días de crecimiento de los explantes.

El análisis de varianza (Cuadro 13), indica diferencias estadísticas en el factor segregantes para la variable longitud de raíz, por lo tanto mediante DMS ( $\alpha=0,05$ ), se identifica a S2 que corresponde al segregante N<sup>o</sup>.18 como el material promisorio con mejores características en cuanto al tamaño de raíz, pues presenta el mayor valor (A) en su apreciación a los 45 días, resultados que se observan en la figura 49.

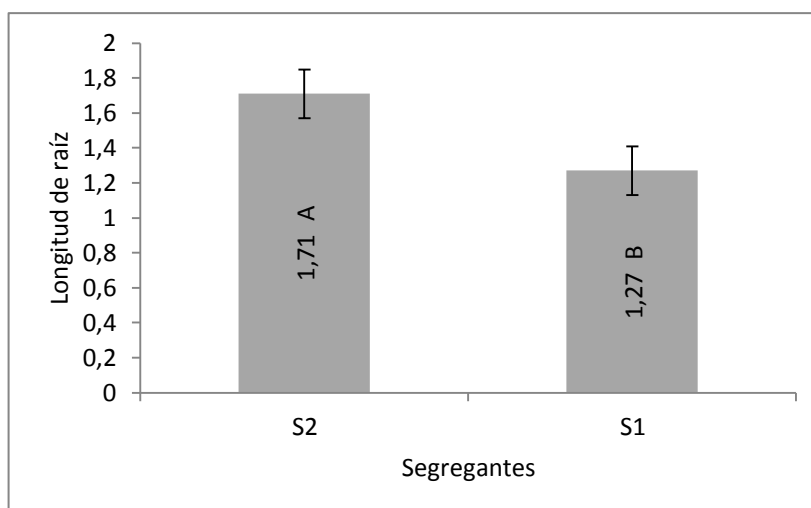


Figura 49. Representación de la prueba de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los segregantes para la variable longitud de raíz a los 45 días de crecimiento de los explantes.

Las diferencias estadísticas expresadas en el ADEVA (Cuadro 13), permiten analizar el factor medios de enraizamiento mediante DMS, la prueba resalta al medio dos (E2) como el medio con mayor potencial en cuanto al tamaño de raíz; resultados que se aprecian en la figura 50.

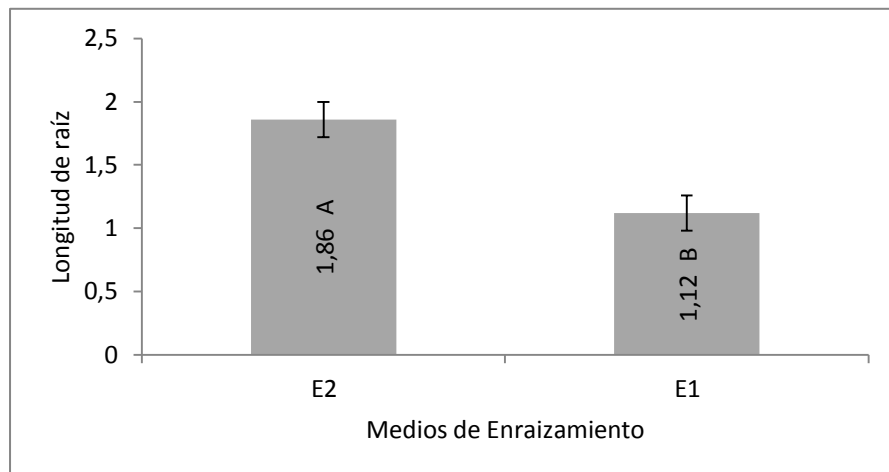


Figura 50. Representación de DMS ( $\alpha=0,05$ ). Valores de las medias obtenidas y diferencias estadísticas entre los medios de enraizamiento para la variable longitud de raíz a los 45 días de desarrollo.

## **IV. DISCUSIÓN**

### **5.1 FASE I Establecimiento y Multiplicación *in vitro* de Materiales Promisorios de Tomate de Árbol a través Cultivo de Tejidos.**

#### **5.1.1 Necrosis/Oxidación**

El tomate de árbol es una especie muy propensa a la oxidación, por ello se aprecia que todos los materiales evaluados presentaron un porcentaje variable de necrosis/oxidación (Cuadro 5), los factores que desencadenan la oxidación de los explantes están relacionadas al tipo de material vegetal utilizado, siendo evidente que los explantes provenientes de yemas jóvenes son más tolerantes a la necrosis/oxidación, además influye directamente el efecto abrasivo y tiempo desinfección del agente desinfectante, pues se aprecia la secreción de fenoles al colocar los explantes en la solución de cloro, condición que puede ser mitigada al realizar un enjuague final con agua destilada estéril con ácido ascórbico.

#### **5.1.2 Contaminación**

Los explantes de los materiales promisorios se obtuvieron bajo condiciones de invernadero a diferencia del material testigo que proviene de una plantación en producción, se aprecia una mayor contaminación en el material testigo. En varios tratamientos la contaminación es mayor en la evaluación final a los 30 días, contaminación que podría estar relacionada por la presencia de hongos y/o bacterias endógenas adquiridas por la planta en su medio natural, ya que los microorganismos endógenos no son eliminados por desinfección superficial, a causa de no estar expuestos a las sustancias desinfectantes.



### **5.1.3 Explantes vivos**

Los tratamientos con los menores porcentajes de necrosis/oxidación y contaminación presentan el mayor grado de sobrevivencia por la estrecha relación existente entre estas variables. En el caso del tomate de árbol la oxidación desaparece a las cuatro semanas de cultivo y en casos aislados ocurre el aparecimiento de contaminación a causa de microorganismos endógenos que pueden competir ventajosamente con el explante por el medio de cultivo, ya que generalmente su crecimiento es más rápido y pueden producir metabolitos tóxicos para los explantes, donde finalmente mueren, por ello se aprecia una mínima diferencia en la sobrevivencia a los 30 y 45 días.

### **5.1.4 Explantes con brotes**

La sobrevivencia de explantes es el precedente al aparecimiento de brotes, variable que depende de la concentración de los reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo de la investigación, es evidente que los tratamientos con resultados favorables en cuanto a la emisión de brotes ocurren en el medio uno (M1), donde se manejan menores concentraciones hormonales. La causa de los resultados desfavorables en el medio dos (M2), ocurre por una saturación hormonal, pues investigaciones anteriores afirman que altas concentraciones de citoquininas en el medio de iniciación y de multiplicación, pueden inhibir la brotación, por ende se pueden apreciar los valores más bajos en cuanto explantes con presencia de brotes, se asume también que mayor concentración de BAP inhibe la emisión de brotes, (Seeni y Latha 1992), además Obando y Jordán (2001), reportan que explantes de tomate de árbol subcultivados en presencia de ANA (Ácido

Naftalenacético), BA (Benzilidenina) y AG3 (Ácido Giberélico) iniciaron la formación de raíces luego de cuatro semanas.

### 5.1.5 Tasa de multiplicación

El desarrollo de nuevos brotes se produjo a partir de las yemas axilares presentes en los explantes, observándose que el mayor número promedio de brotes ocurrió con los segregantes que presentan mejores características de adaptación a condiciones *in vitro* y que fueron cultivados en el medio uno (M1). Estudios reportados en especies forestales afirman que el suplemento de citoquininas en el medio favorece el incremento significativo del número de brotes. Castro *et al* (2002), reportaron que la mayor tasa de multiplicación en teca se obtuvo cuando los explantes provenientes de meristemas apicales fueron cultivados en un medio M&S suplementado con BAP, otros reportes indican que la combinación de citoquininas y auxinas tiene efectos favorables en la multiplicación de algunas especies. Tiwari *et al.* (2002), observaron la mayor tasa de multiplicación en teca cultivando explantes en medio M&S suplementado con BAP y AIA lo contrario ocurre en la investigación donde el medio dos (M2) que contiene una mezcla de una citoquinina y una auxina presenta los valores más bajos de multiplicación, (la razón recae en que la alta concentración de hormonas inhibe la emisión de brotes). Es importante mencionar que la tasa de multiplicación en los segregantes de tomate de árbol se incrementa en los sucesivos subcultivos, por lo que se considera una especie de alto potencial de multiplicación *in vitro*.

### **Longitud de explante**

La longitud del explante garantiza la capacidad de proliferar y es proporcional a la emisión de brotes, pues explantes con mayor longitud mayor cantidad de brotes. El biorregulador BAP origina mayor elongación de los explantes de tomate de árbol desarrollados *in vitro*, cualidad que permite ratificar que los segregantes cultivados en el medio uno (M1) registran los valores más altos del promedio de longitud de explante, a diferencia del medio dos (M2) donde los segregantes presentan un promedio bajo de longitud, condición que se atribuye a la saturación hormonal pues se ha determinado que la especie *Solanum betaceum* posee auxinas endógenas (ANA).

#### **5.2 FASE II: Selección de materiales promisorios de tomate de árbol en función de la resistencia/tolerancia a antracnosis a través de la inoculación de *Colletotrichum acutatum*.**

Uno de los objetivos de éste estudio fue determinar el efecto fitotóxico de la inoculación de filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum*, para su posterior uso como agente de selección, con el fin de obtener material resistente/tolerante a la antracnosis, Uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en el tomate de árbol es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum spp*, y se reporta tradicionalmente a *Colletotrichum gloesporioides.*, como el causante de la enfermedad (CORPOICA, 2001), sin embargo Patiño *et al.*, (2007) reporta a *Colletotrichum acutatum*, como el agente causal de la antracnosis, en base a estos fundamentos en la presente investigación se realizó una identificación para

determinar las especies del género *Colletotrichum* existentes en la zona de influencia, teniendo en cuenta que los métodos tradicionales de identificación han sido poco satisfactorios para la diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum*, las técnicas moleculares se están utilizando para este propósito; es así que actualmente se ha determinado la secuencia de nucleótidos de la región ITS1 de varias especies de *Colletotrichum* para construir cebadores específicos que utilizados con el cebador de secuencia conservada ITS4 amplifican por PCR determinados segmentos de ADN, y permiten diferenciar especies del complejo *Colletotrichum* (Adaskaveg y Hartin, 1997), con estos antecedentes se evaluó mediante técnicas moleculares los aislamientos del hongo causante de la antracnosis llegando a identificar un solo grupo o especie que corresponde a *Colletotrichum acutatum*. En la presente investigación se evaluó siete materiales promisorios de tomate de árbol producto de cruzamientos interespecíficos entre *Solanum betaceum*., por *Cyphomandra uniloba*., y *Cyphomandra materna* por *Solanum betaceum* obteniendo dos materiales con fuentes de resistencia y dos materiales con un nivel de tolerancia aceptable, lo que demuestra que los segregantes evaluados son portadores de ciertas características de resistencia/tolerancia de las especies silvestres resistentes.

### **5.2.1 Iniciación de síntomas de la antracnosis (días)**

Los síntomas en las hojas desarrollan pequeñas lesiones y en la medida que se expanden se forman unos anillos de forma concéntrica de color pardo oscuro y bordes definidos, no se tiene reportes sobre de investigaciones anteriores en cuanto a la evaluación de la sintomatología de la antracnosis bajo condiciones de selección *in vitro*, sin embargo Patiño, (2010) menciona que los hongos del género

*Colletotrichum* en cultivo *in vitro* producen metabolitos de bajo peso molecular con propiedades fitóxicas, que provocan en la planta síntomas similares a los causados por el hongo *in vivo*. En la investigación se aprecia que el aparecimiento de los primeros síntomas ocurre a partir del quinto día, los primeros síntomas se aprecian en las hojas que fueron inoculadas y posteriormente se acentúan en el resto del explante, es importante mencionar que todos los segregantes presentan sintomatología la diferencia es que en los materiales resistentes/tolerantes el ataque del hongo no es tan severo como en los materiales susceptibles.

### **5.2.2 Iniciación de signos de la antracnosis (días)**

En esta variable se evidencia la expresión visible de las características propias de *Colletotrichum acutatum*. Patiño *et al.*, (2007) reportan que los signos y síntomas asociados a la enfermedad permiten suponer la acción de metabolitos fitóxicos en la interacción *Colletotrichum acutatum* - planta., de los cuales han sido identificados enzimas tipo pectinasas, y ácido indolacético, sustancias que son agentes de patogenicidad primarios. Los primeros signos se reportan al quinto y/o sexto día, característica que se evalúa con el aparecimiento de un micelio de color gris oscuro alrededor de las hojas donde se realizó la inoculación, es evidente que en los tratamientos T4 y T7 que presentan características de resistencia la presencia del micelio ocurre con menor agresividad, lo contrario pasa con los tratamiento T6 y T8 que presentan características de susceptibilidad y donde se observa que el micelio coloniza gran parte del explante.

### 5.2.3 Incidencia de la antracnosis

El tomate de árbol es susceptible al patógeno causante de la antracnosis, por ello se aprecia que todos materiales promisorios presentan un porcentaje de incidencia, lo que demuestra que los segregantes se enferman pero en menor o mayor grado. Con relación a la diferencia en grado de incidencia del patógeno el presente trabajo señala que los genotipos evaluados exhibieron una reacción diferencial a la inoculación con *Colletotrichum acutatum*, siendo aparentemente más susceptible el testigo comercial que exhibió el mayor número de explantes enfermos, lo que demuestra que se han transferido ciertas características de resistencia a los segregantes evaluados. Proaño (2008), concluye que tanto *Cyphomandra uniloba* como *Cyphomandra materna*, transfieren los genes de resistencia a sus segregantes ya que existieron materiales provenientes de los dos cruzamientos con buenas características de resistencia cuantitativa a antracnosis.

Bosh (1994), mencionó que entre las taxa silvestres resistentes a antracnosis *Cyphomandra uniloba* y *Cyphomandra materna* relacionadas con *Solanum betaceum* existe relaciones de compatibilidad, por ello se puede resaltar que durante los cruzamientos interespecíficos entre las especies se transmiten las fuentes de resistencia. Durante la investigación se evaluó 7 materiales promisorios con las mejores características tanto de resistencia como cualidades agronómicas deseables (INIAP, 2009) y un testigo que corresponde a una variedad comercial, se puede establecer que bajo condiciones de selección *in vitro* todos los materiales evaluados presentan daño por la interacción del hongo, donde el testigo es completamente

susceptible sin embargo se aprecia que algunos segregantes reportan un grado de resistencia y tolerancia, donde destaca el material promisorio N<sup>o</sup>-09. Patiño *et al.*, (2007), menciona que el material resistente presenta características que están asociadas a la falta de sensibilidad hacia las fitotóxicas o la capacidad de desplegar mecanismos que permitan su degradación o inactivación, características que hacen suponer se presentan en mayor y/o menor grado en los materiales promisorios evaluados.

### **5.3 FASE III: Inducción de Raíces en Materiales Promisorios de Tomate de Árbol, Seleccionados en función de su Resistencia/Tolerancia a *Colletotrichum acutatum*.**

#### **5.3.1 Explantes con emisión de raíz**

Los niveles hormonales presentes en un explante pueden derivar a la inducción de brotes o raíces. Un balance adecuado de auxinas y citoquininas favorece la rizogénesis y las altas concentraciones de citoquininas inhiben esta función y provocará mayor formación de brotes (Rojas *et al.*, 2004). El tratamiento que obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento fue el compuesto de sales MS con vitaminas en ausencia de reguladores de crecimiento, ya que se obtuvo 90% en el segregante N<sup>o</sup>-18 y 60% en el segregante N<sup>o</sup>-09 de presencia de raíz, esto se debe por las síntesis de auxinas exógenas propias de la especie y producida naturalmente por los brotes. En este sentido se puede afirmar que el tomate de árbol presenta resultados alentadores en medio MS con y sin vitaminas, pues al inicio de la investigación se propuso trabajar con la auxina IBA (Ácido indolbutírico) donde se determinó que los

explantes no generaban raíz y por el contrario formaban una especie de callo, lo que demuestra una saturación hormonal que inhibió la emisión de raíz, investigaciones afirman que la resistencia a enraizar se debe a que por la polaridad de las plantas estas generan citoquininas en la zona radical por consiguiente el aumento de estas evita la formación de raíces, por ello sugieren la transferencia de los brotes a un medio sin reguladores de crecimiento para permitir la disminución de los niveles hormonales.

### **5.3.2 Número de raíces**

En la presente investigación se observa que el T4 que corresponde al segregante N<sup>o</sup>-18 cultivado en el medio dos de enraizamiento (ME2) presenta el mayor número de raíces con un promedio de 8,22 raíces/plántula, lo que demuestra que es un material con altas posibilidades de éxito en la aclimatación

### **5.3.3 Longitud de raíz**

El segregante N<sup>o</sup>-18 en el medio dos de enraizamiento (ME2), se identifica como el mejor tratamiento. Para esta fase sobresale el tamaño de raíz con una longitud de 5,33 cm, lo que indica la capacidad de este material promisorio para desarrollar plántulas funcionales es alta pues una mayor longitud de raíz asegura un mayor anclaje y absorción de nutrientes que es fundamental para la sobrevivencia de la plántula en la fase de aclimatación.



## VI. CONCLUSIONES

- El tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav.) es una especie con gran potencial de desarrollo en condiciones *in vitro*, pues demuestra que al superar los procesos de necrosis/oxidación se adapta fácilmente al medio de cultivo con lo que se asegura el proceso de multiplicación.
- El método de desinfección descrito por Navarro (2005), resultó eficaz para el control de la contaminación causada por hongos y bacterias, el tratamiento testigo presentó el mayor porcentaje de contaminación a consecuencia que los explantes provienen de condiciones de campo y están expuestos a mayor contaminación.

Lo contrario ocurre en los materiales promisorios donde las condiciones bajo invernadero reducen el efecto de la contaminación.

- Los explantes vivos sobresale el T9 con un porcentaje de 86,67% de sobrevivencia, destacan también los tratamientos T13, T7 y T3 con valores de 80%, 73,33% y 73,33% respectivamente.
- Respecto a la presencia de brotes resalta el T9 como el tratamiento con mayor porcentaje de explantes con brotes con un valor de 86,67%, en tanto el T16 presenta el menor porcentaje de explantes con brotes con un valor de 20%.

- La tasa de multiplicación está estrechamente relacionada con la presencia de brotes en los explantes, potencialmente cada brote se considera un nuevo explante, se destaca el T3 como el tratamiento con alto potencial de multiplicación con un valor promedio de 3,18 explantes/planta seguido del T9 y T13 con valores de 2,92 y 2,83 respectivamente.
- La longitud de explantes fue muy variable, siendo un factor determinante los explantes que no desarrollaron por ello el promedio resulta relativamente bajo, los tratamientos que destacan se refieren al T13 y T9 con valores de 2,82 cm y 2,57cm respectivamente, lo contrario ocurre con los tratamientos T16, T6 y T12 con valores menores a 1 cm.
- Los segregantes S05, S02 y S07 que corresponden a los materiales promisorios N<sup>o</sup>-11, N<sup>o</sup>-06 y N<sup>o</sup>-18 representan los materiales que responden favorablemente a condiciones *in vitro*, dentro de todos los procesos que incluye la introducción y multiplicación en el sistema de cultivo de tejidos.
- El mejor medio de cultivo es el Medio uno (M1), reúne las características ideales para la adaptación de *Solamun betaceum* a condiciones *in vitro*.
- La diversidad de especies del género *Colletotrichum* reportadas como agentes causales de la antracnosis, hacen necesario su identificación molecular, los aislamientos recogidos en el sector productor de Tumbaco donde se reporta una alta incidencia de esta enfermedad fueron analizados mediante aplicación

PCR detectándose la presencia de *Colletotrichum acutatum* como el agente causal de la antracnosis.

- El tomate de árbol es susceptible a la antracnosis, investigaciones anteriores han permitido diferenciar fuentes de resistencia en especies silvestres relacionadas, que han sido combinadas con características agronómicas deseables de *Solanum betaceum.*, se establece que los segregantes evaluados presentan ciertas características de resistencia adquirida en los cruzamientos interespecíficos donde destacan el material promisorio N<sup>o</sup>-09 y N<sup>o</sup>.-18 como los segregantes resistentes a la interacción *Colletotrichum acutatum*/planta.
- La presencia de signos y síntomas se reportan en todos los segregantes evaluados, se aprecian daños similares a los causados por el hongo *in vivo*.
- La apreciación visual de la interacción *Colletotrichum acutatum*/planta considerando la escala de clasificación para evaluar daños causados por la antracnosis identificó al segregante N<sup>o</sup>-09 como el material promisorio con mayores características de resistencia con un valor de 54,17%, seguido del segregante N<sup>o</sup>-18 con un valor de 41,67%, de la misma forma se estableció al segregante N<sup>o</sup>-07 como el material con mayores características de tolerancia con un valor de 50% seguido del segregante N<sup>o</sup>-04 con un valor de 41,67%, igualmente se definió a los segregantes susceptibles, el material testigo reporta un valor de 83,34% y destacan los materiales promisorios N<sup>o</sup>-11 y N<sup>o</sup>-

14 y N<sup>o</sup>-06 con valores de 62,50%, 54,16% y 50% de susceptibilidad respectivamente.

- El enraizamiento es un proceso complicado en tomate de árbol, se aprecia que el segregante N<sup>o</sup>-18 en un medio MS con vitaminas reporta un porcentaje alto de presencia de raíz con un valor de 90% a diferencia del segregante N<sup>o</sup>-09 en MS básico que apenas alcanza un 30% de explantes con presencia de raíz.
- El número y longitud de raíces está directamente relacionada con la fase de aclimatación, cuando mayor es la cantidad y el tamaño de raíz aumentan las posibilidades de éxito de sobrevivencia en condiciones *ex vitro*, el segregante N<sup>o</sup>-18 cultivado en medio MS con vitaminas se presenta como el material con el mayor potencial de sobrevivencia pues se observa un promedio de raíces de 8,22 raíces/explante y 5,33 cm de longitud.

## VII. RECOMENDACIONES

- La introducción de explantes se dificulta por la presencia de necrosis/oxidación y contaminación, es necesario trabajar con material vegetal joven y bajo estrictas condiciones fitosanitarias.
- La identificación de *Colletotrichum acutatum* se definió en una sola zona de influencia, es importante analizar nuevos aislamientos de otras zonas productoras donde se reporta alta incidencia y severidad de la enfermedad.
- Complementario a la presente investigación es recomendable multiplicar *in vitro* los segregantes resistentes y tolerantes reportados y evaluar en campo.
- Es recomendable realizar varios subcultivos en un medio básico con vitaminas y con ello reducir la concentración de hormonas en especial de citoquininas pues con ello se potencializará la emisión de raíces.
- Es importante destacar que para complementar la investigación se debe desarrollar un protocolo de adaptación a condiciones *ex vitro*, por ende se recomienda realizar una evaluación que permita obtener plantas funcionales que puedan ser llevadas a campo.

## VIII BIBLIOGRAFÍA

- ADASKAVEG, J., HARTIN, R. (1997). *Characterization of Colletotrichum acutatum isolates causing Anthracnose of almond and peach in California*. *Phytopathology*. 87: 979-987p.
- AGRIOS, N. (1995). *Fitopatología*. Trad. por Manuel Guzmán 2ª ed. México (Mex): Noriega Editores. 280, 344, 357, 404p.
- ALARCÓN, J. (2008). *Diagnóstico precoz de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes*. Universidad de Caldas, Programa de Agronomía, Colombia.
- ALBORNOZ, G. (1989). *Normas para el cultivo de tomate de árbol (Cyphomandra betacea. Sendt)*. Universidad Central del Ecuador. Quito
- ÁLVAREZ, E., OSPINA, C., MEJÍA, J., LLANO, G. (2005). *Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides) en guanábana (Annona muricata) en el Valle del Cauca*. *Fitopatología Colombiana*.
- AMAYA, J. (2006). *Tomate de árbol. Biodiversidad y conservación de los recursos fitogenéticos andinos. Gerencia general de recursos naturales y conservación del medio ambiente*. Perú.
- ARANZAZU, F., RONDON, J. (1999). *Manejo productivo del cultivo de tomate de árbol y de la antracnosis (Colletotrichum gloesporioides (Penz)*. Rionegro, Antioquia: CORPOICA, PRONATTA. 27p. (Boletín Divulgativo).

- BOSH, L. (1994). *Flora neotropica. Cyphomandra (Solanaceae)*. New York botanical garden press on behalf of organization for flora neotropica. New York. USA. 175p.
- BOTERO, M. (1999). *Estudio de la interacción biológica de microorganismos relacionados con Colletotrichum gloeosporioides (Penz.), agente causante de la antracnosis en tomate de árbol*. Colombia.
- CASTILLO, A. (2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Unidad de Biotecnología. INIA. [En línea]. Consultado el 10 ene. 2012. Disponible en: [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf)
- CASTRO, D. DÍAZ, J. MURILLO, M. (1999). *Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal in vitro de árboles de Teca (Tectona grandis), Melina (Gmelina arborea) y Roble (Tabebuia rosea)*. Universidad Católica de Oriente. Colombia.
- CONTRERAS, C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp., obtenidos de frutos de lulo (Solanum quitoense. Lam), tomate de árbol (Solanum betaceum. Sendt), granadilla (Passiflora ligularis. Juss), mango (Mangífera indica. L) y tallos de mora (Rubus glaucus. Benth) con síntomas de antracnosis*. Tesis Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (CORPOICA). (2001). *Manejo productivo del cultivo de tomate de árbol y de la antracnosis*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Boletín informativo. Colombia

DEVLIN. R. (1976). *Fisiología vegetal*. Editorial Omega

DUVICK, D. (1999). *Heterosis: Feeding People and Protecting Natural Resources In: The Genetics and Exploitation of heterosis in Crop*. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America. Inc. Madison Wisconsin, USA. 19-29p.

EVANS, D. COLEMAN, J. KEAMS, A. (2003). *Plant cell culture*. BIOS Scientific Publishers. Londres y New York.

FEICAN, C. ENCALADA, C. LARRIVA, W. (1999). *El Cultivo del Tomate de Árbol*. Estación Experimental Chuquipata. Granja Experimental Bullcay. Programa de Fruticultura. Cuenca, Ecuador. 47p.

FEMENÍA, M. (2007). *Caracterización química de cepas de hongos del género Colletotrichum: Síntesis del gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelo de agentes fungiestáticos*. Tesis de grado Universidad de Cádiz. España.

FREEMAN, S. KATAN, T. SHABI, E. (1998). *Characterization of Colletotrichum species responsible for anthracnose disease of various fruits*. Plant Dis. 596-605p.



FRID, D. (2009). *Reproducción de plantas in vitro y sus beneficios para la agricultura. Tecno Ciencia y Salud. [En línea]. Consultado el 22 feb. 2012.*

Disponible en:

<http://tecnocienciaysalud.com/plantas-in-vitro>

GARCÍA, L., GARCÍA, R., MEDINA, C., LOBO, M. (2002). *Variabilidad Morfológica cuantitativa en una colección de tomate de árbol.* En: IV Seminario Nacional de Frutales de clima frío moderado. Medellín. 49-54p.

GARCÍA, L. (2000). *Selección in vitro a estrés biótico y abiótico. Curso en aplicaciones de la Biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas.*

GRANADOS (1988), citado por Viera, W. (2002). *Evaluación de fungicidas in vitro y pruebas de resistencia de cinco variedades de Tomate de Árbol para antracnosis. Cutuglagua-Pichincha. Tesis de Ingeniería Agronómica.* Universidad Central del Ecuador. 111p

HARTUNG, J., BURTON, C., RAMSDELL. (1981). *Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by Colletotrichum gloeosporioides.* Phytopathology. 449-453p.

HOYOS, R., AFANADOR, L. (1998). *Sistemas biotecnológicos para la selección acelerada del tomate de árbol (Solanum betaceum) por su resistencia a la antracnosis.* Memorias del II Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales: Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. 40-45p.

HOYOS, R. GIRALDO, A. MARTÍNEZ, D. (1998). *Establecimiento de estructuras callosas y suspensiones celulares de tomate de árbol*. En: Seminario de frutales de clima frío moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. Colombia.

INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). (2007). Estación Meteorológica Izobamba.

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP). (2009). Memoria Taller de seguimiento y *planificación estratégica de la fruticultura del Ecuador*. Programa de Fruticultura. Cuenca. 25p.

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP). (2004). *Informe técnico final. Proyecto IQ CV 008. Generación y difusión de alternativas tecnológicas para mejorar la productividad de tomate de árbol y babaco en la sierra ecuatoriana*. INIAP-PROMSA. Quito. 138p.

JEFFRIES, P. DODD, C. JEGER, J. PLUMBLEY, A. (1990). *The biology and control of Colletotrichum species on tropical crops*. Plat Pathology.

KOSKY, R. (1998). *Selección in vitro a enfermedades. Propagación y mejora genéticas de las plantas*. IBP. Cuba. 25-44p.

LIGARRETO. G (2001) *Los recursos genéticos: Un acervo importante para el mejoramiento de la producción de papa*. Revista CORPOICA.

LOBO, M.; MEDINA, C.; CARDONA, M. (2000). *Resistencia de Campo a la antracnosis de los Frutos (Colletotrichum gloeosporioides) en Tomate de árbol (Cyphomandra betaceae Cav. Sendt.)*. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 53:1129-1142.

LOZADA, P. (2010). *Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación in vitro de tomate de árbol (Solanum betaceum. Cav)*. Tesis de ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui-Ecuador. 128 p.

LUCAS. K. MAGGUI, J. YAGUAL, M. (2010). *Creación de una empresa de producción, comercialización y exportación de tomate de árbol en el área de Sangolquí, Provincia de Pichincha*. Tesis de ingeniería Comercial y Empresarial. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Economía y Negocios. Guayaquil-Ecuador. 140 p.

MAGAP/III CNA/SIGAGRO; INEC/ESPAC. (2010) *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Información multimedia. Disponible en:

[http://www.magap.gob.ec/sigagro/spr/spr\\_tomatearbol.htm](http://www.magap.gob.ec/sigagro/spr/spr_tomatearbol.htm)

MAGAP. (2001). *Subprograma de cooperación técnica. Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación*. Tomate de Árbol. Ecuador.

MCKEERSIE, D Y BROWN, C. (1996). *Somatic embryogenesis and artificial sedes in forage legumes. Seed Science Research*. [En línea]. Consultado el 12 jun.

2013. Disponible en:

<http://www.plant.uoguelph.ca/research/embryo/synseeds.htm>

NARVÁEZ, L. (2009). *Métodos de selección*. [En línea]. Consultado el 12 jun.

2013. Disponible en:

[agr-unne.edu.ar/fao/Nica.ppt/Narvaez-Selección.dpf](http://agr-unne.edu.ar/fao/Nica.ppt/Narvaez-Selección.dpf)

NAVARRO, A. (2005). *Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación in vitro de doce ecotipos de ají y cuatro de tomate de árbol*. Tesis Ingeniera Agrónoma. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga-Ecuador. 131 p.

OBANDO, M. JORDAN, M. *Regerative responses of Cyphomandra betaceae (Tamarillo) cultivated in vitro. En: Acta Horticulture*. [En línea]. Consultado el 20 jun. 2013. Disponible en:

<http://www.actahort.org/books/560/56083.htm>

OLMOS, S. LUCIANI, G. GALDEANO, E. (2008). *Métodos de conservación y propagación de germoplasma*. [En línea]. Consultado el 7 may. 2011.

Disponible en:

[www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf](http://www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf)

- PATIÑO, C.; HOYOS, R. y AFANADOR, L. (2007). *Selección y regeneración in vitro de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav. sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. Vol. 60, No.2. p. 3923-3937.
- PATIÑO, C. (2010). *Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas*. Revista de investigación agraria y ambiental.
- PEÑAFIEL, N. (2007). *Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum*. Cav) en tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatelitales*. Tesis Ingeniería en Biotecnología. Universidad San Francisco. Quito.
- PÉREZ, J. (1998). *Mutagénesis in vitro en: Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*. IBP, Cuba. 297-326p.
- PIERK. R. (1990). *Cultivos in vitro de las plantas superiores*. 3rd edn. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, 326 pp.
- PROAÑO, D. (2008). *Caracterización y selección de segregantes de cruzamientos inter específicos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con resistencia a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), y atributos agronómicos deseables evaluados en las provincias de Pichincha y Tungurahua*. Tesis Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Cotopaxi. Carrera de Ciencias Agropecuarias, Ambientales y Forestales. Latacunga. 139 p.

- ROCA, W. MROGINSKI, L. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Colombia: CIAT.
- RODRÍGUEZ, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp., asociadas a Coffea arabica., en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD*. Tesis de Grado, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial. Colombia.
- RONDÓN, J. (1999). *Estudio biológico y epidemiológico de la antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides, Penz), del tomate de árbol (Solanum betaceum, (Cav) Sendt), y generación de alternativas para su manejo integrado en Colombia*. PRONATTA. Bogotá. 20 p.
- ROJAS, S. GARCÍA, J. ALARCÓN, M. (2004). *Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. CORPOICA- Pronatta. Colombia.
- SALDARRIAGA, A., BERNAL, J., TAMAYO, P. (1997). *Enfermedades del cultivo del tomate de árbol en Antioquia: Guía de Reconocimiento y Control*. Colombia. CORPOICA. 43p. Boletín Técnico.
- SEENI, S. LATHA, P. (1992). *Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, Renanthera imschootiana. Plant cell tissue organ cultura*. [En línea]. Consultado el 20 jun. 2013. Disponible en:  
<http://www.springerlink.com/content/g81077831806113/>

SORIA, N. (2006). *Tecnología del cultivo de tomate de árbol. Proyecto SICA.*

[En línea]. Consultado el 22 may. 2013. Disponible en:

<http://tomatederbolproyecto.blogspot.com/>

SVANOVÁ, L. LEBEDA, A. (2005). *In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens.* Phytopathol.

TAMAYO, P. (1985). *Consideraciones sobre el efecto de la remoción de frutos enfermos y la incidencia de la antracnosis del tomate de árbol.* 54 -55p.

TAPIA, C. (2004). *“Tomate de árbol, frutal promisorio para la diversificación del agro andino”, Informe técnico.* Convenio CORPOICA-INIAP-INIA-UCLA.

TIWARI, S. TIWARI, K. SIRIL, E. (2002). *An improved micropropagation protocol for teak.* *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*