



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: MICROINJERTACIÓN *IN VITRO* DE BABACO [*Vasconcellea*
× *heilbornii* (Badillo) Badillo] EN PATRONES DE JIGACHO (*Vasconcella*
stipulata), PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS CON RESISTENCIA A
Fusarium oxysporum

AUTOR: TRUJILLO ARBOLEDA, CAROLINA BELÉN

DIRECTORA: JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“MICROINJERTACIÓN IN VITRO DE BABACO [Vasconcellea × heilbornii (Badillo) Badillo] EN PATRONES DE JIGACHO (Vasconcellea stipulata), PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS CON RESISTENCIA A Fusarium oxysporum”*** fue realizado por la señorita ***Trujillo Arboleda, Carolina Belén*** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 30 de mayo del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea punteada.

Mónica Beatriz Jadán Guerrero Ph.D

C.C. 1802278562.....



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Trujillo Arboleda, Carolina Belén* declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “*Microinjertación in vitro de babaco [Vasconcellea × heilbornii (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (Vasconcella stipulata), para la obtención de plantas con resistencia a Fusarium oxysporum*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 30 de mayo del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Carolina Belén Trujillo Arboleda'.

.....

Carolina Belén Trujillo Arboleda

C.C. 1717535833



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Trujillo Arboleda, Carolina Belén* autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “*Microinjeración in vitro de babaco [Vasconcellea × heilbornii (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (Vasconcella stipulata), para la obtención de plantas con resistencia a Fusarium oxysporum*” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de mayo del 2019

Firma:

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Carolina Belén Trujillo Arboleda".

Carolina Belén Trujillo Arboleda

C.C. 1717535833

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios y a todos los seres que dan sentido a mi existencia, a quienes vivifican el amor, iluminan y viven la humildad como principio, mi familia.

A Isabela, quien vive con curiosidad y cultiva mi mente, a ella que construye día a día en el destello de un amor que se va forjando desde lo más bello. Va por la vida sin dejarse vencer, al mando de sí misma; y vive un mundo secreto, donde sus carcajadas llegan desde lo insólito, lo mágico, va dedicado a ella, porque ella es, esperanza de vida.

Por ustedes y por mí lo daría todo,

Carolina Trujillo Arboleda

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, Myriam y Rubén, quienes me han sostenido en sus manos y en su corazón, sobre todo por estar junto a mí en todo momento, siendo mi apoyo en terrenos resbaladizos. Gracias por ser mi ejemplo, mi impulso para llegar a ser quien soy, enseñándome día a día que hay que esforzarse para cumplir con nuestro deber.

A Isabela, Adriana y Santiago, por ser mi refugio y mi lugar en el mundo, con quienes a veces estamos cerca, y a veces, creciendo. Gracias porque en las penas y tristezas ustedes son la vida; porque cuando busco sonreír, ustedes son la puerta.

A mi directora de tesis, Mónica Jadán y a Claudia Segovia, por la confianza depositada en mí, gracias por compartir sus conocimientos, motivación, entusiasmo y por guiarme en el cumplimiento y culminación de esta etapa de mi vida.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que han estado a lo largo de este camino, con quienes he compartido momentos preciosos de mi vida. A esas personas que miran de frente y toman a la sinceridad como su bandera, gracias por brindarme abrazos, risas, recuerdos y sobre todo por dejar su huella en mi vida.

Por todo eso, siento un infinito amor por ustedes,

Carolina Trujillo Arboleda

ABREVIATURAS

MS	Murashige y Skoog en 1962
AIA	Ácido indol acético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido naftalen acético
6-BAP	6-Bencil amino purina
PEG	Polietilenglicol

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4

1.4.	Hipótesis	5
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....		5
2.1.	Familia Caricaceae y género <i>Vasconcellea</i>	5
2.1.2.	Taxonomía.....	7
2.2.	Babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo].....	7
2.2.1.	Origen y distribución.....	7
2.2.2.	Características Morfológicas	9
2.3.	Jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>).....	11
2.3.1.	Origen y distribución.....	11
2.3.2.	Características morfológicas	11
2.4.	Plagas y enfermedades.....	13
2.4.1.	Fusariosis.....	15
2.5.	Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	17
2.5.1.	Aspectos generales	17
2.5.2.	Fitohormonas.....	20
2.5.2.1	Auxinas.....	20
2.5.2.2	Citoquininas.....	21
2.5.2.3	Giberelinas.....	21
2.6.	Microinjertación <i>in vitro</i>	22

2.6.1.	Características asociadas al porta-injerto (patrón)	23
2.6.2.	Características asociadas al injerto (brote)	24
2.6.3.	Procedimiento de microinjertación.....	25
2.6.4.	Factores que intervienen en la microinjertación.....	26
2.6.4.1	Oxidación	26
2.6.4.2	Concentración de sacarosa en el medio y fotoperíodo	27
2.6.4.3	Uso de fitohormonas (pretratamiento).....	28
2.6.4.4	Naturaleza del medio de soporte	29
2.6.4.5	Adecuación del porta-injerto	29
2.6.5.	Aplicaciones	30
2.1.2.1.	Eliminación de virus y viroides.....	30
2.1.2.2.	Producción de plantas resistentes a plagas y enfermedades	31
2.1.2.3.	Multiplicación masiva	31
2.1.2.4.	Intercambio de germoplasma seguro.....	32
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		33
3.1.	Ubicación geográfica de la investigación	33
3.2.	Fase de campo	33
3.2.1	Obtención de la muestra vegetal.....	33
3.2.2	Recolección de las muestras	34

3.3.	Fase de laboratorio.....	35
3.3.1	Desinfección de brotes apicales de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] y jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	35
3.3.2	Introducción de brotes apicales de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] y jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	36
3.3.3	Enraizamiento de los patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	39
3.3.4	Microinjertación <i>in vitro</i> de brotes de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	41
CAPITULO IV: RESULTADOS		48
4.1	Introducción de brotes apicales de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] y jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	48
4.2	Enraizamiento de los patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	53
4.3	Microinjertación <i>in vitro</i> de brotes de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>).....	56
CAPITULO V: DISCUSIÓN		64
5.1	Introducción de brotes apicales de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] y jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	64
5.2	Enraizamiento de los patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	67
5.3	Microinjertación <i>in vitro</i> de brotes de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>).....	69

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	74
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXOS.....	95
ANEXO A: Tablas de resultados obtenidos en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho.	95
ANEXO B: Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de los patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	100
ANEXO C: Resultados obtenidos en la etapa de microinjertación <i>in vitro</i> de brotes de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	103
ANEXO D: Tratamientos previamente realizados en las etapas de introducción y enraizamiento de brotes apicales de babaco y jigacho, y microinjertación <i>in vitro</i> de babaco en patrones de jigacho en babaco	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica del género Vasconcellea</i>	7
Tabla 2. <i>Formulación tradicional del medio Murashige & Skoog (MS)</i>	19
Tabla 3. <i>Tratamientos para la introducción de brotes apicales de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] y jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)</i>	38
Tabla 4. <i>Tratamientos para el enraizamiento de brotes apicales de jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)</i>	40
Tabla 5. <i>Tratamientos establecidos para la etapa de microinjertación in vitro de brotes de babaco en patrones de jigacho, de acuerdo a la técnica establecida por Mosella y Ascui (1985).</i>	42
Tabla 6. <i>Tratamientos establecidos para la etapa de microinjertación in vitro de brotes de babaco en patrones de jigacho, de acuerdo a la técnica establecida por Navarro et al. (1975).</i>	46
Tabla 7. <i>Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de jigacho y babaco, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo *.</i>	51
Tabla 8. <i>Pruebas estadísticas realizadas de los resultados obtenidos en la etapa de introducción de brotes de babaco y jigacho, a los 21 días de haber sido introducidos en medio de cultivo.</i>	53
Tabla 9. <i>Resultados de la variable “presencia de callo” de los explantes de jigacho en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.</i>	55

Tabla 10. <i>Prueba chi-cuadrado Pearson para la variable “presencia de callo” de los resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de brotes de jigacho</i>	56
Tabla 11. <i>Resultados de la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho a los 7, 15 y 30 días *.....</i>	60
Tabla 12. <i>Pruebas estadísticas realizadas de los resultados obtenidos en la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho, a los 7, 15 y 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo y haber realizado la injertación.</i>	63
Tabla 13. <i>Resultados de la evaluación de la viabilidad de los brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	95
Tabla 14. <i>Resultados de la evaluación de la viabilidad de los brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	96
Tabla 15. <i>Resultados de la evaluación de la presencia de callo en los brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	97
Tabla 16. <i>Resultados de la evaluación de la presencia de callo en los brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	98
Tabla 17. <i>Resultados de la evaluación de la longitud de brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	99
Tabla 18. <i>Resultados de la evaluación de la longitud de brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.....</i>	100
Tabla 19. <i>Resultados obtenidos de la variable “presencia de callo” en los explantes de jigacho, en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días.....</i>	101

Tabla 20. <i>Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 7 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.</i>	104
Tabla 21. <i>Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 15 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.</i>	106
Tabla 22. <i>Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 30 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.</i>	108
Tabla 23. <i>Tratamientos realizados para el establecimiento de la dosis adecuada de auxinas y citoquininas en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho</i>	112
Tabla 24. <i>Tratamientos realizados para el establecimiento de la dosis adecuada de auxinas y citoquininas en la etapa enraizamiento de los patrones de jigacho</i>	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la familia Caricaceae.....	5
Figura 2. Zonas de cultivo y origen del babaco en el Ecuador. Provincias de norte a sur: Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Loja.	8
Figura 3. Babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo], a) Planta en condiciones <i>ex vitro</i> . b) Frutos en estado maduro c) Hojas d) Flor.....	10
Figura 4. Jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>), a) Planta en condiciones <i>ex vitro</i> . b) Frutos en estado maduro c) Hojas d) Flor.....	13
Figura 5. Enfermedades de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] a) planta con bacteriosis b) planta con virus.....	15
Figura 6. Fusariosis en babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] a) amarillamiento de hojas b) pudrición de tallo.....	17
Figura 7. Plantas del género <i>Vasconcellea</i> ubicadas en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, de 4 meses de edad. a) Planta de babaco b) Planta de jigacho.	34
Figura 8. Brotes apicales de 3-5 cm de longitud, seleccionados para ser introducidos <i>in vitro</i> . a) Babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo] b) Jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>).	35
Figura 9. Protocolo de desinfección de brotes de y jigacho. a) Detergente al 1% (p/v) b) Etanol al 70% (v/v) c) Cloruro de mercurio al 0,05% d) Hipoclorito de sodio al 1,25% (v/v). .	36

- Figura 10.** Ápice de babaco colocado en papel filtro, al momento de su pretratamiento, observado en el estéreo microscopio (3X).....43
- Figura 11.** Preparación de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*) observados en el estéreo microscopio (3X). a) y b) Explantes a ser decapitados, las líneas entrecortadas representan el sitio de corte c) y d) Patrón decapitado.....44
- Figura 12.** Injertos de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] observados en el estéreo microscopio (3X), aislados con un ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y primordios foliares. a) 0,2-0,3 mm b) 0,7-1 mm de grosor.45
- Figura 13.** Esquema de los diferentes tipos de injerto45
- Figura 14.** Brotes apicales de jigacho, observados en el estéreo microscopio (3X), a los 21 días de ser introducidos en el medio de cultivo. a) Brote viable con coloración verde limón b) Brote no viable con presencia completa de callo c) Brote no viable con oxidación en la zona apical50
- Figura 15.** Brotes apicales de babaco, observados en el estéreo microscopio (3X), a los 21 días de ser introducidos en el medio de cultivo. a) Brote viable con coloración verde b) Brote no viable con presencia completa de callo c) Brote no viable con oxidación en la zona apical.....51
- Figura 16.** Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de jigacho, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.52
- Figura 17.** Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.53

- Figura 18.** Patrones de jigacho en el medio de enraizamiento, observados en el estéreo microscopio (3X). a) 7 días b) 15 días c) 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.....55
- Figura 19.** Número de explantes de jigacho con presencia de callo en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días. Tratamientos: C1 (2 mg/L de AIB); C2 (4 mg/L de AIB); C3 (6mg/L de AIB).....56
- Figura 20.** Brotes apicales de babaco, a las 24 horas de haber sido microinjertados en los patrones de jigacho, e introducidos en el medio de cultivo. a) Brote de 0,3 mm b) Brote de 0,5 c) Brote de 1 mm de grosor.59
- Figura 21.** Resultados de la variable “prendimiento” de los brotes apicales de babaco microinjertados en patrones de jigacho, a los 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo. a) Injerto no prendido con ápice cubierto por callo b) Injerto no prendido con presencia de hongo c) Injerto no prendido con ápice muerto.59
- Figura 22.** Microinjertos exitosos de brotes apicales de babaco en patrones de jigacho, observados a los 30 días, en el estéreo microscopio (3X).60
- Figura 23.** Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho, a los 7 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.61
- Figura 24.** Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho, a los 15 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.62

- Figura 25.** Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho, a los 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.63
- Figura 26.** Vista inferior de los patrones de jigacho en la etapa de enraizamiento. Variable “presencia de callo”. a), b) y c) 7 días d) y e) 15 días f) 30 días 102
- Figura 27.** Variable “presencia de callo” en los patrones de jigacho, en la etapa de enraizamiento. a) Vista lateral a los 7 días b) vista superior a los 15 días c) y d) vista superior a los 30 días..... 103
- Figura 28.** Resultados obtenidos de la técnica de la Mosella y Ascui (1975), aplicada en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho..... 111
- Figura 29.** Microinjerto *in vitro* de brotes babaco en patrones de jigacho, realizado a través de un corte en V, a los 7 días de haber realizado la injertación e introducido en el medio de cultivo..... 112

RESUMEN

El babaco, compuesto por sustancias como la vitamina C, enzimas proteolíticas, cardio-reguladores, se ha visto afectado por virus, bacterias y hongos. Existen investigaciones que utilizan técnicas para poner fin a esta problemática. Tal es el caso de la microinjertación, una técnica *in vitro* con potencial de producción de plantas resistentes y libres de enfermedades. Por tal motivo, la investigación tuvo el fin de generar plantas de babaco con resistencia a patógenos, mediante su microinjertación en jigacho. Se inició con la etapa de introducción de brotes apicales, donde se mantuvieron constantes las concentraciones de AIA y 6-BAP, de 0,3 mg/L y 2 mg/L, respectivamente. Las variantes fueron los tratamientos con agua de coco (10%), auxina AIB (2 mg/L), y giberelina GA3 (2 mg/L y 4 mg/L). Una vez obtenidas las plántulas, a los 21 días, el patrón de jigacho, fue introducido a la etapa de enraizamiento, donde se varió la auxina AIB (2, 4 y 6 mg/L). Para la microinjertación *in vitro*, los brotes de babaco, de 51 días de edad, fueron sometidos a diferentes tratamientos, entre ellos se incluyó, el pretratamiento de ápices de 1 mm de tamaño, en solución de sales MS, AIA (30 mg/L) y sacarosa (25 g/l) durante 15 minutos. Asimismo se realizaron diferentes tratamientos haciendo uso de PEG. Las plántulas microinjertadas fueron colocadas en el medio de cultivo conformado por sales MS al 50% y al 100%. Los resultados indicaron que la concentración adecuada de GA3 para el cultivo *in vitro* de brotes apicales fue de 4 mg/L para las dos especies. Para el enraizamiento la cantidad de 2 mg/L obtuvo la mayor cantidad de explantes con formación de callo en la base. En la microinjertación, el tratamiento con sales MS al 50% logró tener la mayor cantidad de injertos predidos, sin la necesidad de realizar el pretratamiento a los ápices, ni hacer uso de PEG para el prendimiento entre las dos especies.

PALABRAS CLAVE:

- VASCONCELLEAS
- MICROINJERTACIÓN *IN VITRO*
- PLANTAS RESISTENTES
- BROTE APICAL
- PATRÓN

ABSTRACT

The babaco, composed of substances such as vitamin C, proteolytic enzymes, cardio-regulators, has been affected by viruses, bacteria and fungi. There are researches that use techniques to put an end to this problem. Such is the case of micrografting, an *in vitro* technique with the potential to produce resistant and disease-free plants. The research was aimed at generating babaco plants with resistance to pathogens, by micrografting in jigacho. It began with the stage of introduction of apical buds, where the concentrations of IAA and 6-BAP, of 0.3 mg / L and 2 mg / L, respectively, were kept constant. Variants were treatments with coconut water (10%), auxin AIB (2 mg / L), and gibberellin GA3 (2 mg / L and 4 mg / L). Once the seedlings were obtained, at 21 days, the jigacho pattern was introduced to the rooting stage, where the auxin AIB (2, 4 and 6 mg / L) was varied. For *in vitro* micrografting, the 51-day-old babaco shoots were subjected to different treatments, including the pretreatment of apices 1 mm in size in MS salt solution, IAA (30 mg / L) and sucrose (25 g / L) for 15 minutes. Also, different treatments were made using PEG. The micrografted seedlings were placed in the culture medium consisting of 50% and 100% MS salts. The results indicated that the adequate concentration of GA3 for the *in vitro* culture of apical shoots was 2 and 4 mg / L for the two species. For rooting the amount of 2 mg / L obtained the highest quantity of explants with callus formation in the base. In the microinjection, treatment with MS salts at 50% managed to have the highest number of grafts, without the need to pre-treat the apices, or make use of PEG for the fusion between the two species.

KEYWORDS:

- VASCONCELLEAS
- *IN VITRO* MICROGRAFTING
- RESISTANT PLANTS
- APICAL SHOOT
- PATTERN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El babaco se ha convertido en un fruto de consumo tradicional, y se cultiva en Ecuador desde antes de la conquista española. Se cree que es una planta originada en la provincia de Loja, en los valles temperados. En varias provincias de la Sierra Ecuatoriana, el babaco, ha generado gran interés comercial gracias a la calidad gustativa de la fruta y altos contenidos de minerales y vitaminas (Asociación de Agrónomos Indígenas del Cañar [AAIC-PROMSA-MAGAP], 2004).

Se cultiva con éxito en invernadero, en las zonas andinas ecuatorianas. Este sistema ha permitido conseguir frutos de calidad y un incremento apreciable en su producción (Asociación de productores de babaco [APROBAYA], 2009). Sin embargo, Ochoa y Fonseca (1997) en su investigación, mencionan que han encontrado plantaciones de babaco con pudrición en sus raíces, causada por hongos, en los sectores de Patate, Baños, Tumbaco y otras zonas ubicadas al norte del país, que puede causar hasta un 100 % de pérdida en su producción.

Se han diseñado técnicas que promueven al cultivo de plantas de manera rápida y en gran cantidad, como es el caso de la micro propagación. Cohen y Cooper (1982) difundieron la técnica del cultivo *in vitro*, donde el explante es sembrado en un medio de cultivo, compuesto por vitaminas, macroelementos y microelementos de Murashige y Skoog. La técnica de micropropagación ya se ha difundido en Europa, principalmente en Italia; y en Ecuador, se informado avances considerables (Cañizares, 1998).

Para la producción de plantas libres de virus en un ambiente regulado, Murashige et al. (1972) desarrollaron la técnica innovadora de la microinjertación. Injertaron brotes apicales de

cítricos en la parte superior de una plántula decapitada cultivada *in vitro*, y revelaron que las plantas se encontraban libres de patógenos y exocortis. Una vez revelado aquello, ésta técnica se ha utilizado para la eliminación de virus, fitoplasmas y patógenos sistémicos en cultivos frutales (Jarausch, Lansac, Portanier, Davies y Decroocq, 2000).

En España, la microinjertación *in vitro* es un factor clave para el mejoramiento de la industria de cítricos (Navarro, Roistacher y Murashige, 1975). En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 1999) revela que el uso de portainjertos de Vasconcelleas nativas como: chamburo, toronche o papayuela de monte, tienen elevados grados de tolerancia y resistencia a la interacción del ataque de *Fusarium* y Nemátodos.

1.2. Justificación

El babaco, es una especie endémica de gran interés comercial debido a sus propiedades sensoriales como olor y sabor, además de su potencial para la producción de enzimas proteolíticas. Es exportado a países como China, Alemania, Holanda, Estados Unidos, Indonesia, Francia y Reino Unido, sus principales consumidores (Rodríguez, 2013).

Estas propiedades han obligado a buscar métodos para su propagación, y debido a que posee un fruto que no produce semilla, su forma de reproducción es asexual, y su multiplicación se realiza a través de estacas (Fabara, Bermeo y Barberán, 1985; Galarza, 2002). Sin embargo, la propagación presenta varios problemas fitosanitarios que favorecen la adaptación de los microorganismos al medio de crecimiento, que generan la diseminación de enfermedades y la pérdida de variabilidad genética (Fabara et al., 1985; Cañizares, 1998).

En Ecuador, la enfermedad del babaco tiene una incidencia de hasta el 100%. Es conocida como la marchitez vascular del babaco (MVB), y se transmite con facilidad a través del material de propagación contaminado (Falconí et al., 2006). Los problemas fitosanitarios de esta especie son generados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*, que inicia su ataque con el marchitamiento de la planta, el tejido se torna de color café, las hojas y frutos se caen, y termina con la muerte completa de la planta (AAIC- PROMSA- MAGAP, 2004).

Este problema se ha convertido en el principal limitante para su producción (García, 2011). Por tanto, se han buscado diferentes patrones para mejorar su comercialización, productividad, calidad de cultivos y potencial nutrimental. En general, los patrones utilizados son los portainjertos que en su mayoría pertenecen a la misma familia, y proporcionan cierta resistencia a enfermedades (Matute y Tirado, 2013).

Investigaciones realizadas con algunas especies de Vasconcelleas, demostraron que el jigacho y chamburo no presentan síntomas de la enfermedad, lo que indica que muestran resistencia y/o tolerancia a *Fusarium* y que se pueden utilizar como portainjertos de Babaco (Bravo, Larriva y Minchala, 2012). De la misma manera, Matute y Tirado (2013) mencionan que el jigacho, es un excelente portainjerto para el babaco debido a su resistencia a nemátodos y plagas. No produce semillas viables, lo cual no es una forma práctica de propagación. De esta manera, la propagación masiva se restringe a brotes herbáceos y meristemas, siendo la primera la más factible y viable. Convirtiéndose en una alternativa para la microinjertación.

La importancia de aplicar una técnica, como la microinjertación *in vitro*, capaz de combatir estos problemas, es la multiplicación rápida *in vitro* y mejora de la productividad que resulta del injerto. Esta técnica se puede utilizar a escala comercial para diversos factores como la producción

de plantas sin virus, predicción de la incompatibilidad entre el injerto y su patrón, estudios histológicos, la indización de enfermedades, y para producción de plantas libres de enfermedades con resistencia a patógenos transmitidos por el suelo y la multiplicación de plantas con raíces difíciles, como el babaco (Hussain, Wani, Mir, Rather y Bath, 2014).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Obtener plantas con resistencia a *Fusarium oxysporum* a través de la microinjertación *in vitro* de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el medio de cultivo óptimo para el desarrollo *in vitro* de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*).
- Establecer la dosis óptima de fitohormonas para el enraizamiento de los patrones obtenidos de jigacho (*Vasconcellea stipulata*).
- Definir el pretratamiento de inmersión adecuado para los brotes de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] y el corte apropiado de los explantes para la microinjertación *in vitro* en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*).

1.4. Hipótesis

El pretratamiento de inmersión adecuado de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo], y el corte apropiado de los explantes en condiciones de laboratorio, favorece a la compatibilidad de la microinjertación *in vitro* del injerto en el patrón.

CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Familia Caricaceae y género *Vasconcellea*

La familia Caricaceae es una pequeña familia dicotiledónea, consta de un género africano ecuatorial y cinco géneros neotropicales que tienen su centro de distribución en América del Sur (Badillo 1971, 1993, 2000). Comprende cerca de 35 especies, que se encuentran divididas a lo largo del trópico, desde el nivel del mar hasta los 3500 m. de altura. El continente americano contiene cinco de los seis géneros, con excepción de *Cylicomorpha* (África) (Badillo, 1993).



Figura 1. Distribución mundial de la familia Caricaceae
Fuente: (Heywood, 1985)

Son plantas herbáceas, arbustivas o arborescentes con un sistema bien desarrollado de laticíferos articulados. Las plantas, generalmente escasamente ramificadas, son en su mayoría dioicas y producen frutos parecidos a bayas (Badillo 1971, 1993, 2000).

Los conductos laticíferos de la familia Caricaceae están en la mayor parte de sus estructuras, incluyendo tallos, pecíolos y ramas. Estas estructuras producen una sustancia líquida de coloración blanquecina, segregada ante una lesión física. La mayor parte de este látex está presente en los frutos inmaduros, posiblemente como mecanismo de defensa para prevenir el consumo de las semillas por sus predadores antes de su desarrollo (Mundo y Serrano, 2012).

El látex tiene gran relevancia debido a que posee la enzima proteolítica papaína, que constituye el principio activo de estas plantas. Esta enzima tiene importantes usos: gastronómico como ablandador de carnes y clarificador de la cerveza; en la cosmética como agente exfoliante químico y en la última década se ha usado en el área de la salud como complemento dietético que ayuda a los procesos digestivos (Scheldeman, 2002).

El género *Vasconcellea*, perteneciente a la familia de las Caricáceas, está conformado por especies nativas que se distribuyen desde México hacia el norte de Argentina, cuyas alturas están entre los 1700 a 3500 msnm (Badillo, 2000). La mayor parte de la diversidad del género *Vasconcellea* (Caricaceae) se encuentra en la parte norte de los Andes, con 18 de sus 20 especies. La edad del género *Vasconcellea* se remonta al Mioceno medio, originado *in situ* de un ancestro centroamericano, con una posterior colonización secundaria en América Central (Antunes y Renner, 2012).

Además comprende dos grupos de especies: un pequeño clado que consta de cuatro especies de la parte occidental de los Andes (*V. candicans*), la región central costera de Chile (*V. chilensis*); Perú, Bolivia, Brasil y Sudamérica (*V. glandulosa*; *V. quercifolia*). El clado más grande comprende las especies restantes de *Vasconcellea*, que tienen una distribución en la parte occidental de los Andes en Perú y Ecuador (*V. stipulata*, *V. parviflora*, *V. weberbaueri*) y otras se distribuyen ampliamente desde México hasta Ecuador (*V. cauliflora*) (Matute y Tirado, 2013).

2.1.2. Taxonomía

En la tabla 1, se detalla la clasificación taxonómica del género *Vasconcellea*:

Tabla 1

Clasificación taxonómica del género Vasconcellea

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Brassicales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Vasconcellea</i>

Fuente: Rignanese (2006); APG III (2009)

2.2. Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]

2.2.1. Origen y distribución

Heilborn (1922) realizó la primera descripción taxonómica del babaco, y la nombró *Carica pentagona* por creer que se trataba de una especie nueva, no obstante, Badillo (1987) presentó evidencias que concluyen que el babaco es un híbrido originado posiblemente de jigacho y chamburo (Soria y Viteri, 1999). El babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] es una planta nativa del Ecuador, proveniente de la provincia de Loja, y se cultiva en las provincias de Pichincha, Loja, Tungurahua, Imbabura y Carchi (Fabara et al., 1985).

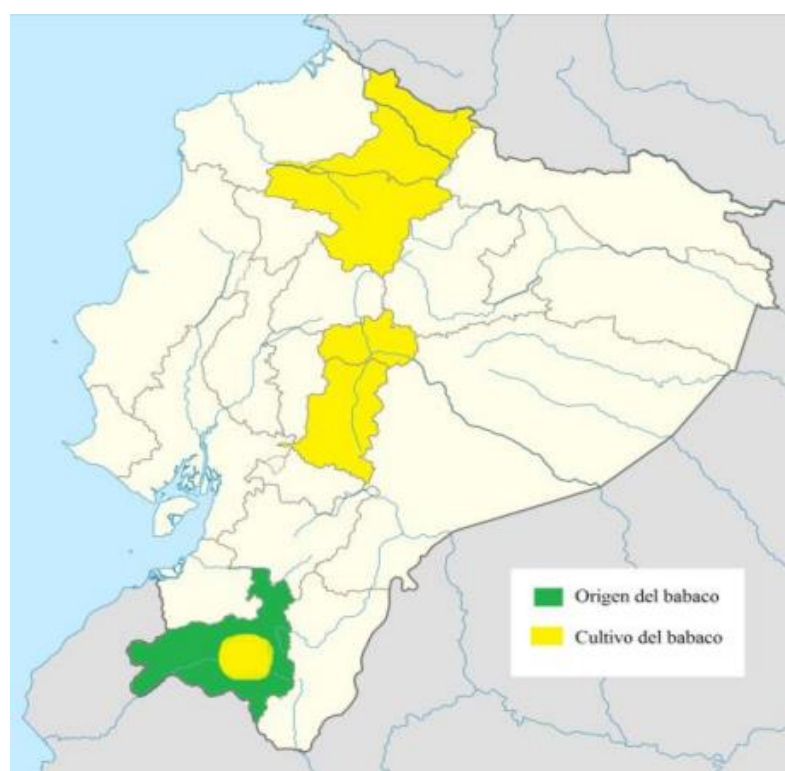


Figura 2. Zonas de cultivo y origen del babaco en el Ecuador. Provincias de norte a sur: Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Loja.

Fuente: (Brito, 2017)

Diversos estudios se han publicado en cuanto a la clasificación de *Vasconcellea* × *heilbornii*, fundamentados en análisis filogenéticos y moleculares, donde destacan dos hipótesis

acerca de su origen y ubicación taxonómica. La primera hace alusión a la hibridación entre *Vasconcellea stipulata* (jigacho) y *Vasconcellea cundimarcensis* (=pubescens; chamburo) (Robles, Herrera y Torres, 2016; Caetano et al., 2008). Mientras que la segunda hipótesis, indica la hibridación directa entre el progenitor *Vasconcellea weberbaueri* como donante de óvulos y *Vasconcellea stipulata* como donador de polen, seguido por el retrocruzamiento con los parentales *Vasconcellea stipulata* (Robles et al., 2016).

Kyndt et al. (2005) en su estudio, aclararon las relaciones filogenéticas y evolutivas dentro de la familia Caricaceae. El análisis filogenético se basó en secuencias de nucleótidos ITS del ADNr y tres fragmentos cloroplastídicos, incluyendo 29 taxones pertenecientes a 5 géneros, entre ellos *Vasconcellea*. Destacaron la monofilia de las caricáceas, así como la distancia filogenética entre las especies *Carica* y *Vasconcellea*, que anteriormente pertenecían al mismo género, y la monofilia del género *Vasconcellea*. Dentro de *Vasconcellea*, el género más grande de esta familia, se pueden distinguir dos linajes evolutivos bien controlados: (1) *V. xheilbornii*, *V. weberbaueri*, *V. stipulata* y *V. parviflora* y (2) un clado que contiene todos los demás taxones del género

2.2.2. Características Morfológicas

El babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo], un arbusto herbáceo de 1,5 – 3 metros de altura, posee un tallo cubierto por cicatrices foliares y mide cerca de 20 centímetros de diámetro con poca ramificación (Lim, 2012; Matute y Tirado, 2013). Las hojas de color verde cuando permanecen a lo largo del tronco, su pecíolo carnoso podría llegar a los 30 centímetros. Tienen forma palmeada, están divididas entre 5 a 7 lóbulos de ápice agudo, el raquis de la inflorescencia esparcidamente pilosas; los pecíolos miden entre 15 y 45 centímetros (Matute y Tirado, 2013).

Posee flores femeninas (monoica) solitarias de color verde que aparecen en las axilas de las hojas, encima de los pedúnculos y de forma acampanada; está conformada por 5 pétalos, ovario súpero con 5 carpelos y el estigma es sésil (Matute & Tirado, 2013). Los frutos sin semilla son partenocárpicos de forma oblonga, que pueden llegar a medir cerca de 23 centímetros de longitud y 8 centímetros de ancho, con un peso de 703,84 g aproximadamente. El número de frutos puede oscilar entre 60 durante su ciclo de vida de 24 meses (García, 2011; Quillay, 2011).

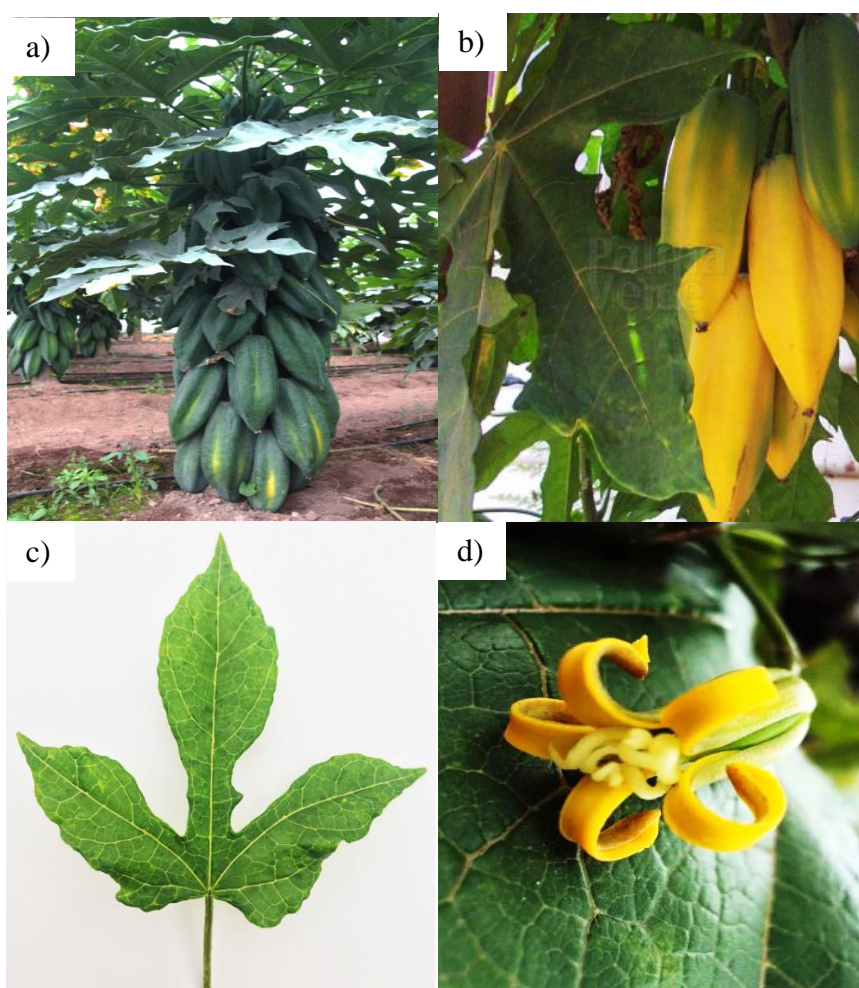


Figura 3. Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]
Nota: a) Planta en condiciones *ex vitro*. b) Frutos en estado maduro c) Hojas d) Flor
Fuente: (Quintero, 2012; Dihn, 2018)

2.3. Jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

2.3.1. Origen y distribución

Es una planta nativa de los Andes, y en Ecuador está en vías de extinción. Se encuentra a altitudes superiores a 1,000 msnm, y se ha establecido que *V. stipulata* se originó en la provincia de Loja (Kyndt et al., 2005). Sin embargo, se ha encontrado exclusivamente en la Sierra sur de Ecuador (Provincias de Cañar, Azuay y Loja) y el norte de Perú, entre los 1600 y 2450 msnm.

Tiene agradable aroma y altos niveles de fragancia, debido a la cantidad de terpenos presentes en sus frutos (SICA/MAG – INEC, 2000).

Se ha sugerido que *V. stipulata* y *V. heilbornii* tienen una estrecha relación genética (Aradhya, Manshardt, Zee y Morden, 1999). Además, Jobin-Decor, Graham, Henry y Drew (1997), haciendo uso de RAPD e isoenzimas encontraron un nivel de similitud del 85% entre *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis*. Se ha concluido que el jigacho es el parental del babaco, un ejemplo es el estudio de Horovitz y Jiménez (1967) quienes mencionaron que *V. × heilbornii* es un híbrido entre *V. stipulata* y *V. cundinamarcensis*.

2.3.2. Características morfológicas

Morfológicamente, *V. stipulata* y *V. heilbornii* son difíciles de distinguir según las características estudiadas, ya que la similitud en la morfología de la hoja complica su identificación. Sin embargo, la mayoría de los especímenes se pueden clasificar según la forma del fruto y el color de los pétalos (Van Droogenbroeck et al., 2002).

La característica fundamental de esta especie son las estípulas espiniformes, una a cada lado que pueden alcanzar de 1-3 mm de longitud. Es un arbusto alto, de hasta 10 m de altura, a menudo sin hojas cuando florece. Láminas foliares glabras, de 5 nervios y 5 lóbulos, de 1 a 2 mm de largo a cada lado del pecíolo (Scheldeman, 2002). Flores femeninas de 17 a 20 mm de largo color verde claro, y las flores masculinas de color naranja verdoso que miden cerca de 4 cm de largo. Las flores femeninas grandes y acampanuladas, pétalos de color blanco verdoso que pueden medir cerca de 3.8 cm (Fabara et al., 1985).

Fruto amarillo elipsoide, de 8-10 cm de largo por 4-6 cm de diámetro, redondeado y cóncavo en la base y atenuado desde su mitad hasta el ápice con 10 surcos medianamente profundos, 5 de ellos menos marcados. Semillas numerosas con 6 a 7 crestas longitudinales e interrumpidas (Badillo, 1993). Raíces poco profundas, tuberosas, raramente monoicas y polígamas (Badillo, 1971). Además, todos los órganos producen un látex blanco, que contiene cisteína endopeptidasas (Badillo 1993).

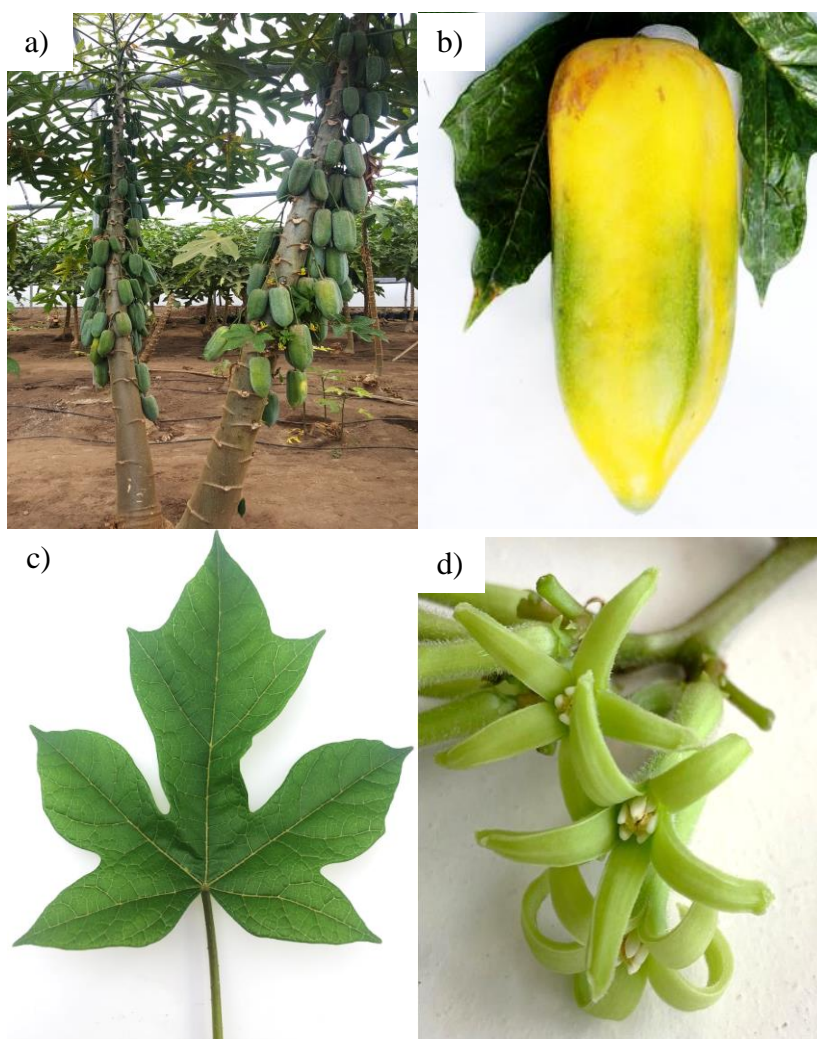


Figura 4. Jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

Nota: a) Planta en condiciones *ex vitro*. b) Frutos en estado maduro c) Hojas d) Flor

Fuente: (Scheldeman, 2002; Pazos, 2017)

2.4. Plagas y enfermedades

Se ha encontrado en invernaderos el ataque de un complejo de hongos a las plantas recién germinadas, conocido como damping off, también conocido como mal del talluelo. Ataca a los cultivos en su fase inicial, es decir, en la germinación, y aparece principalmente cuando la planta

se encuentra en condiciones de humedad (Córdoba et al., 2010). Asimismo, Soria y Viteri (1999), mencionan que las especies silvestres de *Vasconcellea*, son las menos resistentes a problemas fitopatológicos, entre estas se encuentran *V. x heilbornii*.

También se puede mencionar a la enfermedad fúngica producida por *Phytium spp*, generada durante la multiplicación por estacas, cuyas pérdidas pueden llegar hasta el 100% (Ochoa y Ellis, 2002). De la misma manera, se han hallado enfermedades generadas por bacterias, como *Erwinia carotovora*, que genera la “bacteriosis”, cuyos síntomas inician con clorosis en la hojas, luego se marchitan y caen, los mismos síntomas se observan en frutos y raíces para finalmente acabar con toda la planta (Caguana, 2003).

El género *Meloidogybe sp.*, son nemátodos que de igual manera, atacan al babaco. Producen nodulaciones en las raíces e interrumpen el paso de los nutrientes que provienen del suelo, lo que ocasiona el retraso del crecimiento de la planta, marchitez y flacidez del tallo (Bravo et al., 2012). Entre otras enfermedades, también se puede mencionar la alternariosis, conocida como lancha. Provoca la caída de las hojas, y su control se lo puede realizar biológicamente con reguladores como *Bacillus spp.* ó *Aureobasidium pullulans* (Merino, 1989; MAG, 2001).

El virus del mosaico de la papaya es la principal enfermedad causada por virus en el babaco. El síntoma principal es la presencia de moteado verde en las hojas jóvenes. Las plantas infectadas son de menor tamaño al igual que sus hojas. Este virus se transmite a través de estacas que provienen de plantas infectadas (Roossinck, 2013).

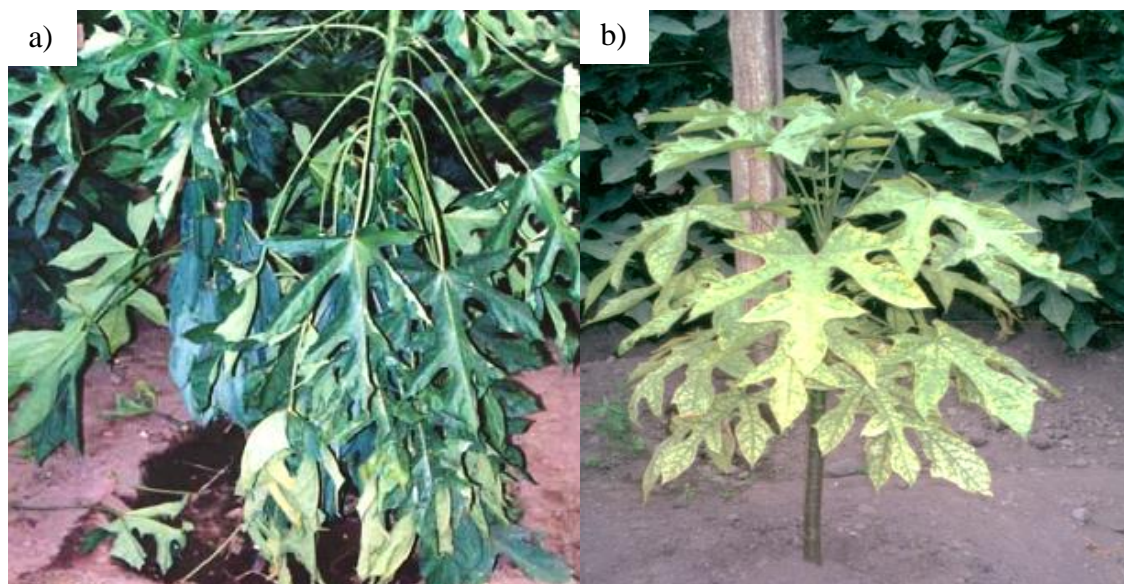


Figura 5. Enfermedades de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]

Nota: a) planta con bacteriosis b) planta con virus

Fuente: (Fabara, Bermeo y Barberán, 1985; Caguana, 2003)

2.4.1. Fusariosis

Una de las enfermedades sustanciales del babaco es la marchitez vascular de babaco (MVB), cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* (Ochoa y Fonseca, 2000), que fue identificado y clasificado como *Fusarium oxysporum* f sp. *vasconcelleae* (Ochoa, Yangari, Ellis , & Williams, 2004). Es un hongo que infecta directamente a las raíces, y su micelio se dirige a los haces xilémicos para propagarse al tallo y al resto de la planta, la característica de este hongo es que se limita a los tejidos vasculares (Castillo, 1999).

Esta enfermedad causa graves pérdidas de cultivos de babaco en la mayoría de las provincias (Bravo, Larriva y Minchala, 2012). La infección por *Fusarium* reduce la vida útil de la plantación de 5 años a 1-3 semanas (Ochoa y Fonseca, 2000; Quillay, 2000). Las plantas afectadas

pueden sobrevivir durante varias semanas, pero la muerte ocurre con frecuencia en la primera semana después de la infección (Ochoa y Fonseca, 2000).

Los principales síntomas de la enfermedad son la clorosis de las hojas inferiores y la podredumbre en la base del tallo, que conduce a la epinastia de las hojas y al marchitamiento de las plantas. Una vez que la flacidez se ha asentado en las plantas afectadas, mueren en poco tiempo, reduciendo su producción (Ochoa y Fonseca, 2000). Sin embargo, los síntomas de la MVB aparecen un mes después de que el patógeno infecta las plántulas.

La decoloración de las hojas generalmente comienza en la parte inferior de las plántulas y se extiende gradualmente hacia la parte superior. En las etapas avanzadas de infección, la planta sufre defoliación. La enfermedad puede ocurrir tanto en plantas jóvenes como en plantas viejas. En casos graves, las raíces principales pierden sus raíces secundarias, lo que da como resultado la muerte de la plántula (Nelson, Toussoun y Marasas, 198).

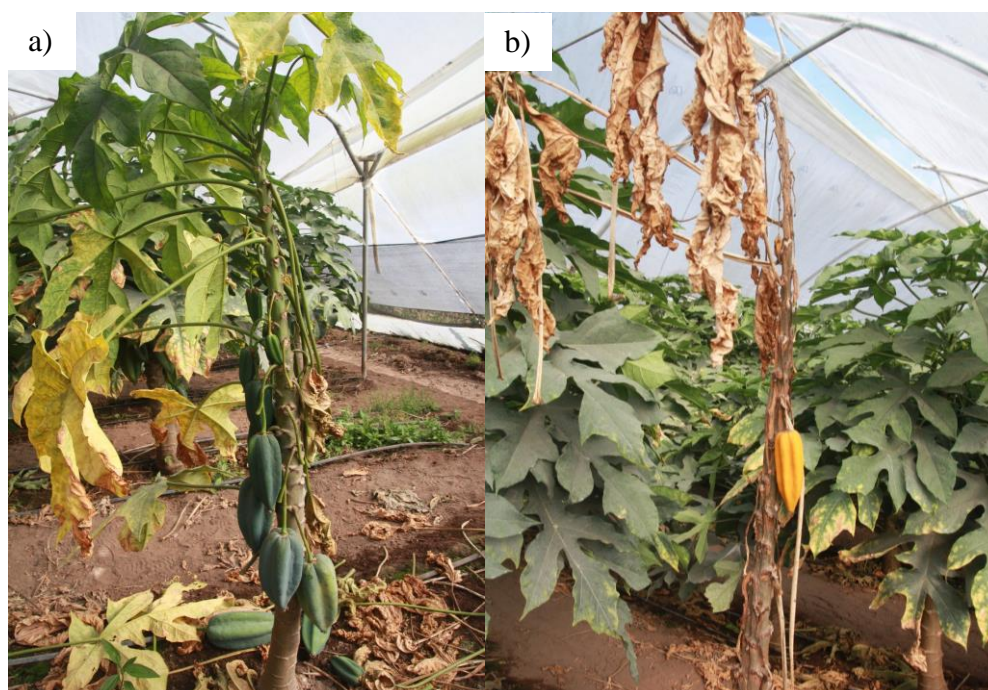


Figura 6. Fusariosis en babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]

Nota: a) amarillamiento de hojas b) pudrición de tallo

Fuente: (Mariño, 2019)

2.5. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

2.5.1. Aspectos generales

El cultivo de tejidos vegetales es el cultivo *in vitro* de células, tejidos, órganos o plantas completas bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas, estrictamente asépticas (Thorpe, 2007). Las condiciones controladas proporcionan al cultivo un ambiente propicio para su crecimiento y multiplicación. Estas condiciones incluyen el suministro adecuado de nutrientes, pH del medio, temperatura adecuada, entorno apropiado ya sea líquido o sólido (Akin-Idowu, Ibitoye y Ademoyegun, 2009).

La presente técnica está basada en el principio de totipotencia, que se define como la capacidad de una célula vegetal viable para generar copias similares, incluso un espécimen completo. Esto se debe a que, su componente genético corresponde a una réplica del vegetal del que fue originado independientemente de la región de su ubicación dentro del mismo (Fert & Paul, 2000).

El medio de cultivo vegetal tiene la característica de simular un ambiente de crecimiento natural de la planta. En la mayoría de casos se constituye por agua, sales minerales, carbono, fitoreguladores y agente gelificante. El medio más utilizado es el de Murashige y Skoog (MS), creado en 1962, cuyas particularidades en cuanto a su composición se basan en el incremento de la concentración de algunas sales hasta 25 veces, con respecto a las establecidas en formulaciones anteriores tales como la solución de Knop's (Thorpe, 2007).

Los atributos de este medio corresponden a la disminución de la cantidad de NO_3 y NH_4 así como el incremento de micronutrientes que le otorga una amplia versatilidad para fomentar el desarrollo de una amplia gama de tejidos vegetales sometidos a cultivo (Tabla 2) (Fabela, Preciado y Benavides, 2006).

Las plantas que son cultivadas *in vitro* no son suficientemente autótrofas, ya que su proceso fotosintético no se puede manifestar óptimamente debido a las limitaciones presentes tales como la disminuida disponibilidad de los niveles de CO_2 dentro del frasco en comparación al entorno exterior, y la reducida intensidad lumínica bajo la cota requerida, de tal manera que los carbohidratos, comúnmente la sacarosa, corresponden a la principal fuente de carbono del explante en dichas condiciones (Troncoso, 1997).

Además se añaden vitaminas, cuya función es servir como sustrato, o actuar como cofactores para las enzimas de algunos procesos de las rutas metabólicas (UNPL, 2019). Entre otros componentes que puede añadir al medio, es el agua de coco, cuya función es mejorar la inducción de callo, el desarrollo de brotes y la multiplicación en el cultivo *in vitro* (Patrick, 2011). Agampodi y Jayawardena (2009) mostraron que el agua de coco contiene fitohormonas que normalmente se utilizan en el cultivo de tejidos. Para regular el estado final del medio de cultivo, ya sea sólido, semisólido o líquido, se debe añadir un agente gelificante. El que comúnmente se utiliza es el agar, que se obtiene de variedades de algas marinas (UNPL, 2019).

Tabla 2

Formulación tradicional del medio Murashige & Skoog (MS)

Nutriente	Concentración
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1,650 mg/L
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440 mg/L
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370 mg/L
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170 mg/L
Nitrato de potasio (KNO_3)	1,900 mg/L
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.2 mg/L
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025 mg/L
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8 mg/L
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3 mg/L
Yoduro de potasio (KI)	0.83 mg/L
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25 mg/L
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6 mg/L
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.2 mg/L

Fuente: (Fabela, Preciado y Benavides, 2006)

2.5.2. Fitohormonas

Las fitohormonas son sustancias biológicas que son producidas por la planta y pueden presentarse en asociaciones (mecanismo de reserva) o dispersas (fase de actividad). Su función es actuar como mensajeras entre las células y a través de la unión con un receptor proteico que induce a la actividad o silenciamiento temporal de genes específicos. Otros compuestos de naturaleza sintética, denominados reguladores de crecimiento son capaces de emular estas funciones hormonales en las plantas, y por lo tanto permiten la regulación y el control de las respuestas en función del tipo de regulador y la concentración a la que se utilice. Generalmente, tanto las hormonas y los reguladores, presentan un bajo peso molecular y actúan a concentraciones bastantes reducidas que bordean entre 10^{-6} y 10^{-8} M, y en base a su función se organizan en: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (UNPL, 2019).

2.5.2.1 Auxinas

Las auxinas son el grupo más importante de hormonas involucradas en la formación de raíces adventicias (Hartmann, Kester, Davies y Geneve, 1997). Se sintetizan en hojas y brotes en crecimiento. Las auxinas promueven la división celular y pueden influir en el metabolismo de los carbohidratos al aumentar la hidrólisis del almidón (Costa, Heuvelink y Van de Pol, 2017).

El ácido indol butírico (AIB) y el ácido naftalen acético (ANA) son las auxinas sintéticas más utilizadas en la propagación de plantas, y promueven la formación de raíces (Hartmann, Kester, Davies y Geneve, 1997).

El ácido indol acético (AIA) participa en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, desde el embrión hasta la planta adulta. Además participa en la formación de patrones, en el desarrollo de embriones, la inducción de la división celular, elongación del tallo y el coleoptilo, la dominancia apical, la inducción de enraizamiento, la diferenciación del tejido vascular, el desarrollo de la fruta y los movimientos trópicos como la inclinación de los brotes hacia la luz o las raíces hacia la gravedad (Srivastava, 2002).

2.5.2.2 Citoquininas

Las citoquininas afectan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la división celular, el inicio y crecimiento de brotes, la senescencia de hojas, la dominancia apical, la captación de nutrientes, la filotaxis y el desarrollo vascular, gametófito y embrionario, así como la respuesta a factores bióticos y abióticos (Kieber y Schaller, 201).

La citoquinina regula la capacidad que tienen las plantas para absorber diversos nutrientes del medio, incluidos el nitrógeno, fósforo, azufre y hierro, y el estado de los nutrientes de la planta puede, en algunos casos, regular la función de la citoquinina y, por lo tanto, el crecimiento de la planta (Agueso, Ferreira y Kieber, 2009).

El 6-Benzylaminopurine (6-BAP), es una citoquinina sintética que, junto con las auxinas, genera respuestas en el crecimiento y desarrollo de plantas. Se ha usado para inducción de brotes (Ross y Grasso, 2010) y medio de germinación de semillas (Raza, Sing y Bhalla, 2017).

2.5.2.3 Giberelinas

Las giberelinas (GA), son una clase de fitohormonas diterpenoides, producidas por plantas y algunos hongos, desempeñan un papel importante en la regulación de diversos procesos a lo largo

del crecimiento y desarrollo de plantas durante su ciclo de vida, incluida la división celular y alargamiento, germinación de semillas, elongación del tallo e hipocotilo, crecimiento de raíz e inducción de la floración (Sun y Gluber, 2004; Daviere, de Lucas y Prat, 2008; Vera-Sirera, Gomez y Perez-Amador, 2016). También regulan la adaptación de plantas al estrés biótico y abiótico (Yang et al., 2008, 2012).

2.6. Microinjertación *in vitro*

La microinjertación se basa en el mismo principio agronómico de la injertación como método de propagación vegetativa, en el cual una parte de tejido procedente de una planta, denominada injerto, se une sobre otra ya asentada, al patrón, portainjerto o pie. De esta manera y a partir de la unión de ambos, crecen como un solo organismo. Este proceso se lleva a cabo bajo condiciones *in vitro*, con plantas pequeñas y generalmente jóvenes (Hussain et al., 2014). La técnica nació con el fin de obtener plantas de naranjo libres de virus, a través de la microinjertación, después se aprovecharon las distintas cualidades genéticas de las especies seleccionadas para obtener injertos en mejores condiciones fitosanitarias (Conci, 2010).

Según Hartmann et al. (2002), es una técnica *in vitro* que implica la colocación de un meristemo o un explante de punta de brote, sobre un rizoma decapitado que se ha cultivado asépticamente a partir de cultivos de semillas o micropropagados. Luego de los primeros experimentos realizados por Doorenbos en 1953 en hiedra y más tarde por Holmes (1956) en crisantemo, la técnica se ha utilizado en especies leñosas y especialmente en árboles frutales, donde se ha trabajado en diferentes especies de cítricos para eliminar enfermedades virales. La técnica fue modificada y mejorada para aumentar el éxito del injerto por Murashige et al. (1972) y Navarro et al. (1975). La técnica tiene un gran potencial de mejora y multiplicación a gran escala de plantas

frutales. La técnica, también se ha utilizado para predecir la incompatibilidad entre las partes del injerto, los estudios histológicos, la indexación de virus, la producción de plantas libres de enfermedades particularmente resistentes a patógenos transmitidos por el suelo, el intercambio de germoplasma seguro entre países y la multiplicación de plantas de raíz difícil (Hussain, 2014).

La microinjertación tiene gran utilidad en la producción de árboles frutales y su protocolo se ha desarrollado en muchos cultivos que incluyen almendras (Yıldırım et al., 2010; Isıkalan et al., 2011), albaricoque (Piagnani et al. , 2006),), anacardo (Mnoney y Mantell, 2001), manzana (Huang y Millikan, 1980), aguacate (Simon y Richard, 2005), cereza (Amiri, 2007), uvas (Tangolar, Ercik y Tangolar, 2003), nogal (Wang, Li, Chen y Tian, 2010), pera ((Faggioli, Martino y Barba, 1997), pistacho (Abousalim y Mantell, 1992), etc. Para la comercialización del microinjerto, se han desarrollado protocolos para la producción a gran escala de plantas frutales con un alto porcentaje de éxito en la injertación.

2.6.1. Características asociadas al porta-injerto (patrón)

La edad de las plántulas juega un papel importante, plantas jóvenes parecen estar asociadas con la formación de callo (Herman y Hess, 1963). Los portainjertos utilizados para el microinjerto son plántulas germinadas *in vitro* o *in vivo*, y brotes micropropagados, ya sean enraizados o sin raíz. Las plántulas pueden ser soportadas en medio de agar (Hussain et al., 2014).

La frecuencia de injertos exitosos puede ser mayor si las plantas que se utilicen crecen en oscuridad. Navarro et al. (1975), demostraron que en oscuridad las plántulas dieron 37,5% de injertos exitosos, mientras que las obtenidas en exposiciones diarias de 16 horas a una iluminación

de 1000 lux produjeron solo el 2,7%. Independientemente de la razón, la elección del procedimiento de injerto *in vitro* es usar plántulas etioladas como portainjertos.

El mayor porcentaje de injertos exitosos se obtiene cuando se utilizan patrones de 2 semanas de edad como portainjertos. Las plántulas más jóvenes, así como las de más de 2 semanas, obtienen la menor cantidad de injertos exitosos. Los injertos infructuosos en plántulas más viejas muestran una mayor proporción de puntas del brote secas, se vuelven marrones y mueren; mientras que aquellos que involucran plántulas más jóvenes revelaron puntas de brotes que se habían vuelto inactivas y enterradas en callos producidos por el tejido de portainjertos (Navarro et al., 1975).

2.6.2. Características asociadas al injerto (brote)

Las puntas de brotes o meristemos destinados a injertos pueden tomarse de brotes de crecimiento activo en invernaderos, en campo o *in vitro*. En general, se utilizan puntas de brotes apicales o esquejes nodales como explantes para el establecimiento de cultivos *in vitro*. Los micro brotes de grosor, edad y longitud deseados se utilizan para operaciones de injerto *in vitro* (Hussain et al., 2014).

Además, se espera que la incidencia de injertos exitosos incremente al aumentar el tamaño de la punta del brote, pero también es probable que la proporción de plantas libres de virus disminuya. El tamaño del brote que se elija finalmente debe permitir un grado realista de éxito de injerto y dar como resultado un número razonable de plantas libres de patógenos. El grado de éxito aumenta progresivamente a medida que se utilizan puntas de brotes más grandes, al incluir tejido subyacente y 2, 4 o 6 primordios. Sin embargo, como práctica habitual, se debería adoptar una

punta de brote compuesta por meristemo apical y tejido subyacente con 3 primordios foliares, que miden 0,14 a 0,18 mm de altura (Navarro et al., 1975).

Se puede considerar la posibilidad de utilizar brotes obtenidos *in vivo*, ya que en estudios anteriores estos dieron mayores éxitos de injertos, sin embargo, depende además de la estación. La fuente alternativa de puntas de los brotes sería la descarga de brotes que dan como resultado brotes axilares cultivados.

2.6.3. Procedimiento de microinjertación

En caso de que el grosor del patrón y el material del brote sean lo suficientemente grandes, se realiza una hendidura en el portainjerto. El contacto firme entre el portainjerto y el brote es importante para la correcta unión de las dos partes y la formación de callo (Canan, Mehmet, Hakan, Kamil y Elman, 2006). Cuando los injertos tienen éxito, crecen juntos para producir una planta. Por lo general, es necesario examinar las plántulas recién injertadas de forma regular y eliminar cualquier brote adventicio que surja en o debajo de la unión (Hussain et al., 2014).

El método de colocación de la punta del brote extirpado sobre el patrón influye significativamente en el grado de éxito del prendimiento. No obstante, el mayor éxito se puede llegar a obtener cuando la punta del brote se coloca sobre el anillo vascular en la superficie de corte superior del patrón decapitado, sin embargo, se pueden llegar a obtener frecuencias aceptables de injertos exitosos cuando la punta del brote se coloca en la corteza o en la médula del patrón (Navarro et al., 1975).

Es preciso señalar que los procedimientos de la microinjertación son difíciles y generalmente resultan en una baja tasa de injertos exitosos, lo que la convierte en una técnica de

producción costosa y lenta. Esto se debe al hecho de que se requiere más experiencia técnica para preparar injertos exitosos en material a pequeña escala. En muchos experimentos, la tasa de fracaso de los microinjertos suele ser mayor a la deseada. Los injertos *in vitro* de plantas frutales a menudo fallan, debido a una reacción de incompatibilidad, mal contacto entre el brote y el patrón, y pardeamiento fenólico de las superficies cortadas (Ramanayake y Kovoov, 1999). Para aliviar algunas de estas limitaciones, se han desarrollado diferentes técnicas para hacer del microinjerto una tecnología superior y exitosa en beneficio de técnicos, investigadores, operadores de viveros y laboratorios comerciales de cultivo de tejidos.

2.6.4. Factores que intervienen en la microinjertación

2.6.4.1 Oxidación

Una dificultad que se encuentra en esta etapa es la oxidación de las superficies cortadas, a nivel del ápice diseccionado y el patrón decapitado. Este fenómeno se debe a la exudación de compuestos fenólicos de las superficies cortadas y la oxidación generada por las enzimas polifenoloxidasas y peroxidasa, que causan la decoloración de los tejidos, lo que resulta en un microinjerto deficiente (Martínez, Hugard, & Jonard, 1979). El color dorado de las superficies cortadas inhibe el crecimiento y el desarrollo de nuevas células y, produce una unión deficiente del injerto. Para bloquear los fenómenos de oxidación y prevenir el oscurecimiento del tejido, se han utilizado diversas sustancias que incluyen tiourea, cisteína, clorhidrato (Jonard, 1986), ácido cítrico y ácido ascórbico (He, Chen, Chen, Kong, & Ren, 2005), fitagel (Zhang & Luo, 2006), PVP (polivinilpirrolidona) (Rather, Siddique, Nazki, & Hussain, 2011), DIECA (Martínez et al., 1979).

El ennegrecimiento del tejido, comúnmente resulta en la muerte del brote, pero se puede llegar a reducir este fenómeno al sumergir el explante en una solución antioxidante y/o colocando una gota de solución en el patrón cortado, inmediatamente antes de injertar (Jonard, Lukman, Schall, & Villemur, 1990).

2.6.4.2 Concentración de sacarosa en el medio y fotoperíodo

La concentración de sacarosa del medio nutriente tiene un efecto significativo en el porcentaje de injertos exitosos. En estudios previos, en plantas de cítricos, se ha verificado que los injertos viables ocurren a una concentración del 7,5% de sacarosa. También se ha observado que un aumento progresivo en el número de hojas nuevas que surgen en las puntas de los brotes, se da a una concentración de sacarosa, hasta el 7,5%; una concentración de sacarosa al 10% no mostró ningún beneficio adicional. El crecimiento total de las hojas de las plantas injertadas con éxito se ve afectado favorablemente al aumentar la concentración de azúcar de 2,5 a 7,5%. La sacarosa, además de promover a la viabilidad del brote, ayuda en la producción de nuevas raíces laterales fue estimulada sustancialmente por la mayor concentración de sacarosa (Navarro, 1975).

En cuanto al fotoperíodo, se ha mencionado que sus variaciones son relevantes en el prendimiento de los injertos (Hussain et al., 2014). La intensidad de la luz durante el crecimiento de los injertos *in vitro* no parece ser crítica, al menos en el rango de 300 a 10.000 lux; sin embargo, se requiere algo de luz, ya que no se ha logrado injertos exitosos cuando las plantas se colocan en oscuridad constante. En consecuencia, la exposición diaria de 16 horas a la iluminación de 1000 lux de las lámparas Sylvania Gro Lux se ha mantenido como estándar (Navarro, 1975).

Se han reportado variaciones significativas en el porcentaje de injertos exitosos de acuerdo con la exposición de las plántulas a la luz. Hamaraie et al. (2003) reportaron mayor frecuencia de injertos exitosos (50%) en toronja (*Citrus paradisi*) cv. “Miami, cuando se obtuvieron plántulas de portainjertos (naranja agria) a partir de semillas germinadas en oscuridad continua durante dos semanas, en comparación con el 5% de injertos exitosos con plántulas que se desarrollaron bajo la luz. Navarro et al. (1975) informaron una baja frecuencia de injertos exitosos utilizando plántulas de Troyer citrange cultivadas bajo luz continua en comparación con las plántulas cultivadas en oscuridad continua. Ewa y Monika (2006) encontraron un alto porcentaje de microinjertos exitosos en cereza en condiciones oscuras.

2.6.4.3 Uso de fitohormonas (pretratamiento)

Por lo general, los reguladores de crecimiento no se utilizan en los injertos tradicionales para aumentar el éxito del injerto. Sin embargo, bajo condiciones *in vitro*, las citoquininas y auxinas, se han encontrado efectivas para mejorar la tasa de éxito del injerto. En el momento de realizar la operación de microinjerto, al microbrote se le da una inmersión rápida (5-10 s) en una solución estéril con reguladores de crecimiento, y luego se inserta o se coloca en el patrón (Hussain et al., 2014).

De igual manera, se ha descrito otra técnica de pretratamiento que consiste en colocar al brote en un tubo de hemólisis en papel de filtro humedecido con una solución mineral de Murashige y Skoog (1962), complementado con auxinas y citoquininas. Este tratamiento puede modificar el estado fisiológico del brote extirpado y conducir a un rápido desarrollo incluso en los brotes más pequeños de 0,1 a 0,2 mm, cuyo injerto es generalmente difícil e ineficaz (Jonard et al., 1983). Mosella-Chancel et al. (1979) informaron un 64% de microinjertos exitosos en melocotón, cuando

se pretrataron con zeatina (0,1 mg / L) durante 48 h en comparación con el 21,7% sin ningún pretratamiento.

Wang et al. (2010) encontraron que el ANA es eficaz para mejorar el éxito del microinjerto en nogal. Rafail y Mosleh (2010) informaron un aumento en el éxito del microinjerto de 30 a 90% en pera y 40 a 90% en manzana, con una concentración de BAP de 0-2.0 mg /L. Triatrniningsih Purbiati y Weidiyati (1989) obtuvieron un aumento del 24% en la frecuencia de injertos exitosos sobre controles no tratados en cítricos mediante el uso de BAP a 0,5 mg / L.

2.6.4.4 Naturaleza del medio de soporte

El medio solidificado con agar y el medio líquido se han utilizado para el crecimiento de plantas microinjertadas. Rafail y Mosleh (2010) observaron que el número de microinjertos exitosos aumentó del 10% en medio solidificado con agar, al 60% en manzana y al 70% en pera con el uso de medio líquido. Por lo general, hay mayor captación de nutrientes y reguladores de crecimiento por los microbrotes en medios líquidos, lo que lo hace más efectivo que el medio solidificado. El medio líquido MS con vermiculita se encontró mejor para un mayor desarrollo de los microinjertos, ya que el medio líquido solo o con agar forma condiciones asfóxicas, lo que evita la formación de raíces laterales (Mosella-Chancel et al., 1979).

2.6.4.5 Adecuación del porta-injerto

La desecación del injerto es una de las principales causas del fracaso de la unión del injerto (Pliego-Alfaro y Murashige, 1987; George, Michael y Greek-Jan, 2008). Para prevenir este fenómeno, Pliego-Alfaro y Murashige (1987) aplicaron una capa de agar nutriente entre el injerto y el patrón, y obtuvieron un mejor éxito de injerto. Por lo general, agregar una gota de agar evita

que el brote se seque y hace posible el transporte de diferentes materiales, manteniéndolos unidos hasta que se produzca la fusión. La adición de gotas de agar suplementadas con minerales y / o fitohormonas mejora aún más el éxito del injerto (Amiri, 2007).

Varios productos químicos se han utilizado para inducir la fusión, pero el más exitoso y el más utilizado en la actualidad es el polietilenglicol (PEG), es un polímero de alto peso molecular que no es permeable a la membrana celular del plasma y, por lo tanto, no se metaboliza (Stasolla & Yeung, 2003). Sus efectos no son específicos, pero promueve la agregación y fusión de células, ya sean de las mismas especies o diferentes (Schuabb, Moura, Barroso, Santa-Catarina y Silveira, 2013). Se ha utilizado *in vitro* para inducir estrés hídrico en plantas (Ruf, Eckard y Giffor, 1967; Kaufman y Eckard, 1971).

2.6.5. Aplicaciones

2.1.2.1. Eliminación de virus y viroides

La producción de plantas de alta calidad que puedan certificarse genéticamente y que estén libres de virus se considera una problemática desafiante. Una técnica innovadora de microinjertación fue desarrollada por Murashige et al. (1972) para la producción de plantas uniformes libres de virus a escala comercial en un ambiente controlado. Navarro et al. (1975) mejoraron la técnica probando diversas formulaciones de medios como el uso de diferentes formas de colocar el injerto, diferentes portainjertos, intensidades de luz, diferentes fuentes e informaron la supervivencia máxima de las plantas microinjertadas.

Roistacher et al. (1976) utilizaron la técnica de injerto a partir de brotes, para la producción de material de siembra libre de virus en diversas selecciones de cítricos. Desde entonces, la técnica

de microinjerto se ha utilizado ampliamente para la eliminación de virus, fitoplasmas, patógenos sistémicos en cultivos frutales.

2.1.2.2. Producción de plantas resistentes a plagas y enfermedades

La microinjertación se ha utilizado con éxito en una amplia gama de plantas como un método eficaz para la adquisición de plantas resistentes a patógenos transmitidos por el suelo. Se ha desarrollado un sistema de microinjerto eficiente y robusto para la producción de plantas resistentes a la filoxera en uvas por Kim, Lee, Park y Lee (2005) utilizando cultivares resistentes a plagas como portainjertos. También se ha utilizado el injerto de cítricos en naranja dulce para combatir la podredumbre de la raíz por *Phytophthora* (Wutscher, 1979), y el injerto de *Vitis vinifera* en rizomas (*Vitis labrusca*) para superar la peste de *Phylloxera* (Mudge, Janick, Scofield y Goldschmidt, 2009).

Por un lado, el injerto ha desempeñado un papel fundamental en la propagación de muchas enfermedades importantes de las plantas. Pero, por otro lado, el injerto se ha convertido en el principal medio para superar la mayoría de las epidemias y plagas. Los patógenos de las plantas se propagan en comunidades arbóreas (bosques y plantaciones) a través de injertos (Lev-Yadun, 2011).

2.1.2.3. Multiplicación masiva

El microinjerto es una técnica que puede combinar las ventajas de la multiplicación *in vitro* con la productividad que resulta de combinar injertos y porta injertos. La producción en masa de plantas superiores mediante esta técnica se puede lograr durante todo el año bajo condiciones

controladas en laboratorio, injertando vástagos de élite en portainjertos deseables (Gebhardt y Goldbach, 1988).

2.1.2.4. Intercambio de germoplasma seguro

Las plántulas microinjertadas son una forma conveniente de intercambiar germoplasma entre países (Navarro et al., 1975). El intercambio de material de propagación de árboles frutales entre países es una causa de propagación de nuevas plagas y agentes patógenos, en particular de virus y viroides transmisibles por injertos. El intercambio asociado al material vegetal ha aumentado notablemente el riesgo de introducción de nuevos patógenos y plagas (Llacer, 2009; Llacer et al., 2009).

Las importaciones de yemas de frutos que carecen de medidas de control fitosanitario presentan los riesgos más altos. Se ha informado que más de 100 virus o enfermedades similares afectan a las especies de todo el mundo. Para la mitad de estas enfermedades, no se sabe nada sobre el agente causal, excepto que es transmisible por injerto (Cambra, Flores, Pallás, & Gentit, 2008).

Por tales motivos, en Ecuador, Agrocalidad es el agente regulador encargado de las importaciones, para controlar el material vegetal de propagación y viveros, estado fitosanitario de plantas y productos vegetales que se movilizan dentro del territorio nacional y/o ingresan al país, con el fin de evitar la ocurrencia y diseminación de plagas. También tiene como objetivo la erradicación de plagas de importancia económica, y se realizan análisis de riesgo cuando existe el interés en comercializar plantas de un país de origen sin regulaciones fitosanitarias (Agrocalidad, 2018).

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica de la investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizado en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm.

3.2. Fase de campo

3.2.1 Obtención de la muestra vegetal

El material vegetal que se utilizó fue de una población de 15 estacas (secciones de tallo) del híbrido babaco y 15 plantas de jigacho, de 4 meses de edad y 50 cm de altura, aproximadamente. Provenientes del sector de Patate, provincia de Tungurahua, Ecuador. El lugar de procedencia de las plantas tuvo las siguientes características: temperatura promedio del día fue de 20°C y en la noche de 12°C durante el año, con una humedad relativa promedio anual entre 55-70% y en suelo tipo Molisol (Velásquez, 2008). Las plantas cumplieron con la condición de ser robustas y sanas visiblemente. Fueron mantenidas en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, donde su pretratamiento consistió en una aspersion semanal con 6-BAP en el área apical, a una concentración de 3 mg/L (p/v).



Figura 7. Plantas del género *Vasconcellea* ubicadas en el invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, de 4 meses de edad.

Nota: a) Planta de babaco b) Planta de jigacho.

3.2.2 Recolección de las muestras

Se recolectaron 100 brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*), de 3-5 centímetros de longitud (Figura 8), tamaño establecido por Saha, Phatak y Chandra (2014) para asegurar el buen desarrollo del explante. Las muestras fueron cortadas con ayuda de un bisturí, desinfectado previamente, y se colocaron en un vaso de precipitación, para ser trasladadas al laboratorio.

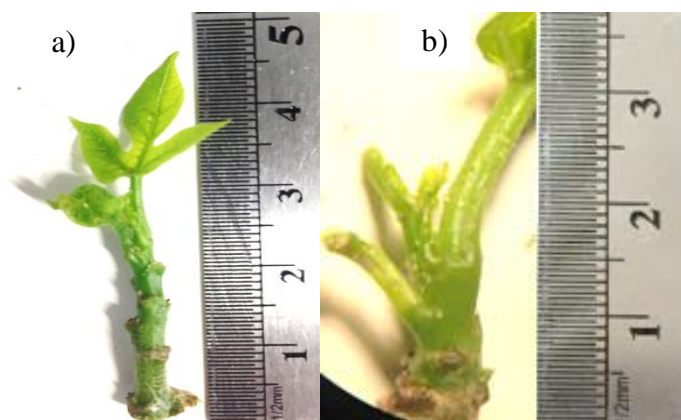


Figura 8. Brotes apicales de 3-5 cm de longitud, seleccionados para ser introducidos *in vitro*.

Nota: a) Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] b) Jigacho (*Vasconcellea stipulata*).

3.3. Fase de laboratorio

3.3.1 Desinfección de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El presente ensayo tuvo el objetivo de eliminar todos los patógenos presentes en el explante. El protocolo aplicado se obtuvo del proceso modificado de Moitreyee (2010) y Chérrez (2015); en el primer caso, se utilizaron brotes apicales de papaya y se obtuvo una cantidad mayor al 70% de explantes viables y sin presencia de fitotoxicidad y, en el segundo caso, se desinfectaron hojas de babaco, y se obtuvo el 75% de explantes sin contaminación y más del 90% de viabilidad. Además, la efectividad del protocolo modificado fue probado por Tituaña (2017), en explantes de babaco. Por ello, los brotes fueron sometidos al siguiente tratamiento, en el orden descrito:

- A) Agua corriente durante 10 minutos
- B) Detergente al 1% (p/v) durante 10 minutos

- C) 3 lavados con agua destilada estéril
- D) Solución de etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto
- E) 3 lavados con agua destilada estéril
- F) Cloruro de mercurio a una concentración de 0.5 g/L durante 5 segundos
- G) 3 lavados con agua estéril
- H) Solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) con 3 gotas/L de Tween 20, durante 5 minutos
- I) 3 lavados con agua destilada estéril

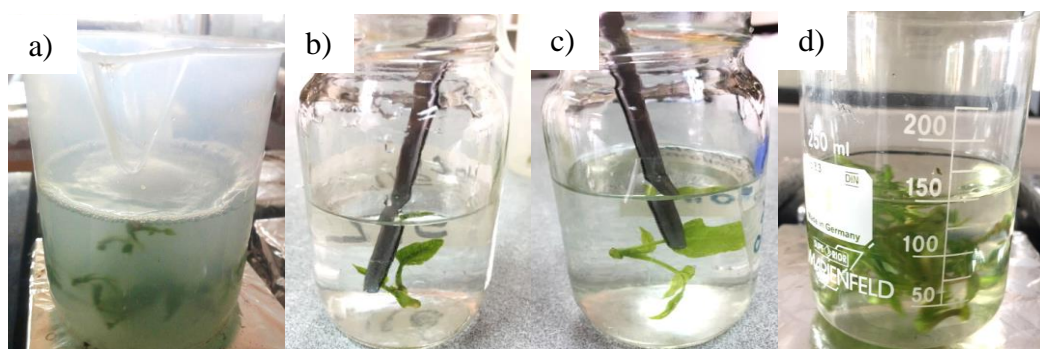


Figura 9. Protocolo de desinfección de brotes de y jigacho.

Nota: a) Detergente al 1% (p/v) b) Etanol al 70% (v/v) c) Cloruro de mercurio al 0,05% d) Hipoclorito de sodio al 1,25% (v/v).

3.3.2 Introducción de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El presente ensayo tuvo como objetivo establecer la dosis óptima de fitohormonas para la introducción de los brotes apicales de las dos especies de interés, para su posterior desarrollo *in*

vitro. Una vez desinfectados los explantes, fueron sembrados en el medio de cultivo conformado por sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), complementado con sacarosa al 3%, auxinas, citoquininas y giberilinas que se muestran en la Tabla 3, el pH fue ajustado a 5.7 - 5.8 con 1 N de HCl o 1 N de NaOH, y por último se añadió agar al 0.8%.

El medio de cultivo fue dispensado en frascos de vidrio de 150 mL de capacidad, dosificados con 25 mL de medio de cultivo. Para asegurar su esterilización fueron autoclavados a una temperatura de 121°C y presión de 104 kPa durante 20 minutos.

En este proceso, se mantuvieron constantes las concentraciones de AIA y 6-BAP, de 0,3 mg/L y 2 mg/L, respectivamente, debido a que promueven el crecimiento de segmentos apicales y estimulan la división celular (Handro & Yokoya, 1997). Para mantener constantes estas concentraciones, se realizaron estudios previos haciendo uso únicamente de los dos fitorreguladores (Anexo D1).

Una vez fijadas las concentraciones de AIA y 6-BAP, se hicieron tratamientos con agua de coco, debido a su actividad de tipo citoquinina que promueve el crecimiento rápido de las células (Arditti, 2008; Yong et al., 2009). Además se varió el AIB, auxina que promueve la división celular (Costa et al., 2017), y se utilizó la giberelina GA₃, que regula la división celular y alargamiento del explante (Sun y Gluber, 2004) (Tabla 3).

Tabla 3

Tratamientos para la introducción de brotes apicales de babaco [Vasconcellea × heilbornii (Badillo) Badillo] y jigacho (Vasconcellea stipulata)

Tratamiento	Agua de coco (% v/v)	Giberelina: GA₃ (mg/L)	Auxina: AIB (mg/L)
Control	-	-	-
B1	-	2	-
B2	-	4	-
B3	10	2	-
B4	10	4	-
B5	10	2	2
B6	10	4	2

La siembra de los explantes se realizó dentro de una cámara de flujo laminar (marca: Esco, procedencia: Singapur), en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Se colocó un explante por frasco, y posteriormente fueron almacenados a una temperatura de 19-23°C con un fotoperíodo de 16 horas con luz de 3000 luxes de intensidad, y humedad relativa de 25%.

A los 21 días de haber introducido los explantes en el medio de cultivo, se evaluaron tres variables: viabilidad, presencia de callo y longitud.

Viabilidad. Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes, y se asignó el valor de “0” a los explantes que presentaron necrosis u oxidación, y el valor de “1” con coloración verde clara.

Presencia de callo. Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes, y se asignó el valor de “0” a los explantes que no presentaron formación de callo, y el valor de “1” a los explantes con presencia del mismo.

Longitud. Esta variable fue medida con la ayuda de una regla, a cada uno de los brotes introducidos.

La unidad experimental fue cada brote introducido en un frasco de vidrio con 25 mL de medio de cultivo, y se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento. Se empleó un análisis exploratorio de datos con gráficas, e inferencial con pruebas de chi cuadrado de Pearson para las variables categóricas, y pruebas no paramétricas para variables cuantitativas, utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2008).

3.3.3 Enraizamiento de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El presente ensayo tuvo como objetivo establecer la dosis óptima de fitohormonas para el enraizamiento de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*), obtenidos en la etapa anterior. Luego de los 21 días de haber estado en el medio de cultivo introducción, los explantes fueron trasladados al medio de cultivo de enraizamiento, conformado por sales MS al 50% y vitaminas MS, complementado con sacarosa al 4% y la auxina AIB. El pH fue ajustado a 5.7 - 5.8 con 1 N de HCl o 1 N de NaOH, y por último se añadió agar al 0.8%.

Este protocolo fue establecido, debido a estudios realizados previamente, donde se utilizaron medios con carbón activado, concentraciones bajas de 6-BAP y altas de AIA, además se estableció una metodología basada en elevar la cantidad de auxinas y luego de unos días reducirla o dejarla en nulo, sin embargo, estas pruebas no mostraron cambios en el explante (Anexo D2).

Por ello se estableció el uso de AIB, debido a que promueve la formación de raíces (Hartmann, Kester, Davies y Geneve, 1997) (Tabla 4).

Tabla 4

*Tratamientos para el enraizamiento de brotes apicales de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)*

Tratamiento	AIB (mg/L)
Control	-
C1	2
C2	4
C3	6

El cambio de medio de los explantes se realizó dentro de una cámara de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Se colocó un explante por frasco, y posteriormente fueron almacenados a una temperatura de 19-23°C con un fotoperíodo de 16 horas con luz de 3000 luxes de intensidad, y humedad relativa de 25%.

A los 7, 15 y 30 días de haber realizado el cambio de medio de los explantes, se evaluaron dos variables: presencia de callo y sistema radical.

Presencia de callo. Esta variable fue medida mediante observación de la base de cada uno de los explantes, y se asignó el valor de “0” a los explantes que no presentaron formación de callo, y el valor de “1” a los explantes con presencia del mismo.

Sistema radical. Para la presente variable se estableció una escala de valores, de cero a tres. El valor de “0” significa ausencia de raíces, “1” raíces cortas (2-4 mm), “2” raíces medianas (5-6 mm), “3” raíces largas (7-10 mm).

La unidad experimental fue cada brote introducido en un frasco de vidrio con 25 mL de medio de cultivo. Se empleó un análisis exploratorio de datos con gráficas, e inferencial con pruebas de chi cuadrado de Pearson para las variables categóricas, utilizando el software estadístico InfoStat.

3.3.4 Microinjertación *in vitro* de brotes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El presente ensayo tuvo como objetivo definir el pretratamiento de inmersión adecuado para los brotes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] y el corte apropiado de los explantes para la microinjertación *in vitro* en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*).

Se utilizaron los brotes obtenidos *in vitro*, de 51 días de edad, 4 cm de longitud, y con 2-3 hojas aproximadamente. Se probaron dos protocolos, el de Navarro et al. (1975) y el de Mosella y Ascui (1985). Sin embargo, se hizo énfasis en la primera técnica debido al estudio realizado por Criollo (2008), quien evaluó los dos métodos mencionados, para la microinjertación de babaco y chihualcán en patrones de papaya, y al usar el segundo procedimiento no obtuvo prendimiento de los ápices en ninguna de las dos especies, a diferencia de la primera. Además, Navarro et al. (1975) lograron hasta el 70% de injertos prendidos en cítricos, mientras que Mosella y Ascui (1985) lograron el 40% de injertos prendidos en plantas de durazno.

La técnica de Mosella y Ascui (1985) es una modificación a la realizada por Navarro et al. (1975). El cambio se da al momento de la decapitación del patrón, la cual se realiza *in situ*. Además se hace un tratamiento previo al injerto. Inicialmente se decapitaron los patrones de jigacho, y de la misma

manera se cortaron los ápices cerca de la zona meristemática. Los cortes realizados fueron en V, T y recto. El corte en T-invertida (Figura 13), se realizó mediante dos cortes perpendiculares, de 1mm de longitud aproximadamente, en la corteza del patrón sin llegar a la médula. Posterior a ello, los injertos fueron pretratados, es decir, se colocaron en papel filtro humedecido con solución de sales MS (2.4 g/l), AIA (30 mg/L) y sacarosa (15g/l) (Figura 10), esterilizados previamente con el fin de mantener las condiciones asépticas. Los tratamientos realizados en la presente técnica se muestran en la tabla 5:

Tabla 5

Tratamientos establecidos para la etapa de microinjertación in vitro de brotes de babaco en patrones de jigacho, de acuerdo a la técnica establecida por Mosella y Ascui (1985).

Tratamiento	Tipo de corte	Tiempo de pretratamiento
C1	T	0 mins
C2	V	0 mins
C3	Recto	0 mins
J1	T	2 mins
J2	V	2 mins
J3	Recto	2 mins
J4	T	20 mins
J5	V	20 mins
J6	Recto	20 mins
J7	T	24 h
J8	V	24 h
J9	R	24 h



Figura 10. Ápice de babaco colocado en papel filtro, al momento de su pretratamiento, observado en el estéreo microscopio (3X) (marca: Leica, procedencia: Alemania).

Cabe mencionar que la técnica de Mosella y Ascui (1985) se realizó inicialmente como una verificación a los resultados obtenidos en estudios anteriores. Y de acuerdo a lo obtenido, se planteó el uso de la metodología descrita por Navarro et al. (1975), donde los patrones fueron decapitados cerca de la zona meristemática (Figura 11), y los injertos fueron aislados haciendo cortes cerca del ápice, desde la parte externa hacia el interior, en la zona de separación subapical y las hojas, esta acción se repitió hasta obtener un ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y primordios foliares, que midieron cerca de 0,2-0,3 mm y de 0,7-1 mm de grosor (Figura 12).

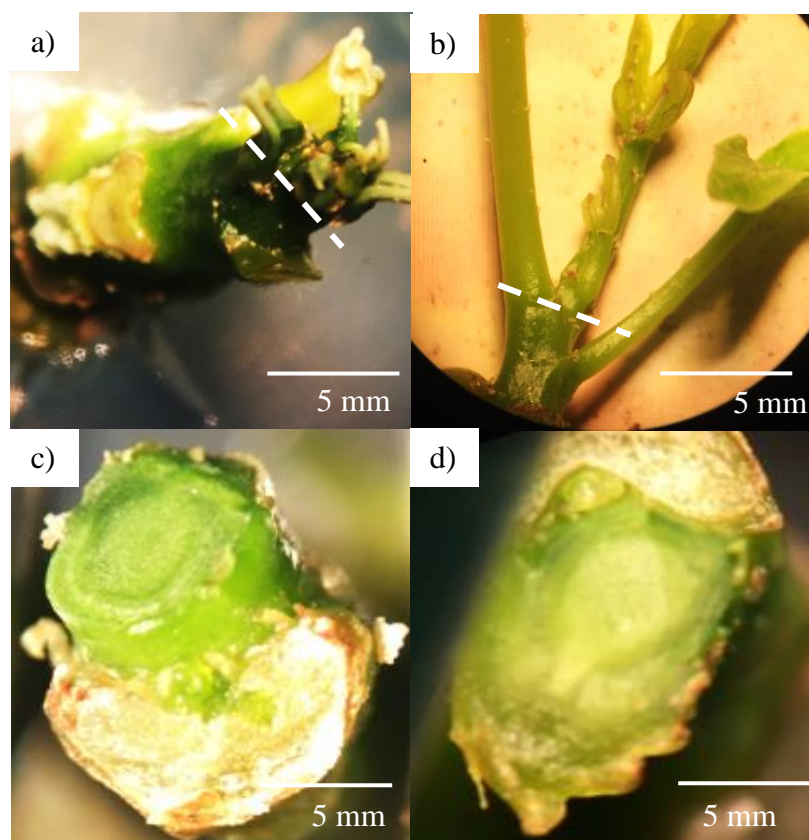


Figura 11. Preparación de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*) observados en el estéreo microscopio (3X).

Nota: a) y b) Explantes a ser decapitados, las líneas entrecortadas representan el sitio de corte c) y d) Patrón decapitado

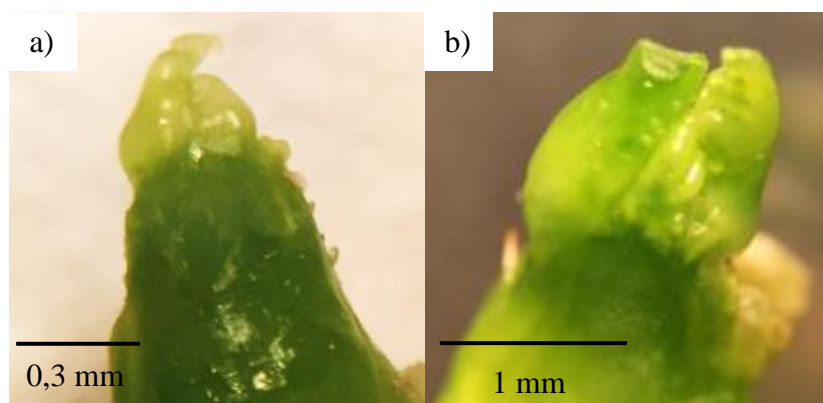


Figura 12. Injertos de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] observados en el estéreo microscopio (3X), aislados con un ápice caulinar compuesto por el meristemo apical y primordios foliares.

Nota: a) 0,2-0,3 mm b) 0,7-1 mm de grosor.

Para la unión de las dos especies, el injerto fue colocado sobre la médula del patrón, y se realizaron diferentes tratamientos haciendo uso de PEG, con el fin de promover la agregación y fusión celular (Schuabb et al., 2013) (Tabla 6).

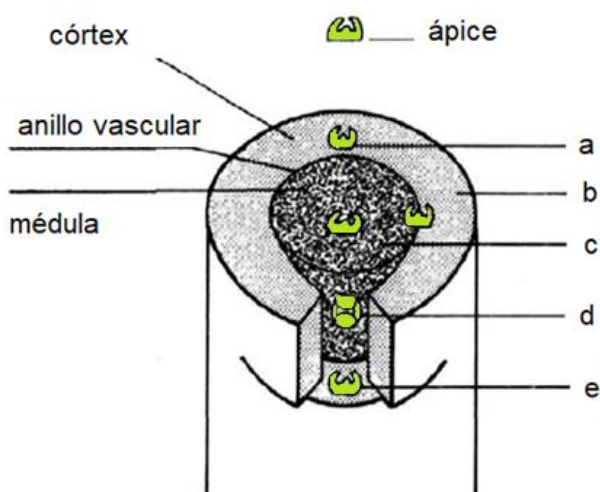


Figura 13. Esquema de los diferentes tipos de injerto

Fuente: (Navarro et al., 1975)

Para los dos procesos, los brotes microinjertados *in vitro* fueron colocados en el medio de cultivo conformado por sales MS, vitaminas MS, complementado con sacarosa al 3%, el pH fue ajustado a 5.7 - 5.8 con 1 N de HCl o 1 N de NaOH, y por último se añadió agar al 0.8%. Todo el procedimiento se realizó dentro de una cámara de flujo laminar en condiciones totalmente asépticas, con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación. Se colocó una planta microinjertada por frasco, y posteriormente fueron almacenados a una temperatura de 19-23°C.

Tabla 6

Tratamientos establecidos para la etapa de microinjertación in vitro de brotes de babaco en patrones de jigacho, de acuerdo a la técnica establecida por Navarro et al. (1975)

Tratamiento	PEG	Pre-tratamiento (20 mins)	Sales MS
J (control)	No	No	100 %
J1	Si	Si	100%
J2	Si	Si	50%
J3	No	Si	100%
J4	No	Si	50%
J5	Si	No	100%
J6	Si	No	50%
J7	No	No	50%

A los 7, 15 y 30 días de haber realizado el cambio de medio de los explantes, se evaluaron las siguientes variables:

Prendimiento. Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes, y se asignó el valor de “0” a los injertos prendidos, “1” a los injertos no prendidos con ápice muerto y “2” a los injertos no prendidos con ápice cubierto por callo.

Presencia de callo en el sitio de unión: Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes, y se asignó el valor de “0” a los explantes que no formaron callo, y el valor de “1” a los que si formaron callo en el sitio de unión del injerto y el patrón.

Número de hojas: La variable fue medida mediando conteo del número de hojas presentes en al ápice injertado y en el patrón.

Tamaño del injerto: Esta variable fue medida con ayuda de una regla, desde el sitio de unión, hasta la terminación del brote.

La unidad experimental fue cada explante introducido en un frasco de vidrio con 25 mL de medio de cultivo, y se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento. Se empleó un análisis exploratorio de datos con gráficas, e inferencial con pruebas de chi cuadrado de Pearson para las variables categóricas, utilizando el software estadístico InfoStat (versión 2008).

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Introducción de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

Para los brotes apicales de jigacho y babaco, se realizó la tabla de contingencia (tabla 9), de acuerdo a los resultados obtenidos en el Anexo A1 y A2. Cabe mencionar que los explantes viables fueron aquellos que presentaron coloración verde limón, además de verse sanos y con presencia de 2-3 hojas (Figura 14a y 15a), mientras que, los no viables fueron aquellos cubiertos completamente por callo (Figura 14b y 15 b) y los que presentaron oxidación en la zona apical (Figura 14c y 15c), es decir, lo que no pudieron continuar a la etapa posterior.

Se obtuvo, en los brotes apicales de jigacho que, en los tratamientos B2 y B3, al disminuir la cantidad de GA3 y añadir agua de coco al medio de cultivo, la cantidad de explantes con presencia de callo y la longitud se incrementaron, pero la viabilidad permaneció constante. Al visualizar el comportamiento de los tratamientos B1 y B3, se pudo deducir que, los explantes sometidos a concentraciones de 4 mg/L de GA3, obtuvieron longitudes superiores; sin embargo, el tratamiento B6 en presencia además de AIB no cumplió con el comportamiento descrito. Asimismo, la presencia de callo se vio aumentada con el uso de agua de coco y concentraciones altas de GA3 de 4 mg/L (Figura 16).

En los brotes de babaco, al comparar los tratamientos B4 y B5, se vio que cuando al medio de cultivo se le adicionó AIB, y 2 mg/L de GA3, bajó la cantidad de explantes con presencia de callo, a pesar de ello, la longitud y viabilidad no se vieron afectadas. Con los tratamientos B1 y B6, se pudo deducir que al incrementar la concentración de GA3 y en presencia de AIB y agua de coco,

se da un posible efecto negativo en cuanto a la longitud de los explantes, y la presencia de callo de los mismos. En la Figura 17, se observó que, la presencia conjunta de AIB y GA3 en el medio de cultivo, disminuyen la cantidad de explantes con presencia de callo (tratamientos B5 y B6). Sin embargo, en presencia únicamente de GA3, la longitud y viabilidad se incrementaron (tratamiento B2), pero, al añadir agua de coco, aumentó la cantidad de explantes con presencia de callo. Al incorporar AIB al medio de cultivo, además de verse afectada la presencia de callo, también disminuyó la longitud de los explantes (tratamientos B5 y B6). La cantidad de explantes viables, la longitud, y la cantidad de GA3, tuvieron un efecto directo, debido a que, al aumentar la cantidad de GA3 el porcentaje de explantes viables y su tamaño se elevaron (tratamientos B2 y B4) (Figura 17).

En las dos especies, se verificó en el grupo control que, la presencia de giberelinas es necesaria para la viabilidad de los explantes, además de que su ausencia resultó en explantes con longitudes bajas. Asimismo, se seleccionó al tratamiento B2 como el más adecuado, debido a que su longitud y viabilidad fueron superiores a los demás tratamientos, y la cantidad de explantes con presencia de callo fue aceptable. Un comportamiento observado en los brotes de las dos especies, es que, a los 15 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo, los explantes presentaron defoliación, y posterior a ello, la presencia de exudado en la zona descubierta.

Para complementar lo obtenido, se realizó un análisis inferencial, a través de la prueba chi cuadrado para las variables categóricas “viabilidad” y “presencia de callo”, donde se obtuvo que, en los explantes de jigacho y babaco, no hubo relación de dependencia entre el tratamiento y la variable, es decir que, la concentración de fitorreguladores no jugó un papel importante en la viabilidad y presencia de callo de los explantes de babaco.

No obstante, para la variable cuantitativa “longitud”, se realizó la prueba estadística de Tukey, y en el jigacho se obtuvo que los tratamientos: control, B1, B2, B3 y B3, así como B2, B3, B4, B5 y B6 no presentaron diferencias significativas entre ellos; mientras que, en los explantes de babaco, ningún tratamiento presentó diferencias significativas, sus longitudes fueron similares. Puesto que, la variable longitud fue cuantitativa, se realizó la prueba estadística de Shapiro Wilk, con el fin de contrastar la normalidad de los datos obtenidos, y en las dos especies se asumió que, la muestra no proviene de una población con distribución normal. Una vez comprobado que los resultados obtenidos provenían de una distribución no normal, se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, y se verificó lo obtenido en la prueba de Tukey, que las longitudes obtenidas en cada tratamiento no son significativamente diferentes, para el babaco; y si para el jigacho (Tabla 8).

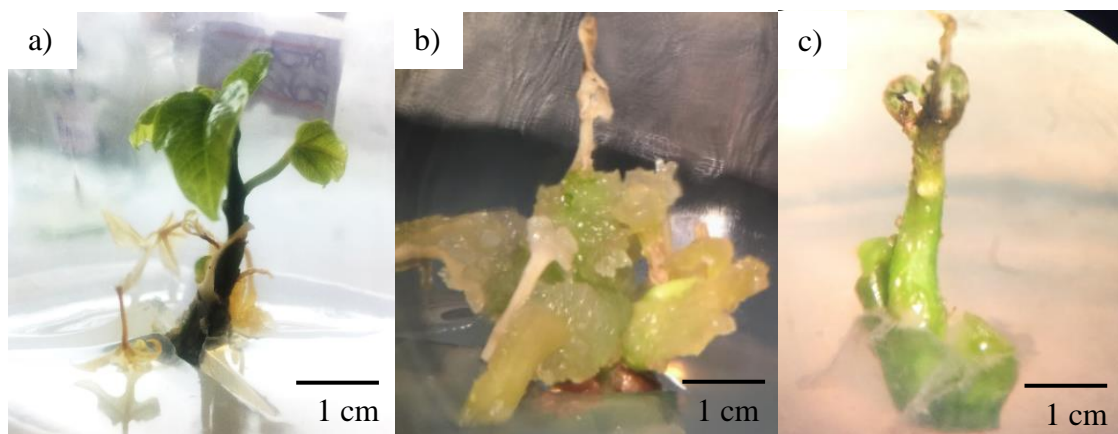


Figura 14. Brotes apicales de jigacho, observados en el estéreo microscopio (3X), a los 21 días de ser introducidos en el medio de cultivo.

Nota: a) Brote viable con coloración verde limón b) Brote no viable con presencia completa de callo c) Brote no viable con oxidación en la zona apical

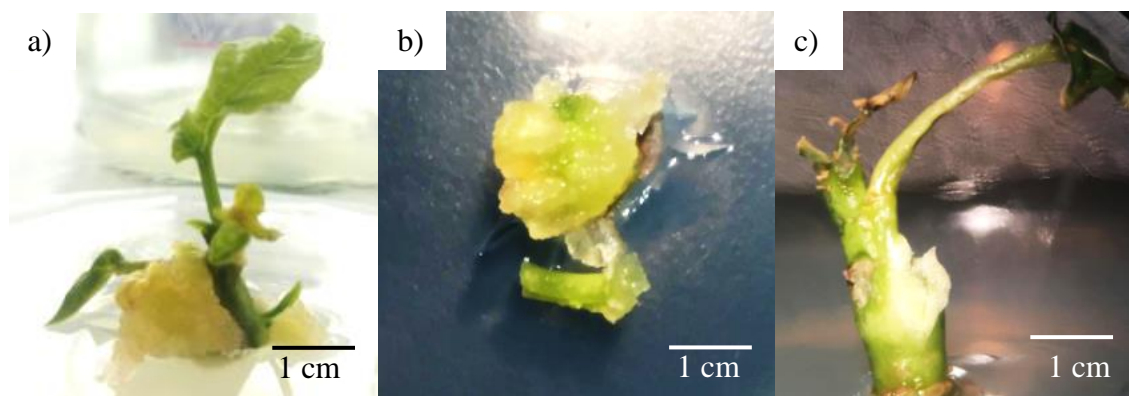


Figura 15. Brotes apicales de babaco, observados en el estéreo microscopio (3X), a los 21 días de ser introducidos en el medio de cultivo.

Nota: a) Brote viable con coloración verde b) Brote no viable con presencia completa de callo c) Brote no viable con oxidación en la zona apical

Tabla 7

*Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de jigacho y babaco, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo *.*

	Tratamiento	Explantos viables (%)	Explantos con presencia de callo (%)	Longitud promedio del explante (cm)
Jigacho	Control	30	40	3,57 (A)
	B1	80	50	3,7 (A)
	B2	70	30	3,87 (A)(B)
	B3	70	60	3,8 (A)(B)
	B4	80	80	4 (B)
	B5	70	50	4 (B)
	B6	70	70	3,77 (A)(B)
Babaco	Control	40	50	3,64 (C)
	B1	60	60	3,7 (C)
	B2	80	50	3,81 (C)
	B3	50	60	3,6 (C)
	B4	70	70	3,56 (C)
	B5	70	60	3,57 (C)
	B6	60	50	3,59 (C)

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

*Tratamientos: **Control** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP); **B1** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +2 mg/L de GA3); **B2** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +4 mg/L de GA3); **B3** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +10% v/v agua de coco+2 mg/L de GA3); **B4** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +10% v/v agua de coco+ 4 mg/L de GA3); **B5** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +10% v/v agua de coco+ 2 mg/L de GA3+ 2 mg/L de AIB); **B6** (0,3 mg/L de AIA+ 2 mg/L de 6-BAP +10% v/v de agua de coco+ 4 mg/L de GA3+ 2 mg/L de AIB).

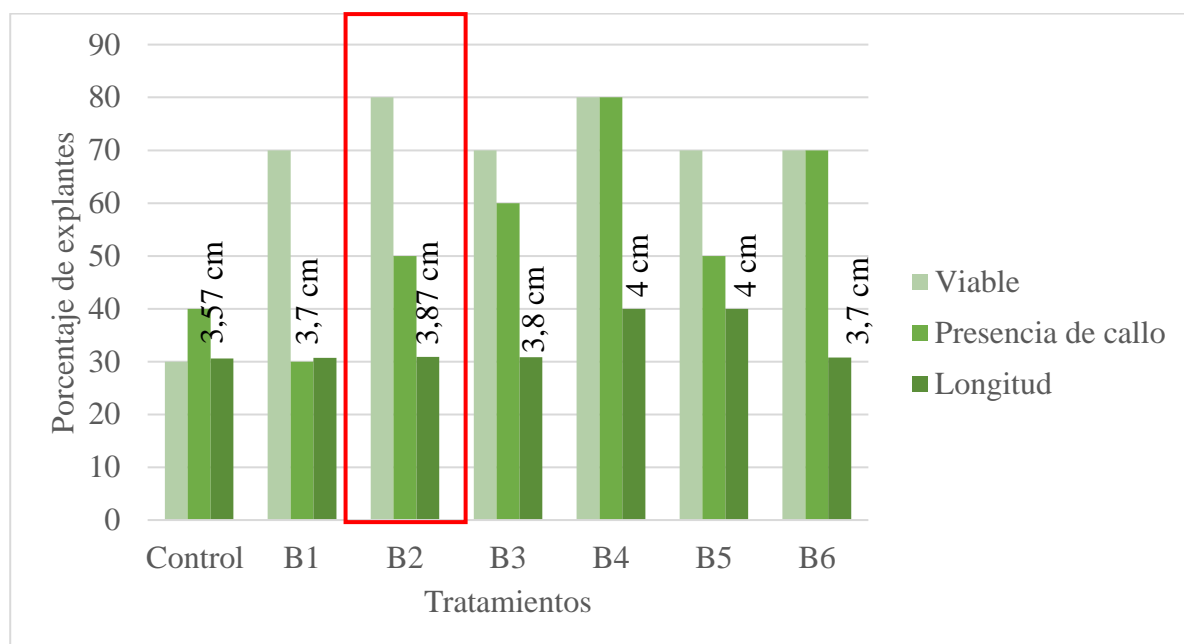


Figura 16. Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de jigacho, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

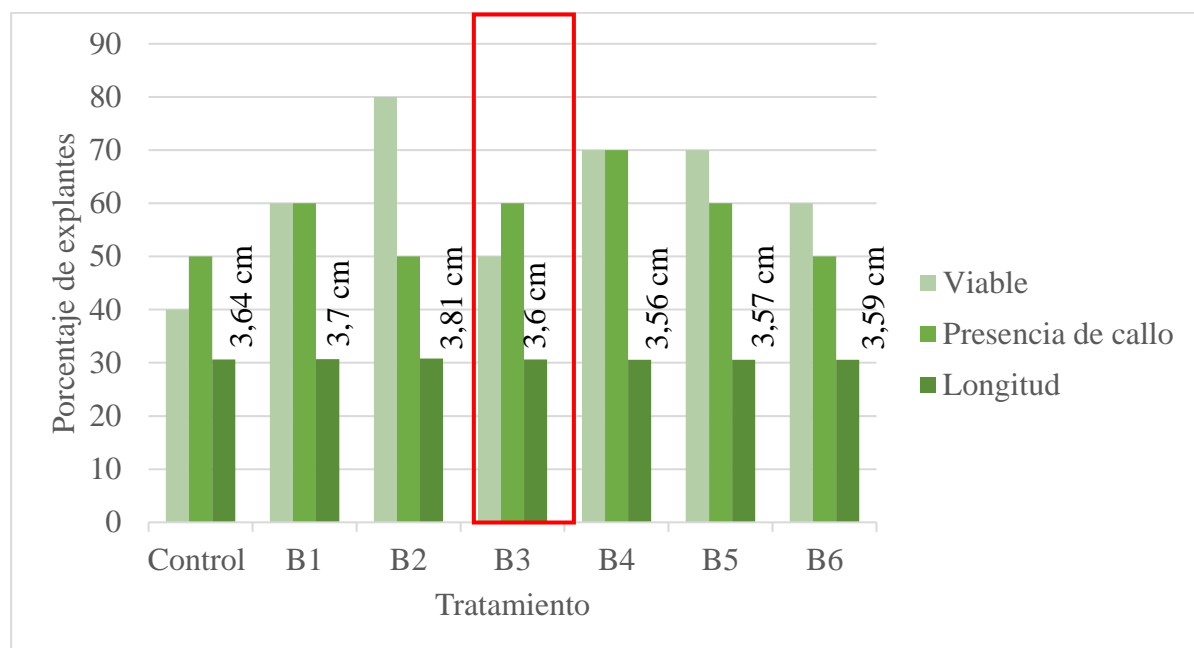


Figura 17. Resultados de las variables analizadas en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco, en los diferentes tratamientos, a los 21 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

Tabla 8

Pruebas estadísticas realizadas de los resultados obtenidos en la etapa de introducción de brotes de babaco y jigacho, a los 21 días de haber sido introducidos en medio de cultivo.

Especie	Chi-cuadrado		Shapiro Wilk	Kuskal Wallis
	Viabilidad (p valor)	Presencia de callo (p valor)	Longitud (p-valor)	Longitud (p-valor)
Jigacho	0,9940	0,3086	0,00003	0,0007
Babaco	0,8697	0,9659	0,0197	0,5314

4.2 Enraizamiento de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

Se realizó la tabla de contingencia en base a los resultados obtenidos en el Anexo B1. En la tabla 10, se observó que a los 7 días, el tratamiento C1 presentó el mayor número de explantes con presencia de callo (40%), mientras que los tratamientos C2 y C3 obtuvieron la misma cantidad

de explantes con presencia de callo (30%). Los cambios representativos se empezaron a generar a partir del día 15, donde se comprobó además que, a medida que disminuye la cantidad de AIB, el porcentaje de explantes con presencia de callo se incrementa, y este comportamiento se mantuvo constante hasta el día 30. Al comparar con el grupo control, el cual no tuvo explantes con presencia de callo, se pudo deducir que, la fitohormona utilizada, el AIB, fue primordial en la formación de callo, como se observó en el resto de tratamientos. Otro comportamiento observado, fue que, al pasar los días la cantidad de callo en el explante fue incrementando (Figura 18).

Debido a que la variable analizada fue categórica, se realizó la prueba estadística de chi-cuadrado de Pearson (Tabla 10). A los 7 días, se observó una relación de dependencia entre el tratamiento y la presencia de callo, mientras que, a los 15 y 30 días se rechazó la hipótesis nula, porque los p valores obtenidos fueron menores al valor de significancia (5%), lo que pareció indicar que si hubo relación de dependencia entre el tratamiento y la presencia de callo, pero la relación de dependencia fue inversa, como se mencionó anteriormente, a medida que aumentó la auxina, la cantidad de explantes con presencia de callo disminuyó.

De acuerdo a lo mencionado, se fijó al tratamiento C1 como el más apropiado para esta etapa, debido a que promovió a la formación adecuada callo, que fue uno de los objetivos establecidos en esta etapa.

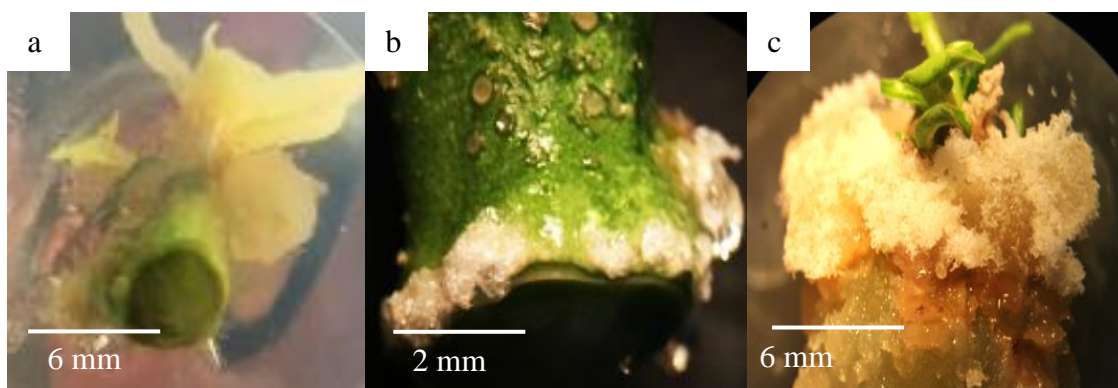


Figura 18. Patrones de jigacho en el medio de enraizamiento, observados en el estéreo microscopio (3X).

Nota: a) 7 días b) 15 días c) 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

Tabla 9

Resultados de la variable “presencia de callo” de los explantes de jigacho en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

	7 días		15 días		30 días	
	Presencia de callo (%)	Ausencia de callo (%)	Presencia de callo (%)	Ausencia de callo (%)	Presencia de callo (%)	Ausencia de callo (%)
C	0	100	0	100	0	100
C1	40	60	70	30	70	30
C2	30	70	60	40	60	40
C3	30	70	50	50	50	50

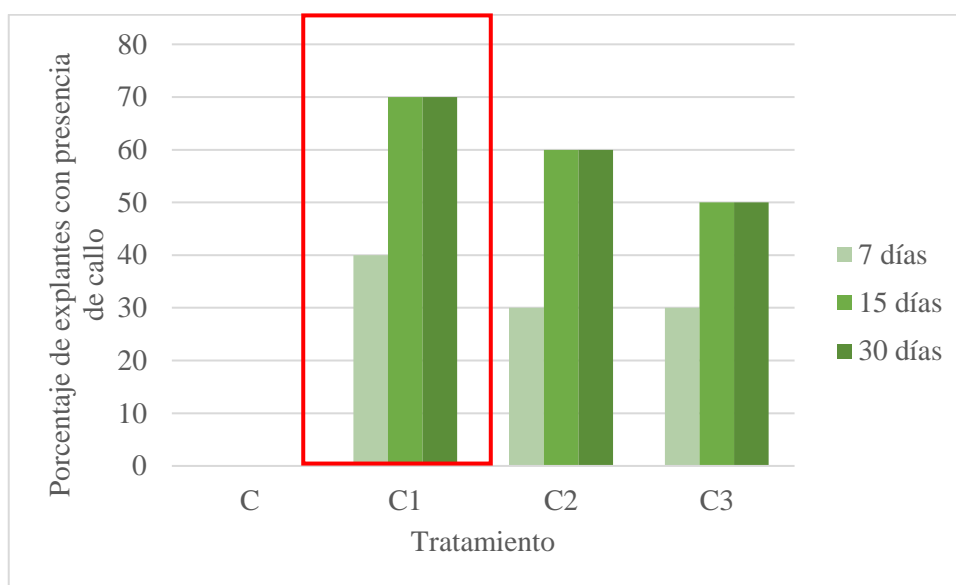


Figura 19. Número de explantes de jigacho con presencia de callo en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días. Tratamientos: C1 (2 mg/L de AIB); C2 (4 mg/L de AIB); C3 (6mg/L de AIB).

Tabla 10

Prueba chi-cuadrado Pearson para la variable “presencia de callo” de los resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de brotes de jigacho

Días	Valor	gl	p
7	4,80	3	0,1870
15	11,72	3	0,0014
30	8,32	3	0,0398

4.3 Microinjertación *in vitro* de brotes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo)

Badillo] en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

Al realizar la técnica de Mosella y Ascui (1985), se obtuvo el 0% de viabilidad de los microinjertos, a los 20 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo, sin embargo, se demostró que los ápices que fueron sometidos al pretratamiento de 20 minutos, corte recto y de 1

mm de grosor aproximadamente, duraron más días que el resto de explantes (anexo C, figura 28). Lo mencionado, se verificó con homo injertos de babaco, realizados con el fin de estandarizar el protocolo, que posteriormente se aplicó a la técnica de Navarro et al. (1975) (resultados no mostrados).

Con la técnica de Navarro et al. (1975), a los 7 días (Figura 23), se observó que los tratamientos J4, J6 y J7 presentaron la mayor cantidad de injertos prendidos, y la similitud entre ellos fue la concentración de sales MS al 50%. Sin embargo, el tratamiento J2, no cumplió con este comportamiento, y se atribuyó al pretratamiento al que fueron sometidos los ápices y al uso de PEG. De lo mencionado se pudo concluir que, el pretratamiento realizado a los injertos y el uso de PEG, no mostraron ser factores influyentes en el prendimiento, debido a que los explantes sometidos a estos tratamientos, obtuvieron la mayor cantidad de injertos no prendidos con ápices muertos (tratamientos J1, J2 y J3), incluso al utilizar únicamente PEG sin pretratamiento, se obtuvo la mayor cantidad de injertos no prendidos cubiertos por callo (tratamientos J5 y J4). Además, el número promedio de hojas se vio incrementado al utilizar sales MS al 50%, y de la misma manera el tamaño promedio del explante. Asimismo, se observó en todos los tratamientos la presencia de callo en el sitio de unión, lo cual, se consideró como un comportamiento normal en esta etapa (Tabla 8).

A los 15 y 30 días (Figura 24 y Figura 25), los resultados obtenidos fueron similares, la frecuencia de injertos prendidos se redujo al 0%, se incrementó la cantidad de injertos no prendidos con ápice muerto, y los no prendidos con ápice cubierto por callo, excepto en el tratamiento J7. La única variable que permaneció constante en todos los tratamientos fue la presencia de callo en el sitio de unión. Además, se observó que la cantidad de injertos no prendidos con ápice cubierto por callo y la presencia de callo en el sitio de unión, tuvieron la misma respuesta, y fueron

proporcionales, en todos los tratamientos. Estos comportamientos, se atribuyeron además a la ausencia de hojas y a la longitud de 0 mm de los injertos, ya que estuvieron cubiertos completamente por callo.

Sin embargo, a los 30 días el número promedio de hojas y el tamaño promedio de la longitud del injerto, se incrementó únicamente en el tratamiento J7, que fue el único que tuvo injertos prendidos, y en este día se demostró la supervivencia de los explantes, y el éxito de la injertación y compatibilidad en el 30% de los explantes del tratamiento J7.

Para complementar lo obtenido, se realizó un análisis inferencial (Tabla 12), a través de la prueba estadística de chi cuadrado de Pearson para las variables categóricas “prendimiento” y “presencia de callo”, donde se obtuvo lo mismo para las dos variables, que hubo relación de dependencia entre el tratamiento y la variable analizada.

No obstante, para la variable cuantitativa “numero promedio de hojas” y “tamaño del injerto”, se realizó la prueba estadística de Tukey (Tabla 11), donde el tratamiento J7 fue el único que presentó una diferencia significativa a los demás tratamientos, a partir del día 15, y se mantuvo hasta el día 30. Puesto que, las variables “Número de hojas” y “Tamaño del explante” fueron cuantitativas, se realizó la prueba estadística de Shapiro Wilk, con el fin de contrastar la normalidad de los datos obtenidos, y se asumió que, las muestras no provienen de una población con distribución normal. Una vez comprobado que los resultados obtenidos provenían de una distribución no normal, se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, y se verificó lo obtenido en la prueba de Tukey, a partir del día 15 el tratamiento J7 tuvo resultados significativamente diferentes a los demás tratamientos (Tabla 12).

De acuerdo a lo obtenido, se estableció al tratamiento J7 como el adecuado, ya que logró el objetivo planteado en la presente etapa, ya que fue el único tratamiento con injertos prendidos, y con el cual se demostró la compatibilidad entre babaco y jigacho.

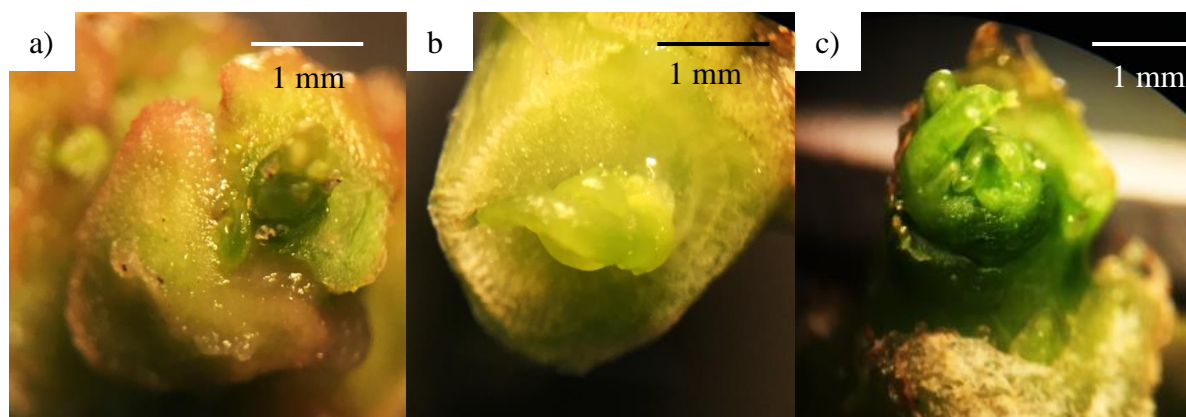


Figura 20. Brotes apicales de babaco, a las 24 horas de haber sido microinjertados en los patrones de jigacho, e introducidos en el medio de cultivo.

Nota: a) Brote de 0,3 mm b) Brote de 0,5 mm c) Brote de 1 mm de grosor.

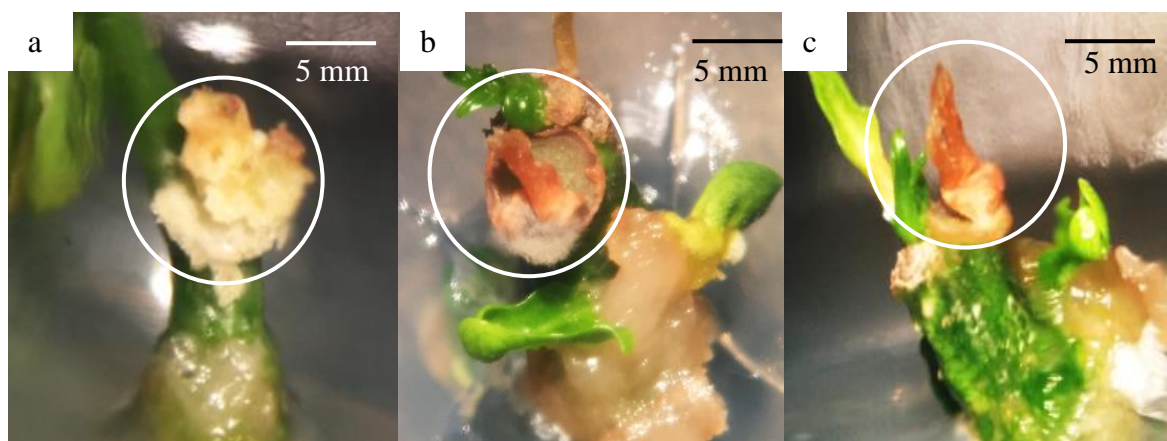


Figura 21. Resultados de la variable “prendimiento” de los brotes apicales de babaco microinjertados en patrones de jigacho, a los 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

Nota: a) Injerto no prendido con ápice cubierto por callo b) Injerto no prendido con presencia de hongo c) Injerto no prendido con ápice muerto.

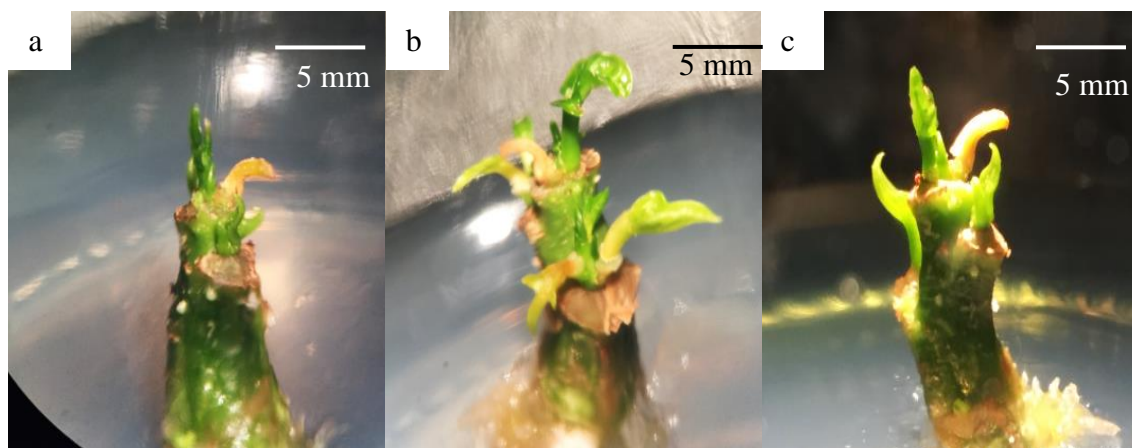


Figura 22. Microinjertos exitosos de brotes apicales de babaco en patrones de jigacho, observados a los 30 días, en el estéreo microscopio (3X).

Tabla 11

Resultados de la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho a los 7, 15 y 30 días.*

Tratamiento	7 días					
	Prendimiento (%)			Presencia de callo en el sitio de unión (%)	Número promedio de hojas (%)	Tamaño promedio del injerto (mm)
	0	1	2			
J	30	30	40	70	1	1,1 (A)
J1	20	60	20	40	1	0,7 (A)
J2	30	50	20	50	1	1,2 (A)
J3	30	50	20	50	1	1,1 (A)
J4	40	20	40	80	2	1,5 (A)
J5	10	40	50	60	1	0,3 (A)
J6	40	30	30	70	2	1,4 (A)
J7	70	30	0	70	3	2,4 (A)
15 días						
J	0	40	60	60	0	0 (C)
J1	0	70	30	30	0	0 (C)
J2	0	70	30	30	0	0 (C)
J3	0	60	40	40	0	0 (C)
J4	0	20	80	80	0	0 (C)

J5	0	50	50	50	0	0 (C)
J6	0	60	40	40	0	0 (C)
J7	30	20	50	70	1	1 (B)
30 días						
J	0	40	60	60	0	0 (D)
J1	0	70	30	30	0	0 (D)
J2	0	70	30	30	0	0(D)
J3	0	60	40	40	0	0 (D)
J4	0	20	80	80	0	0 (D)
J5	0	50	50	50	0	0 (D)
J6	0	60	40	40	0	0 (D)
J7	30	20	50	80	2	2 (E)

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

*Tratamientos: **J1** (PEG+Pretratamiento+ sales MS100%); **J2** (PEG+pretratamiento+ sales MS 50%); **J3** (Pretratamiento+ sales MS 100%); **J4** (pretratamiento+ sales MS 50%); **J5** (PEG+ sales MS 100%); **J6** (PEG+ sales MS 50%); **J7** (sales MS 50%).

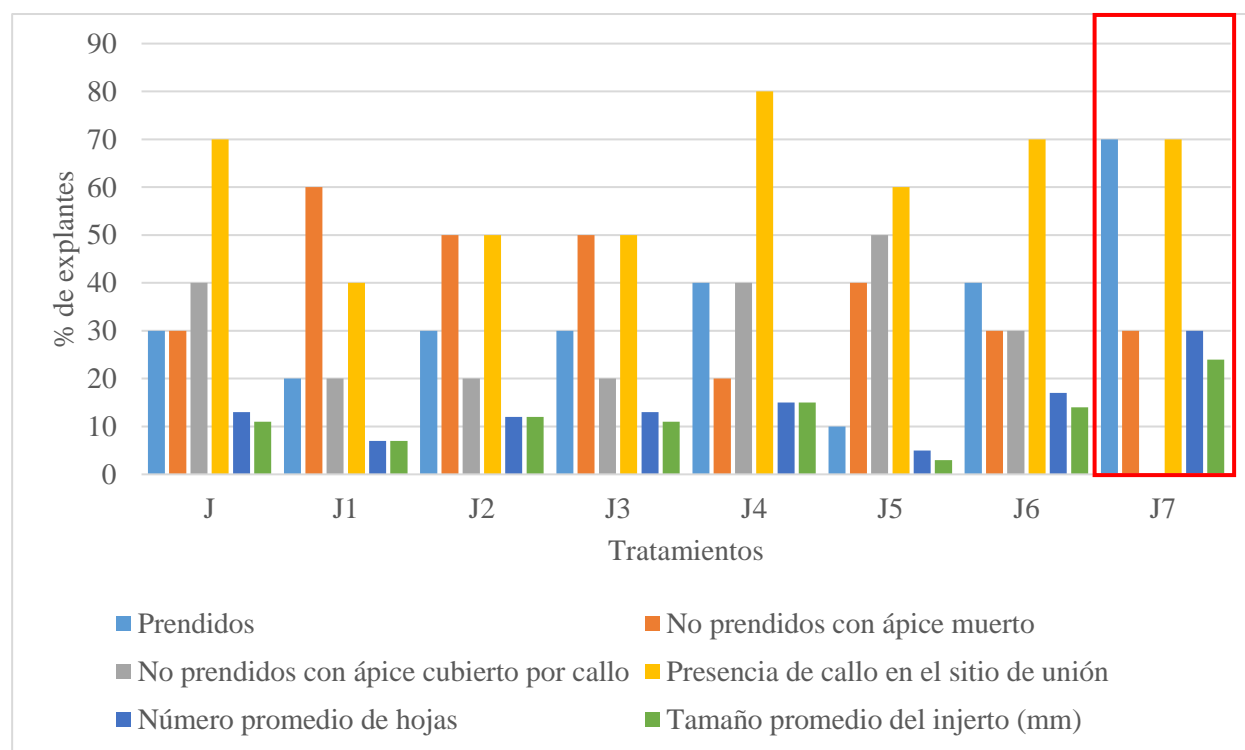


Figura 23. Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho, a los 7 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

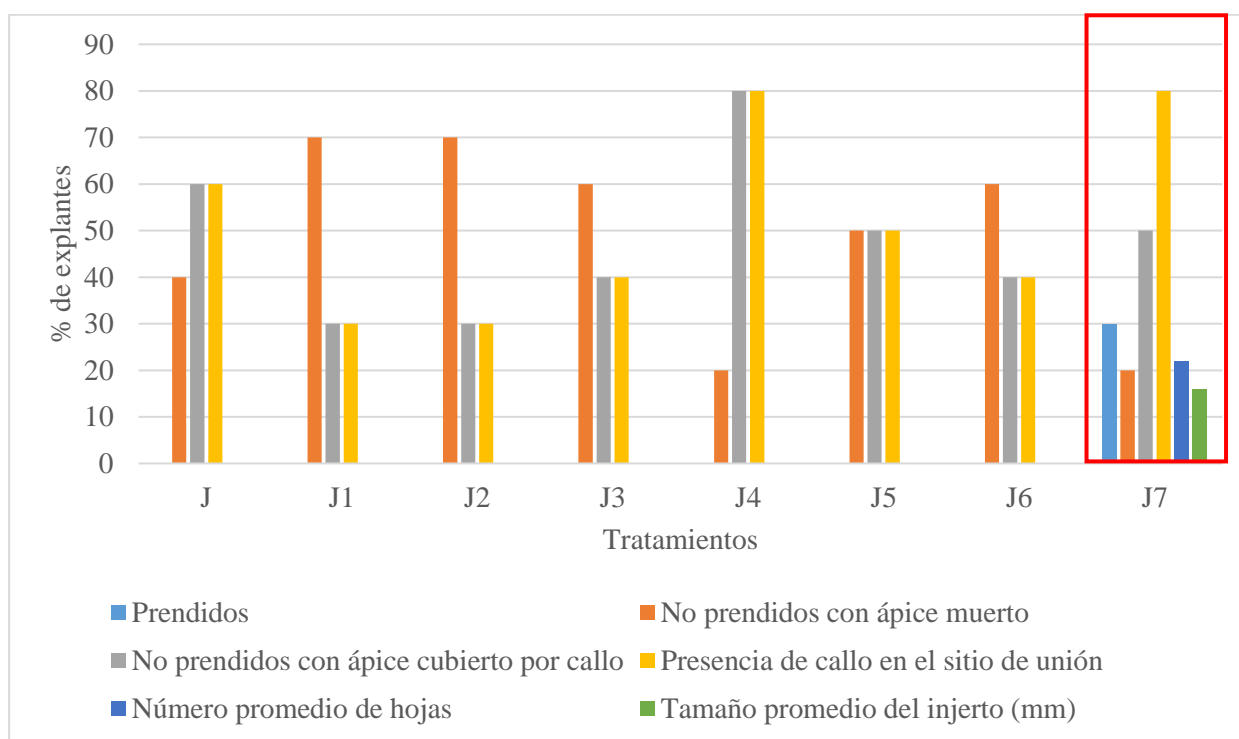


Figura 24. Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho, a los 15 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

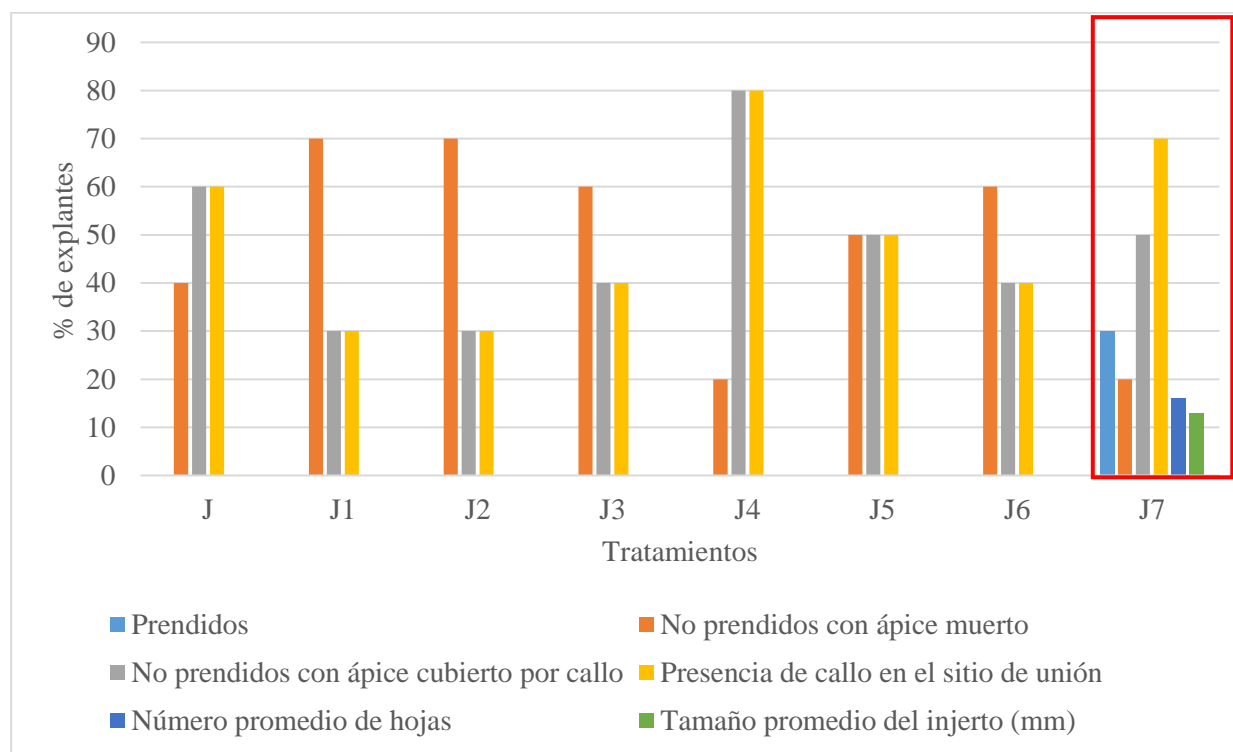


Figura 25. Porcentaje de explantes obtenidos en cada una de las variables analizadas, en los diferentes tratamientos, en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho, a los 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo.

Tabla 12

Pruebas estadísticas realizadas de los resultados obtenidos en la etapa de microinjertación in vitro de babaco en patrones de jigacho, a los 7, 15 y 30 días de haber sido introducidos en el medio de cultivo y haber realizado la injertación.

Días	Chi-cuadrado		Shapiro Wilk		Kuskal Wallis	
	Prendimiento (p valor)	Presencia de callo (p valor)	Número de hojas	Tamaño del explante	Número de hojas	Tamaño del explante
7	0,3032	0,0442	<0,0001	<0,0001	0,1615	0,0030
15	0,0055	>0,999	<0,0001	<0,0001	0,0030	0,0030
30	0,0055	0,8231	<0,0001	<0,0001	0,0030	0,2817

CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1 Introducción de brotes apicales de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo)

Badillo] y jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El análisis realizado en la presente etapa, reveló que, la cantidad de giberelinas en conjunto con la interacción de AIA y 6-BAP, influyeron en la viabilidad del explante. Las concentraciones de auxinas y citoquininas permanecieron constantes, y mostraron tener resultados positivos, por ello, se consideraron primordiales en el desarrollo de los brotes, tomando en cuenta que, estuvieron en concentraciones de 2 mg/L y 0,3 mg/L, respectivamente. Esta diferencia de concentraciones fue considerable, dado que, los niveles altos de citoquininas junto con los niveles bajos de auxinas, afectaron sinérgicamente la división celular y la regeneración *in vitro* de plantas (Fatima, Ahmad y Anis, 2011; Franklin et al., 2004; Raza, Sing y Bhalla, 2017). Los resultados obtenidos en la presente investigación, coinciden con lo obtenido por Mohamman, Naseem, Mohammad, Abdulrahman y Ahman (2018), en su estudio realizado en la ruda, quienes observaron una influencia sinérgica entre las dos fitohormonas, y concluyeron que, su uso amplificó la tasa de proliferación de brotes y la frecuencia de regeneración de los mismos.

Por lo tanto, las interacciones entre fitorreguladores, favoreció la diferenciación celular y potenció la iniciación del meristemo del brote, resultados similares a lo obtenido por Jordan y Velozo (1997), en su estudio realizado en yemas de babaco, quienes hallaron que la relación alta de citoquininas:auxinas (10:1), indujo la formación de brotes en el explante, adicionando además ácido giberélico. Asimismo, Dhawan y Bhojwani (1985), mencionaron que la incorporación de AIA (0,6 mg/L) al medio de cultivo, mejoró el desarrollo y crecimiento de brotes de *Leucaena leucocephala* en un 100%. Los resultados obtenidos en el presente estudio, en cuanto a viabilidad y presencia de

callo, pudieron deberse a lo descrito por Ying-Hua, Yu-Bo y Xian-Sheng (2011), quienes añaden que la citoquinina promueve la proliferación de células e inhibe su diferenciación y, favorece el desarrollo caulinar; mientras que, la auxina desencadena la iniciación del órgano.

En el grupo control, en ausencia de fitohormonas, se obtuvo que éstas fueron esenciales para el desarrollo del explante, puesto que, ninguno de ellos fueron viables para la siguiente etapa. En estudios similares realizados en higo (*Ficus carica* L. cv. gular), se obtuvo que la cantidad adecuada de fitorreguladores para la introducción de brotes fue de 2 mg/L de BAP y 0.2 mg/L de ANA. Asimismo, Alconero, Santiago, Morales y Rodríguez (1975), cultivaron meristemos de brotes de papa, de 0.4 a 0.8 mm de largo, informaron que el ácido 3-indolacético (AIA) fue más efectivo que el ANA para el desarrollo de este explante.

En los tratamientos donde se añadió AIB, se obtuvo la menor cantidad de explantes viables, en su mayoría se oxidaron. Este comportamiento pudo deberse a lo mencionado por Quintero et al. (2003), que al incrementar la concentración de auxinas en el medio, aumenta el grado de fenolización de los tejidos del explante, debido a que ciertas auxinas son sensibles a este efecto, y se acentúa a medida que sube su concentración (Krikorian, 1991).

Se evidenció en el tratamiento B4 que, el agua de coco influyó en la formación de callo y viabilidad de los explantes, debido a la actividad de tipo citoquinina, que apoyó la división celular y promovió el crecimiento rápido de células (Arditti, 2008; Yong et al., 2009). Lo obtenido, pudo explicarse con lo mencionado por Alvin, Hamzi y Folke (1973), que al utilizar agua de coco con 6-BAP y GA₃, forman un aditivo complejo que contiene muchas sustancias nutricionales y hormonales (Alvin, Hamzi, & Folke, 1973).

La concentración adecuada de GA3, para las dos especies, babaco y jigacho, fue de 4 mg/L, con lo que se obtuvo la mayor cantidad de explantes viables y de mayor longitud. Estos resultados obtenidos, pudieron deberse a lo añadido por Engelke et al. (1969), que las giberelinas promueven el alargamiento del tejido vascular, junto a esto, Alvin, Hamzi y Folke (1973) concluyeron que la combinación de giberelinas y citoquininas, promueve la expansión del tejido mesófilo. Además, Thorpe (1981) indicaron que las giberelinas juegan un papel importante en la formación de órganos, a pesar de que inhiben la diferenciación celular.

El mejor tratamiento estuvo conformado también por la auxina AIA, que generó efectos positivos en combinación con giberelinas. Se ha descrito que, la unión de estas fitohormonas induce a la formación de raíces adventicias, gracias un estímulo biosintético dado por la auxina, lo cual no se obtuvo en esta etapa (Coleman y Greyson, 1977; Thorpe, 1981). Sin embargo, se alcanzaron resultados similares al estudio de Li, Li y Smith (2017), quienes hallaron que, el desarrollo de meristemas de brotes apicales requiere altos niveles de citoquininas y bajos de giberelinas, mientras que, las etapas posteriores de la maduración celular y el alargamiento requieren lo contrario. Estos resultados, coincidieron con los de Frigerio et al. (2006), en su estudio realizado en *Arabidopsis thaliana*, quienes concluyeron que, las auxinas regulan positivamente la biosíntesis de giberelinas, con respecto a la regulación de la expansión celular y diferenciación tisular.

Un comportamiento observado en todos los explantes fue la defoliación, a los 15 días de haber sido introducidos los explantes en el medio de cultivo. Esta conducta, pudo deberse a diferentes factores, entre ellos se puede mencionar a la producción de etileno en el cultivo *in vitro* (Gamborg y Larue, 1971). El etileno pudo ser producido por las células vegetales y posiblemente por el agente gelificante como el agar (Mensuali, Panizza y Tognoni, 2006). Además Gamborg y

Larue (1971), demostraron que la producción de etileno en las plantas a menudo se asocia con altos niveles de AIA, fitohormona usada en la presente etapa. Posterior a la defoliación, se observó la presencia de exudado, frecuentemente de color oscuro, sin embargo, Murkute y Shanti-pati (2003), mencionaron que su naturaleza no es exacta, y se ha descrito que está conformado por sustancias fenólicas.

5.2 Enraizamiento de los patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

Los explantes con mayor cantidad de callo fueron los del tratamiento C1, cuya cantidad de AIB fue de 2 mg/L. Estos resultados, son similares a los obtenidos por Jordan y Velozo (1997), quienes en su estudio realizado en babaco, comprobaron que esta especie solo enraizó en presencia de AIB. De igual manera, lo hallado en el presente estudio coincide con lo informado por Hepaskoy y Aksoy (2006), quienes realizaron su estudio en el higo, y observaron que el enraizamiento fue efectivo al adicionar 1 mg/L de AIB al medio de cultivo. Además, se han encontrado resultados positivos para enraizamiento, al usar ANA a una concentración de 0,9 ppm, en *Dioscoreas* sp obtenidas *in vitro* (Quinteros et al., 2003), sin embargo, Kumar et al. (1998), señalaron que el ANA y el AIA no fueron efectivas para el enraizamiento.

A pesar de que la concentración de AIB a la cual se obtuvo la mayor cantidad de callo en los explantes fue de 2 mg/L, no se observó el desarrollo del sistema radical, y se obtuvo que en los tratamientos C2 y C3, la formación de callo disminuyó a medida que aumentó la concentración de la auxina. Lo mencionado pudo explicarse con lo obtenido por Sun y Bassuk (1993), quienes señalaron que las altas concentraciones de auxinas pueden ser fitotóxicas y disminuir el enraizamiento, por lo tanto, se concluyó que en esta etapa, es necesaria una relación baja de citoquinina:auxina.

La formación de callo se vio a partir del séptimo día, en todos los explantes. Este comportamiento fue considerado como un indicador temprano de la viabilidad de un explante, y se corresponde a lo mencionado por Costa, Heuvelink y Van de Pol (2017), quienes informaron que la proliferación del callo, sin ser excesiva es un requisito previo para el enraizamiento óptimo, debido a que las nuevas raíces se forman dentro del nuevo tejido del parénquima. Además, la formación de callo, fue considerada la etapa inicial del enraizamiento, e incluyó la desdiferenciación de células específicas que se convirtieron en meristemáticas, y la formación de callo fue visible externamente por la hinchazón en la base de los explantes.

Otro factor relevante que se tomó en cuenta en la presente etapa, fue la ausencia de citoquininas, ya que, desde su descubrimiento, se sabe que inhiben el crecimiento y desarrollo de las raíces (Skoog & Miller, 1957). Conjuntamente, se ha descrito que su papel inhibitorio, surge de los efectos que tienen sobre la división celular en el meristemo de la raíz y la expansión celular en la zona de elongación de la raíz. La inhibición de la expansión celular se produce en parte, a través de la estimulación de la vía de señalización del etileno, ya que la inhibición de la biosíntesis o señalización de etileno reduce los efectos de la citoquinina (Ruzicka et al., 2009).

A pesar de haber utilizado únicamente auxinas en el presente estudio, no se observó el desarrollo del sistema radical. Este resultado pudo deberse a lo hallado por Roca y Mogrinski (1993), quienes concluyeron que el enraizamiento es difícil en explantes que provienen de la micro propagación, debido a que tienen altas concentraciones de citoquininas como el 6-BAP. En oposición a esto, Costa et al. (2017) mencionaron que la formación de raíces se debe principalmente a un equilibrio entre auxinas y otras hormonas, como las citoquininas y las giberelinas, lo cual no se analizó en la presente etapa, y es un factor que se debería tomar en cuenta en estudios posteriores.

De igual manera, se ha descrito que el equilibrio entre auxinas y citoquininas, influye no solo en el desarrollo de la raíz, sino también en su alargamiento y crecimiento del brote axilar. Además, la eficacia de las auxinas pudo estar condicionada por el estado fisiológico de los explantes en términos de carbohidratos y / u otros nutrientes (Costa et al., 2017).

A pesar de que no se hicieron tratamientos variando la cantidad de sacarosa, se consideró que fue la adecuada, ya que en estudios similares, donde se analizó la variación de sacarosa en el medio de cultivo, se obtuvieron los mejores resultados al utilizarla al 4% (p/v), y además se ha informado que la cantidad de sales MS debe estar a la mitad de la concentración (Maretzki y Hisaki, 1980).

5.3 Microinjertación *in vitro* de brotes de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo)

Badillo] en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

En la presente etapa, el tratamiento adecuado fue el J7, cuya composición de sales MS estuvo al 50%. Además es importante señalar que, en el presente análisis, se eliminó el uso de fitohormonas, como fue el caso de las auxinas utilizadas en la etapa anterior, debido a que al aplicarlas llegaron a inhibir el crecimiento de brotes; resultados que coinciden con lo obtenido por Costa et al. (2017), en su estudio realizado en rosas, sin embargo, mencionan que la presencia de auxinas en el medio de cultivo puede llegar a promover el enraizamiento del explante. Otro estudio similar, que pudo explicar lo obtenido, fue el de Sun y Bassuk (1993), quienes utilizaron AIB, y dedujeron que, aumentó la inhibición de la brotación, debido a la producción elevada de etileno en la parte apical del corte. Las auxinas inhiben la formación de brotes (Bowerson & Ward, 1968), y de la misma manera, el brote de plantas propagadas *in vitro* (Banko & Stefani, 1989).

Los brotes de grosor menor a 0,5 mm no fueron viables, una gran cantidad se oxidó y murió. Esto se consideró como no viable porque la oxidación de las superficies cortadas inhibió el crecimiento, desarrollo de nuevas células y dio como resultado la unión deficiente del injerto, resultados que concuerdan con lo obtenido por Hussain et al. (2014). En contraste, el tamaño adecuado de los brotes de babaco, en la presente investigación, fue de 1 mm, similar al estudio realizado por Navarro et al. (1975), en plantas de agrio, quienes observaron que el tamaño ideal del brote a ser injertado fue de 3 mm. En contraste, Hussain et al. (2014), concluyeron que la incidencia de injertos exitosos aumenta en relación directa al tamaño de la punta del brote, pero también es probable que la proporción de plantas libres de virus disminuya. Además, en el presente estudio se obtuvo que, a pesar de que el brote fue viable, la cantidad de injertos exitosos no fue la ideal, e incluso hubieron brotes que presentaron contaminación, es por esto que, los mismos autores indicaron que, el tamaño del brote que se elija, debe permitir obtener un grado realista de éxito en la microinjertación y dar como resultado un número razonable de plantas libres de patógenos.

Se consideró a la sacarosa parte de los factores influyentes en la supervivencia de las plántulas microinjertadas, cuya concentración fue del 3%, resultados que corresponden a lo mencionado por Pierik (1987), quien concluyó que el crecimiento y el desarrollo *in vitro* aumenta en proporción directa a la concentración de azúcar. Además en el estudio realizado por Navarro et al. (1975), se informó que la concentración de sacarosa juega un papel significativo y que la tasa más alta de injertos exitosos en especies de cítricos se obtuvo con un 7,5% de sacarosa. En conjunto, Hamaraie et al. (2003) observaron una mejora en el éxito del microinjerto con un aumento en la concentración de sacarosa de 2,5% a 7,5%.

En cuanto al pretratamiento realizado a los brotes de babaco, que consistió en la sumersión de los mismos en una solución conformada por fitorreguladores y sacarosa, no mostró tener resultados positivos en cuanto al prendimiento, debido a que, el tratamiento con mayor porcentaje de viabilidad no fue sometido a este proceso. Sin embargo, en estudios anteriores, en su mayoría mostraron el aumento del éxito de la microinjertación cuando se realizó el pretratamiento, y señalaron que los reguladores de crecimiento aumentaron la tasa de división celular y mejoraron la formación de callo, lo que a su vez ayudó a aumentar el porcentaje de uniones exitosas, lo cual no se obtuvo en el presente estudio. En contraste, Jonard et al. (1983) mencionaron que el pretratamiento modifica el estado fisiológico y promueve el desarrollo de brotes, incluso en los más pequeños de 0,1 a 0,2 mm, cuyo injerto es, generalmente difícil e ineficaz.

El uso de PEG no mostró ser un factor clave en el prendimiento y, en los tratamientos donde estuvo presente, se obtuvo gran porcentaje de brotes no prendidos con ápice muerto, este comportamiento pudo deberse a una posible interacción del PEG con otro de los factores presentes en el medio de cultivo. A pesar de ello, Schuabb et al. (2013) mencionaron que el PEG altera la polaridad de la membrana, generando orificios en la misma, y ayuda a que pueda penetrar el ADN foráneo, lo cual no se observó en la presente investigación.

El mejor tratamiento estuvo conformado además por sales MS al 50%, es decir, fue necesaria la reducción en la concentración de sales para incrementar el porcentaje de injertos prendidos, y con presencia de callo en el sitio de unión; los medios menos concentrados no limitan el crecimiento de brotes (Flores, Robledo y Jimarez, 2017). Estos resultados coinciden con lo descrito por Pervin (1997), quien comprobó en orquídeas que, se desarrollaron mejor en medios con baja cantidad de nutrientes.

En cuanto al medio de soporte, se utilizó medio sólido para las plántulas microinjertadas, a una concentración del 0,8% de bacto agar, a pesar de que no se realizaron tratamientos con lo mencionado, se debería tomar en cuenta para estudios posteriores, ya que Mosella-Chancel, Riedel y Jonard (1979) hallaron que hay mayor captación de nutrientes y reguladores de crecimiento por los micro-brotes en medio líquido, y es más efectivo que el medio solidificado. Conjuntamente, Mosella et al. (1979), en su estudio realizado en durazno, obtuvieron que el medio líquido solo o con agar forma condiciones de asfixia, lo que evita la formación de raíces laterales, y el medio líquido MS con vermiculita, beneficia en el desarrollo de los microinjertos.

En la presente investigación no se tomó en cuenta como tratamiento al fotoperíodo, y permaneció constante de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, este es otro de los factores que se debería tomar en cuenta en esta etapa, como se hizo en el estudio de Navarro et al. (1975), e informaron una baja frecuencia de injertos exitosos utilizando plántulas *Troyer citrange* cultivadas bajo luz continua en comparación con las plántulas cultivadas en oscuridad continua. Asimismo, Ewa y Monika (2006) encontraron un alto porcentaje de microinjertos exitosos en cereza en condiciones oscuras.

La presencia de callo en el sitio de unión, se consideró como un comportamiento normal en la microinjertación, ya que la mayoría de los explantes presentaron este comportamiento. Estos resultados pudieron deberse a lo mencionado por Dublin (1980), quien concluyó que la formación de callo es una forma de cicatrización que consta de algunas células cuyo origen es cambial. En cuanto al incremento del número de hojas, como fue el caso del tratamiento J7, se debió a lo mencionado por Gifford (1954), quien explicó que el meristemo inicia su crecimiento, y por ello, empiezan a desarrollarse las primeras hojas. Además, en los ápices más pequeños, las células

meristémicas sufren una división celular más rápida que las de los ápices más grandes, y la proporción del ápice involucrado en el inicio de cada hoja es mayor (Gifford, 1954).

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Se determinó el medio de cultivo óptimo para el desarrollo *in vitro* de brotes apicales de babaco y jigacho. Para el jigacho, se obtuvo que el tratamiento B2 presentó el mayor número de explantes viables, con presencia de callo adecuada y longitud de 3,87 cm. Para los explantes de babaco, se obtuvo que el tratamiento B2 presentó el mayor número de explantes viables y longitud de 3,81 cm.
- Se estableció la dosis óptima de fitohormonas para el enraizamiento de los patrones de jigacho. A los 7, 15 y 30 días, el tratamiento C1 presentó el mayor número de explantes con callo, cuyo comportamiento vino a ser un comportamiento normal, en comparación con el resto de tratamientos, y a los 90 días se observó la presencia de raíces. Además, se verificó que a medida que se incrementó la concentración de AIB, la cantidad de explantes con formación de callo disminuyó.
- Se definió el pretratamiento de inmersión adecuado para los brotes de babaco y el corte apropiado de los explantes para la microinjertación *in vitro* en patrones de jigacho. Los ápices con mayor porcentaje de viabilidad midieron cerca de 0,7-1 mm, y el pretratamiento no mostró ser un factor influyente en el prendimiento. A los 7, 15 y 30 días, el tratamiento J7 obtuvo la mayor cantidad de injertos prendidos. El mejor tratamiento estuvo conformado además, por sales MS al 50%, y no limitó el crecimiento de brotes.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Se debería estandarizar el pretratamiento de las plantas madre, en el aspecto fitosanitario y también la aspersión semanal con fithormonas como el 6-BAP, para promover el crecimiento de los brotes apicales, tomando en cuenta que la aplicación debe ser uniforme y puntual.
- Es imprescindible ampliar estudios acerca de la compatibilidad entre Vasconcelleas, ya sea mediante estudios bioquímicos o histológicos.
- En la etapa de enraizamiento se debería extender el estudio y establecer un balance adecuado entre auxina:citoquinina y otras fitohormonas, como las giberelinas.
- Es sustancial tomar en cuenta más factores en la etapa de microinjertación, como el fotoperíodo, u oscuridad continua, asimismo se debería tomar en cuenta la cantidad de sacarosa y vitaminas en el medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Kieber , J., & Schaller, E. (2014). Cytokinins. *American Society of Plant Biologists*. doi: 10.1199/tab.0168
- Kumar, V., Radha, A., & Kumar, S. (1998). In vitro plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. gular) using apical buds from mature trees. *Plant Cell Reports*, 17, 717–720. India. doi:<https://doi.org/10.1007/s002990050471>
- Navarro, L., Roistacher, C., & Murashige, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *American Society for Horticultural Science*, 100, 471-479.
- AAIC-PROMSA-MAGAP. (2004). Asociación de Agrónomos Indígenas del Cañar. *El cultivo de Babaco en invernadero*. Obtenido de <http://www.repositorio.ute.edu>
- Abousalim, A., & Mantell, S. (1992). Micrografting of pistachio(*Pistacia vera* L.) cv. Mateur. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 29, 231-234.
- Agampodi, V., & Jayawardena, B. (2009). Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purplecompacta* L. *Acta Plant Physiology*, 31, 279-284.
- Agrocalidad. (2018). Dirección de control fitosanitario. *Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario*.
- Akin-Idowu, P., Ibitoye, D., & Ademoyegun, O. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *Afr. J. Biotechnol*, 8(16), 3782-3788.

- Alconero, R., Santiago, A., Morales, F., & Rodríguez, F. (1975). Meristem Tip Culture and Virus Indexing of Sweet Potatoes. *Phytopathology*, *65*, 769-773. Puerto Rico. doi:10.1094/Phyto-65-769
- Alvin, L., Hamzi, Q., & Folke, S. (1973). Cytokinin-gibberellin regulation of shoot development. *Amer. J. Bot*, *60*(6), 491-495.
- Amiri, M. (2007). Special microgrfting technique for cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Hort*, *764*, 151-154.
- Antunes, F., & Renner, S. (2012). A dated phylogeny of the papaya family (Caricaceae) reveals the crop's closest relatives and the family's biogeographic history. *Mol. Phylogenet*, *65*, 46–53. doi:10.1016/j.ympev.2012.05.019
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *The angiosperm phylogeny group*. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- APROBAYA. (2009). Asociación de productores de babaco. Obtenido de www.booksgoogle.com
- Aradhya, M., Manshardt, F., Zee, F., & Morden C. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *46*, 579–586.
- Arditti, J. (2008). Micropropagation of Orchids. *Blackwell Publishing*, 2. Oxford.
- Argueso, C., Ferreira, F., & Kieber, J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ*, *32*, 1147-1160.

- Badillo, V. (1971). Monografía de la familia Caricácea. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 92-103.
- Badillo, V. (1993). Caricaceae. *Revista de la Facultad de Agronomía (UCV)*, 111.
- Badillo, V. (2000). Carica L. vs. Vasconcellea St.-Hil. *Ernstia*, 10(2), 74-79.
- Banko, T., & Stefani, M. (1989). In vitro propagation of *Oxydendrum arboreum* from mature tree. *HortScienc*, 24, 683-685.
- Bowerson, T., & Ward, W. (1968). Auxin inhibition of epicormic shoots in white oak. *Forest Science*, 14, 192-196. doi:<https://doi.org/10.1093/forestscience/14.2.192>
- Bravo, C., Larriva, W., & Minchala, L. (2012). Manejo integrado de la marchitez vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de babaco. Ecuador. doi:10.13140/RG.2.2.16252.13448
- Caetano, M., Lagos, T., Sandoval, C., Posada, C., & Caetano, D. (2008). Citogenética de especies de *Vasconcellea* (Caricaceae). Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v57n4/v57n4a04.pdf>
- Caguana, M. (2003). El cultivo de babaco en invernadero (carica pentágona). *Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar : Abya-Yala*. Obtenido de https://digitalrepository.unm.edu/abya_yala/195
- Cambra, M., Flores, R., Pallás, V., & Gentit, P. (2008). Viruses and viroids of peach trees.

- Canan, C., Mehmet, O., Hakan, T., Kamil, S., & Elman, I. (2006). In vitro micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L.) var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. *Journal of Cell and Mol. Biol*, 5, 25-31.
- Cañizares, D. (1998). Regeneración de Caricaceas (*Carica pentagona*) por métodos de micropropagación. *Facultad de Ciencias Agropecuarias-IASA*.
- Castillo, L. (1999). Control biológica de la fusariosis vascular del garbanzo mediante antagonistas microbianos. Cordoba.
- Cohen, D., & Cooper, P. (1982). Micropropagation of Babaco, a *Carica* hibrid from Ecuador. *Plant Tissue Cell Culture*.
- Coleman, W., & Greyson, R. (1977). Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured in vitro. *New Phytol*, 78, 47-54.
- Conci, V. (2010). Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*, 26-33. Buenos Aires, Argentina : ArgenBio.
- Córdoba, S., Guzmán, J., Pérez, B., Zúñiga, P., & Pacheco, R. (2010). Propagación de Especies Nativas de la Región Andina. *Jardín Botánico José Celestino Mutis*.
- Costa, J., Heuvelink, E., & Van de Pol, P. (2017). Propagation by Cuttings. *Reference Module in Life Sciences*. Portugal. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.05091-3

- Criollo, D. (2008). Evaluación de dos técnicas para la microinjertación de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. pentagona) y chihualcán (*Vasconcellea heilbornii* cv. chrysopetala) en patrones de papaya (*Carica papaya*) bajo condiciones de laboratorio, Santa Catalina-INIAP.
- Daviere, J., de Lucas, M., & Prat, S. (2008). Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 18, 295–303.
- De Hoog, J. (1998). Handbook for Modern Green house Cultivation PPO Aalsmeer. The Netherlands.
- Dhawan, V., & Bhojwani, S. (1985). In vitro vegetative propagation of *Leucaena leucocephala*. *Plant Cell Report*, 4, 315. La Habana.
- Dihn, H. (2018). Genus *Vasconcellea*. Obtenido de <https://www.worldwidefruits.com/>
- Doorenbos, J. (1953). Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations. 50, 99–102.
- Ewa, D., & Monika, M. (2006). Vegetative cherry rootstocks in tissue culture. *Scientific works of the Lithuanian institute of horticulture and Lithuanian university of agriculture*, 25, 77-84.
- Fabara, J., Bermeo, N., & Barberán, C. (1985). Manual del cultivo del babaco. (U. T. Ambato, Ed.) *Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT)*, 104.
- Fabela, E., Preciado, P., & Benavides, A. (2006). *Manual para la preparación de soluciones nutritivas*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/305280176_Manual_para_la_preparacion_de_soluciones_nutritivas

- Faggioli, F., Martino, L., & Barba, M. (1997). In vitro micrografting of *Pyrus communis* shoot tips. *Adv. Hort. Sci*, 11(1), 25-29.
- Falconí, C., Landázuri, P., Yáñez, V., Giacometti, J., Oleas, A., Soria, N., . . . Chávez, A. (2006). Alternativas biotecnológicas para la producción de plantas libres de la marchitez vascular del babaco *Vasconcellea heilborni*. (E. P. Ejército, Ed.) *Producción Científica*, 20-21.
- Fatima, N., Ahmad, N., & Anis, M. (2011). Enhanced in vitro regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L. (Dunal) induced by copper and zinc ions. *Plant Physiol. Biochem*, 49, 1465–1471.
- Ferl, R., & Paul, A. (2000). Genome organization and expression. En R. Ferl, & A. Paul, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (págs. 312-357). USA: American Society of Plant Physiologists.
- Flores, L., Robledo, A., & Jimarez, M. (2017). Medio de cultivo y sustitutos del agar en el crecimiento in vitro de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6), 1315-1328. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n6/2007-0934-remexca-8-06-1315-en.pdf>
- Franklin, G., Carpenter, L., Davis, E., Reddy, D., Al-Abed, D., Abou, W., . . . Sairam, R. (2004). Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. *Plant Growth Regulation*, 43, 73-79.
doi:<https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038359.86756.18>

- Freire, D. (2015). Reproducción asexual del babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv.) Sobre portainjertos de chamburo (*Vasconcellea cundinamarcensis*) y toronche (*Vasconcellea stipulata*). *Universidad Técnica Estatal de Quevedo*. Quevedo, Ecuador .
- Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A., Hedden, P., & Blázquez, M. (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, *142*(2), 553-63. doi:10.1104/pp.106.084871
- Galarza, V. (2002). Reacción de diferentes especies de Caricaceas a *Fusarium oxysporum* y su Afinidad como Patrón de Babaco. (U. Central, Ed.) *Facultad de Ciencias Agrícolas*.
- Gamborg, O., & Larue, T. (1971). The effect of auxins, abscisic acid, and kinetin on ethylene production in suspension cultures of rose and ruta cells. *Plant Physiol*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC396875/pdf/plntphys00190-0017.pdf>
- García , F. (2011). Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de *Vasconcelleas* a *Fusarium* sp. como posible portainjertos para babaco (*Vasconcelleae x heilborni*) bajo cubierta plástica en la estación experimental del austro de INIAP.
- Gebhardt, K., & Goldbach, R. (1988). Establishment, graft union characteristics and growth of *Prunus* micrografts. *Physiol. Plant*, *72*, 153-115.
- George, F., Michael, G., & Greek-Jan, D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. *1*, 3. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3
- Gifford, E. (1954). The shoot apex in angiosperms. *Bot. Rev.*

Greenboim-Wainberg, Y., Maymon , I., Borochov , R., Alvarez, J., Olszewski , N., Ori, N., . . .

Weiss, D. (2005). Cross talk between gibberellin and cytokinin: the Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell*, *17*(1), 92-102. doi:10.1105/tpc.104.028472

Hamaraie, M., Osman, M., & Mohamed, A. (2003). Propagation of grapefruit by shoot tip micrografting.

Handro, W., & Yokoya, N. (1997). Thallus regeneration and growth induced by plant growth regulators and light intensity *Grateloupia dichotoma* (Rhodophyta). *International Symposium on New Technologies from Marine-Sphere*, 83-86.

Hartmann, H., Kester, D., Davies, F., & Geneve, R. (1997). *Plant Propagation, Principles and Practices*. New Jersey: Prentice-Hall.
doi:<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1212.68>

He, S., Chen, X., Chen, L., Kong, D., & Ren, H. (2005). The preliminary researches on browning of leaf stalk in tissue culture of *Paeonia suffruticosa*. *Henan Sci*, *23*, 47-50.

Hepaksoy, S., & Aksoy, U. (2006). Propagation of *Ficus carica* L. clones by in vitro culture. *Department of Horticulture*, *50*, 433–436. doi:<https://doi.org/10.1007/s10535-006-0063-8>

Herman, D., & Hess, C. (1963). The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *Proc. Intern. Plant. Prop. Soc*, *13*, 42-62.

Heywood, V. (1985). *Flowering plants of the world*. *Croom Helm*. Sydney, Australia .

- Holmes, F. (1956). Elimination of spermivirus from the nightingale chrysanthemum. *Phytopathol*, 46, 599-600.
- Horovitz, S., & Jimenez, H. (1967). Cruzamientos interespecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. *Agron Trop*, 17, 323-344.
- Huang, S., & Millikan, D. (1980). In vitro micrografting of apple shoot tips. *Hort. Sci*, 15, 741-743.
- Hussain, G., Wani, M., Mir, M., Rather, Z., & Bhat, K. (2014). Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology*, 13(25), 2474-2483. doi:10.5897/AJB2013.13602
- INIAP. (1999). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. *Guía para el cultivo del Babaco en el Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Isikalan, C., Sureyya, N., Filiz, A., & Bekir, E. (2011). Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar Nonpareil. *AJCS Australian J. Crop*, 5(1), 61-65.
- Jarausch, W., Lansac, M., Portanier, C., Davies, D., & Decroocq, V. (2000). In vitro grafting: a new tool to transmit pome fruit phytoplasmas to non-natural fruit tree hosts. *Advances in Horticultural Science*, 14, 29-32.
- Jobin-Decor, M., Graham, G., Henry, R., & Drew, D. (1997). RAPD and isozyme analysis of genetic relationships between *Carica papaya* and wild relatives. *Genet Res Crop Evol*, 44, 471-477.

- Jonard , R., Hugard, J., Macheix , J., Martinez , J., Mosella-Chancel, L., Poessel, J., & Villemur, P. (1983). In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Sci. Hortic*, *20*, 147-159.
- Jonard, R. (1986). Micropropagation and its applications to tree improvement. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, *1*, 31-48. Berlin.
- Jonard, R., Lukman, D., Schall, F., & Villemur, P. (1990). Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using in vitro techniques. *Sci. Hortic*, *43*, 117-128.
- Jordan, M., & Velozo, J. (1997). In vitro propagation of highland papayas (*carica pubescens* and *c.pentagona*). *Acta Hortic*, *447*, 103-106.
doi:<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.447.10>
- Kaufman, M., & Eckard, A. (1971). Evaluation of water stress control by polyethylene glycols by analysis of guttation. *Plant Physiol*, *47*, 453-456.
- Kim, C., Lee, C., Park, H., & Lee, G. (2005). In vitro grafting of grape with phylloxera resistant rootstock cultivars. *Vitis*, 195-196.
- Krikorian, A. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de tejidos en la agricultura*, 65. Colombia.
- Kyndt, T., Van Droogenbroeck, B., Romeijn-Peeters, E., Romero-Motochi, J., Scheldeman, X., Goetghebeur, P., . . . Gheysen, G. (2005). Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular phylogenetics and evolution*, *37*, 442–459. doi:10.1016/j.ympev.2005.06.017

- Lev-Yadun, S. (2011). Why should trees have natural root grafts. *Tree Physiol*, 31, 575–578.
doi:10.1093/treephys/tpr061
- Li, J., Li, C., & Smith, S. (2017). *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Elsevier Ltd.
- Lim, T. (2012). *Vasconcellea x heilbornii*. *Springer Science+Business*, 718-721.
- Llacer, G. (2009). Fruit breeding in Spain. *Acta Hortic*, 814, 43-56.
- Llacer, G., Alonso, J., Rubio, M., Batlle, I., Iglesias, I., Vargas, F., . . . Badenes, M. (2009). Peach industry in Spain. *Journal- American Pomological Society*, 63, 128-133.
- MAG. (2001). Ministerio de Agricultura y Ganaderia. *Babaco Mountain Papaya*. Quito, Ecuador.
- Martinez, J., Hugard, J., & Jonard, R. (1979). Sur les différentes combinaisons de greffages des apex réalisées in vitro entre pêcher (*Prunus persica* Batsch), abricotier (*Prunus armeniaca* L.) et myrobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *Comptes Rendus Académie des Sciences*, 288, 759-762. Paris.
- Matute , L., & Tirado, B. (2013). Análisis bromatológico de *Vasconcellea pulchra* VM Badillo y *Vasconcellea x heilbornii* VM Badillo procedentes de la provincia de Bolívar, Ecuador.
- Mensuali, A., Panizza, M., & Tognoni, F. (2006). Quantification of ethylene losses in different container-seal systems and comparison of biotic and abiotic contributions to ethylene accumulation in cultured tissues. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb04693.x
- Merino , D. (1989). El cultivo de babaco. *Ed. Mundi-Prensa*, 59. Madrid, España.
- Mnoney, E., & Mantell, S. (2001). In vitro micrografting of cashew. *Plant cell*, 66, 49-58.

- Mohammad , F., Naseem, A., Mohammad, A., Abdulrahman, A., & Ahmad, A. (2018). Auxin-cytokinin synergism in vitro for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi J Biol Sci*, 25(2), 273–277. doi:10.1016/j.sjbs.2017.09.009
- Moitreyee, S. (2010). In vitro culture studies of axillary bud explants from field grown plants of *Carica Papaya L.* - Bacterial discontinuation. *Bionano frontier*, 178-181. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/313316436_In_vitro_culture_studies_of_axillary_bud_explants_from_field_grown_plants_of_Carica_papaya_L_-_Bacterial_Discontinuation
- Mosella, L., & Ascui, L. (1985). El cultivo in vitro como herramienta en la investigación y multiplicación de plantas; . *Utilización de ápices meristemáticos en la micropropagación de cítricos.*
- Mosella-Chancel, L., Riedel, M., & Jonard, R. (1979). Sur les ameliorations apportées aux techniques de microgreffages des apexes in vitro chez les arbres fruitiers. cas du pecher (*Prunus persica B.*). *Acad.Sci*, 289, 505-508. Paris.
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., & Goldschmidt, E. (2009). A history of grafting. *Hortic. Rev*, 35, 437–493. doi:10.1002/9780470593776.ch9
- Mundo, J., & Serrano, D. (2012). Extracción de la enzima papaína del látex de *Carica papaya* (papayo) cultivado en el país y su aplicación en cicatrices tipo queloides y verrugas. *Tesis de pregrado*. San Salvador, El Salvador.

- Murashige, T., Britters, E., Rangan, E., Nauer, C., Roistacher, N., & Holliday, P. (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *Advances in Horticultural Science*, 7, 118-119.
- Murkute, A., & Shanti-pati, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science*.
- Nelson, T., Toussoun, T., & Marasas, W. (1983). *Fusarium species : an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press.
- Ochoa, J., & Ellis, M. (2002). Componentes del manejo integrado de Fusariosis o marchitez vascular de babaco en el Ecuador. *Revista Técnica Informativa INIAP*(16), 16 – 18.
- Ochoa, J., & Fonseca, G. (2000). First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica × heilbornii* var. pentagona) in Ecuador. *Revista Plant Disease*, 80(2), 190.
- Ochoa, J., & Fonseca, J. (1997). La marchitez vascular o fusariosis del Babaco: sintomatología, etiología, patogenicidad, diagnosis y su asociación con *M.incognita* en las provincias de Pichincha y Tungurahua . *Seminario Nacional de Sanidad Vegetal* , 8-15.
- Ochoa, J., Yangari, J., Ellis, M., & Williams, R. (2004). Two new formae specialis of *Fusarium oxysporum*, causing vascular wilt on babaco (*Carica heilbornii* var. pentagona) and vascular wilt on naranjilla (*Solanum quitoense*) in Ecuador. *Fitologiya*.
- Patrick, M. (2011). Effects of coconut water on callus initiation and plant regeneration potentials of sweetpotato. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales*.
- Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/274139264_Effects_of_coconut_water_on_callus_initiation_and_plant_regeneration_potentials_of_sweet_potato

Pazos, J. (2017). Chamburo, jijacho y babaco. *El Comercio*.

Pervin, S. (1997). Studies on large scale plantlets development in different orchid species and hybrid through in vitro culture. Bangladesh.

Piagnani, M., Prinsi, B., & Bassi, D. (2006). Experimental approaches to in vitro grafting in *Prunus armeniaca* and *P. spinosa*. *Adv. Hort. Sci*, 20(3), 224-230.

Pierik, R. (1987). In vitro culture of higher plants. *Martinus Nijhoff Publishers*, 60-63.

Pliego-Alfaro, F., & Murashige, T. (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks in vitro. *Hort-Sci*, 22, 1321-1324.

Quillay, N. (2011). Determinación de la capacidad embriogénica de babaco a partir de óvulos y hojas multiplicadas in vitro vía embriogénesis somática. *Maestría en gestión de la producción de flores y frutas andinas*.

Quintero, D. (2012). Flor de babaco. Obtenido de <https://plus.google.com/112646110512615824547/posts/StTB3TymFDR>

Quintero, I., Jarma, A., Polo, J., & Espitia, A. (2003). Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas* sp.

Rafail, S., & Mosleh, M. (2010). Factors involved in micropropagation and shoot tip grafting of apple (*Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus* sp. L.). *World Food System*.

Ramanayake, S., & Kovoov, T. (1999). In vitro micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Hort. Sci. Biotech*, 74, 265-68.

- Rather, Z., Siddique , M., Nazki , I., & Hussain, G. (2011). Strategies for controlling explant browning during in vitro cultures of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) cv. Sara Bernherdt. *J. Orn. Hort. New series*, 13(1), 1-7.
- Raza, G., Sing, M., & Bhalla, P. (2017). In vitro plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International*. Australia.
doi:<https://doi.org/10.1155/2017/7379693>
- Rignanese, L. (2006). Botánica Sistemica.
- Robles, A., Herrera, L., & Torres, R. (2016). El babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). *Centro Agrícola*, 43(2), 83-92. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v43n2/cag11216.pdf>
- Roca, W., & Mogrinski , L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. *Centro internacional de agricultura tropical*. Colombia.
- Rodríguez, K. (2013). Plan de exportación de babaco para la compañía Agro-Productos del Ecuador “El Migrante Cia. Ltda.” de la ciudad de Saraguro al mercado europeo para el año 2013. Loja, Ecuador.
- Roistacher, C., Navarro, L., & Murashige, T. (1976). Recovery of Citrus Selections Free of Several Viruses, Exocortis Viroid, and Spiroplasma citri by Shoot-tip grafting in vitro. Obtenido de www.ivia.es/iocv/archivos/proceedingsVII/7th186_193.pdf
- Roossinck, M. (2013). Plant Virus Ecology. *Plos Pathogens*, 9(5), 1-3.

- Ross, S., & Grasso, R. (2010). In vitro propagation of 'Guayabo del pais'(Acacia sellowiana (Berg.) Burret). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 83-87.
- Ruf, R., Eckard, E., & Gifford, R. (1967). Compounds of osmotic adjustment of plants to rapid changes in root medium osmotic pressure. *Soil Sci*, 104, 159-162.
- Ruzicka, K., Simásková, M., Duclercq, J., Petrásek, J., Zazimalová, E., Simon, S., . . . Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 106, 4284-4289. USA.
- Saha, M., Phatak, A., & Chandra, N. (2014). In vitro culture studies in four dioecious varieties of carica papaya l. using axillary buds from field-grown plants. *Journal of Tissue Research*, 4(2), 211-214. India.
- Scheldeman, X. (2002). Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. *Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Department Plant Production*. Ghent, Bélgica. Obtenido de <https://biblio.ugent.be/publication/522063/file/1874191.pdf>
- Scheldeman, X., Willems, L., Coppens, G., Romeijn-Peeters, E., Restrepo, M., Romero, J., . . . Goetgebeur, P. (2007). Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in tropical and subtropical America. *Biodivers Conserv.* doi:10.1007/s10531-006-9086-x
- Schuab, A., Moura, E., Barroso, B., Santa-Catarina, C., & Silveira, V. (2013). Protoplast Fusion Induced by Polyethylene Glycol (PEG). *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(2). doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S2197-00252013000200004>

SICA/MAG – INEC. (2000). Las papayuelas de altura. Obtenido de <http://www.sica.gov.ec/agro/precios/indexp.html>

Simon, R., & Richard, E. (2003). Rescue of genetically transformed Avocado by micrografting. *Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate) University of florida. USA.*

Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol, 11*, 18-131.

Soria, N., & Viteri, P. (1999). Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador. 48. Quito, Ecuador: INIAP-COSUDE. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/515/4/iniapsc286.pdf>

Srivastava, L. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. USA: Elsevier Science.

Stasolla, C., & Yeung, E. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: Improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 74(1)*, 15-35. doi:10.1023/A:1023345803336

Sun, T., & Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev.Plant Biol, 55*, 197–223.

Sun, W., & Bassuk, N. (1993). Auxin induced ethylene synthesis during rooting and inhibition of bud break of ‘Royalty’ rose cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science, 118*, 638–643.

- Tangolar, S., Ercik, K., & Tangolar, S. (2003). Obtaining plants using in vitro micrografting method in some grapevine varieties (*vitis vinifera*) *Biotechnol. Biotechnol.*
- Thorpe, T. (1981). *Methods and Application in Agriculture. Plant Tissue Culture.* Canada. doi:<https://doi.org/10.1016/C2009-0-03076-1>
- Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. *J. Mol. Microbial Biotechnol*, 37, 169-180.
- Triatrningsih, R., Purbiati, T., & Weidiyati, E. (1989). Citrus shoot tip grafting and its application in Indonesia.
- Troncoso, A. (1997). *influencia de la concentraclon de sacarosa en el medio, sobre la respuesta de material de vid "in vitro".* Obtenido de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/66626/1/Influencias%20de%20la%20concentraci%C3%B3n%20de%20sacarosa%20en%20el%20medio....pdf>
- UNPL. (2019). *TP N° 1: medios de cultivo.* Obtenido de http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/41270/mod_resource/content/2/1_TP_Medios_de_cultivo_1_.pdf
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, P., Kyndt, T., & Gheysen, T. (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (*Caricaceae*) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetic*, 105, 289–297. doi:10.1007/s00122-002-0983-4
- Vera-Sirera, R., Gomez, M., & Perez-Amador, M. (2016). DELLA proteins, a group of GRAS transcription regulators that mediate gibberellin signaling. *Plant Transcr. Factors*, 313–328.

- Wang, G., Li, X., Chen, Q., & Tian, J. (2010). Studies on factors affecting the microshoot grafting survival of walnut. *Acta Hort*, 861, 327-331.
- Wutscher, H. (1979). Citrus rootstocks. *Hortic. Rev*, 1, 237–269.
- Yang, D., Li, Q., Deng, Y., Lou, Y., Wang, M., Zhou, G., . . . He, Z. (2008). Altered disease development in the *eui* mutants and *Eui* overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. *Mol Plant*, 1(3), 528-37. doi:10.1093/mp/ssn021
- Yang, D., Yao, J., Mei, C., Tong, X., Zeng, L., Li, Q., . . . He, S. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19), 1192-200. doi:10.1073/pnas.1201616109
- Yildirim, H., Onay, A., Süzerer, V., Tilkat, E., Ozden-Tokatli, Y., & Akdemir, H. (2010). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars ‘Ferragnes’ and ‘Ferraduel’. *Sci. Hor*, 125, 361-367.
- Ying-Hua, S., Yu-Bo, L., & Xian-Sheng, Z. (2011). Auxin–Cytokinin Interaction Regulates Meristem Development. *Mol Plant*, 4(4), 616–625. doi:10.1093/mp/ssr007
- Yong, J., Ge, L., Ng, Y., & Tan, S. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14(2).
- Zhang, J., & Luo, X. (2006). Occurrence and Prevention Method of Brown Turning in Tissue Culture of *Peonia suffruticosa* Andr. *Shenyang Agri. Uni*, 35(5), 720-724.

ANEXOS

ANEXO A: Tablas de resultados obtenidos en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho.

ANEXO A1: Resultados obtenidos de la variable “viabilidad” en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho

Tabla 13

Resultados de la evaluación de la viabilidad de los brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Viabilidad	Tratamiento	Viabilidad	Tratamiento	Viabilidad
	0		1	B4	1
	0	B2	1		1
	0		1		0
Control	1		1		1
	0		1		1
	0		1	B5	1
	1		1		1
	1		1		1
	0		1		0
	1		0		0
	1	B3	0		1
	1		1		1
	0		0		1
	0		0		0
B1	1		1		1
	1		0	B6	1
	1		1		1
	1		0		0
	0		0		1
	0	B4	1		0
	1		1		1
B2	0		1		0
	0		0		
	1		1		

Tabla 14

Resultados de la evaluación de la viabilidad de los brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Viabilidad		
Control	0	B2	1
	0		1
	1		1
	0		1
	1		1
	0		1
	1		1
	0		1
	0		1
	1		1
	0		1
B1	1		0
	0	B3	0
	1		1
	1		1
	1		0
	1		1
	1		1
	0		1
	1		1
	1		1
	1		1
	1		1
	1		1
	0		1
	0		0

ANEXO A2: Resultados obtenidos de la variable “presencia de callo” en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho

Tabla 15

Resultados de la evaluación de la presencia de callo en los brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Viabilidad				
		B2	1		1
	0		0		1
	0		0		0
	1		0		0
Control	0		0		0
	1		1		0
	0		0	B5	1
	0		1		0
	1		1		0
	0		0		1
	1		1		1
	1	B3	1		1
	0		1		1
	1		0		1
	0		0		0
B1	0		0		1
	1		1	B6	1
	1		1		1
	1		1		1
	0		1		1
	0		1		0
	0	B4	1		0
	1		1		1
	0		0		1

Tabla 16

Resultados de la evaluación de la presencia de callo en los brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Viabilidad				
			0		0
	0		0		0
	1	B2	0		1
	1		0		0
Control	1		1		1
	0		1		0
	1		1	B5	1
	0		0		0
	0		0		0
	0		0		1
	1		1		1
	1	B3	1		1
	1		1		1
	0		1		0
	0		1		0
B1	1		0		0
	1		1	B6	1
	0		1		0
	0		1		1
	1		1		0
	1		1		1
	0	B4	1		1
	1		0		1
	1		1		1

**ANEXO A3: Resultados obtenidos de la variable “longitud” en la etapa de
introducción de brotes apicales de babaco y jigacho**

Tabla 17

Resultados de la evaluación de la longitud de brotes de jigacho en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Longitud					
Control	3	B2	3,2	3,8		
	3,8		3,6	B4	3,8	
	3,5		5		3,9	
	3,6		3,8		4,2	
	3,8		4,6		3,8	
	3,5		3,8	B5	4,2	
	3,7		4,2			3,9
	3,8		4			4,2
	3,5		4			3,8
	3,5		3,8			3,8
3,8	3,5		4			
3,5	3,7	B3	4,2			
3,8	3,9				3,9	
3,5	4				3,7	
4	3,6				3,7	
3,6	3,7			3,8		
3,5	3,8		B6	3,7		
3,8	4,2				3,8	
3,5	3,9				3,9	
4	4,2				3,7	
3,5	3,8			B4	3,7	
3,2	4,2				3,8	
	4				3,9	
	4,2				3,7	
	3,8				3,7	
	4,2				3,9	
	4		3,8			
	3,2		3,8			

Tabla 18

Resultados de la evaluación de la longitud de brotes de babaco en la etapa de introducción, a los 21 días.

Tratamiento	Longitud			
			3,9	3,6
	3,3		4,2	B4
	3,6	B2	4,3	3,5
	3,8		4	3,3
Control	3,5		4,4	3
	3,9		3,7	3,8
	3,5		3,6	B5
	3,6		3,5	3,5
	3,4		3,5	3,6
	4		3,8	3,7
	3,8		3	3,4
	3,6	B3	3,6	3,8
	3,3		3,8	3,8
	3		3,9	3,6
	3,8		4	3,8
B1	3,8		3	3,2
	4,3		3,9	B6
	3,9		3,3	3,7
	4		4	3,5
	3,5		3,2	3,8
	3,8	B4	3,5	3,6
	4		4	3,4
B2	3		4	3,8
	3		3,2	3,6

ANEXO B: Resultados obtenidos en la etapa de enraizamiento de los patrones de jigacho

(*Vasconcellea stipulata*)

ANEXO B1: Resultados obtenidos variable “presencia de callo” en los explantes de jigacho, a los 7, 15 y 30 días de haber realizado el cambio de medio.

Tabla 19

Resultados obtenidos de la variable “presencia de callo” en los explantes de jigacho, en la etapa de enraizamiento, a los 7, 15 y 30 días.

Tratamiento	7 días	15 días	30 días
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	1
C1	0	0	0
C1	0	1	1
C1	1	1	1
C1	0	1	1
C1	1	1	1
C1	0	1	1
C1	1	1	1
C1	0	0	0
C1	1	1	1
C1	0	0	0
C1	1	1	1
C1	0	0	0

C2	0	1	1
C2	1	1	1
C2	0	0	0
C2	0	0	0
C2	0	1	1
C2	1	1	1
C2	0	0	0
C2	1	1	1
C2	0	0	0
C2	0	1	1
C3	0	0	0
C3	1	1	1
C3	0	0	0
C3	0	0	0
C3	1	1	1
C3	0	1	1
C3	1	1	1
C3	0	0	0
C3	0	0	0
C3	0	1	1

ANEXO B2: Imágenes de los resultados obtenidos variable “presencia de callo” en los explantes de jigacho, a los 7, 15 y 30 días de haber realizado el cambio de medio

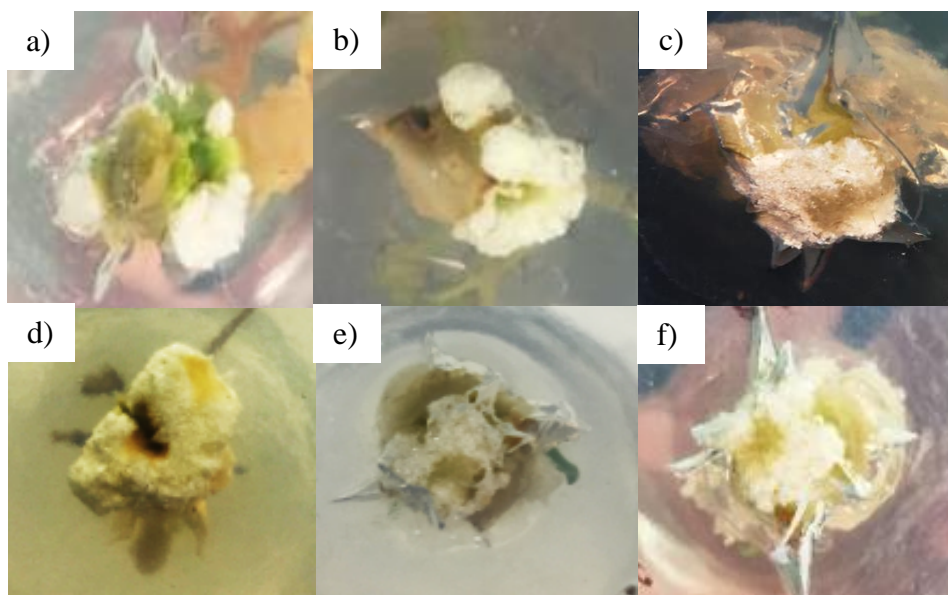


Figura 26. Vista inferior de los patrones de jigacho en la etapa de enraizamiento. Variable “presencia de callo”.

Nota: a), b) y c) 7 días d) y e) 15 días f) 30 días

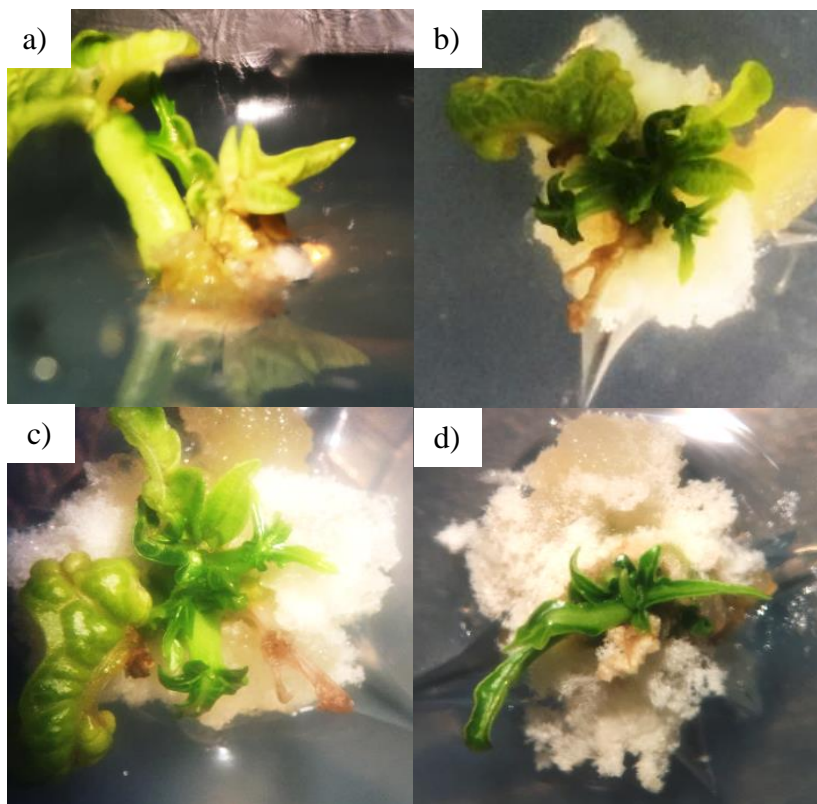


Figura 27. Variable “presencia de callo” en los patrones de jigacho, en la etapa de enraizamiento.

Nota: a) Vista lateral a los 7 días b) vista superior a los 15 días c) y d) vista superior a los 30 días.

ANEXO C: Resultados obtenidos en la etapa de microinjertación *in vitro* de brotes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] en patrones de jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

ANEXO C1: Resultados obtenidos variable “prendimiento” en los microinjertos realizados *in vitro*, a los 7, 15 y 30 días de haber realizado el cambio de medio

Tabla 20

Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 7 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.

Tratamiento	Prendimiento	Presencia de callo en el sitio de union	Número de hojas	Tamaño del injerto (mm)
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	0	1	5	3
J	0	1	3	4
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	0	1	5	4
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	0	1	4	3
J1	0	1	3	4
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J2	0	1	5	4
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	0	1	4	4
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	0	1	3	4
J3	0	1	5	4
J3	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J3	0	1	4	3

CONTINÚA

J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	0	1	4	4
J3	2	1	0	0
J4	0	1	5	4
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	0	1	4	3
J4	1	0	0	0
J4	2	1	0	0
J4	1	0	0	0
J4	0	1	3	4
J4	0	1	3	4
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	2	1	0	0
J5	0	1	5	3
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J6	0	1	4	4
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	0	1	3	3
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	0	1	5	4
J6	0	1	5	3
J6	1	0	0	0
J7	0	1	3	3
J7	0	1	4	3
J7	0	1	5	4
J7	1	0	3	0

CONTINÚA

J7	0	1	3	3
J7	1	0	0	0
J7	0	1	5	3
J7	1	0	0	0
J7	0	1	4	4
J7	0	1	3	4

Tabla 21

Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 15 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.

Tratamiento	Prendimiento	Presencia de callo en el sitio de union	Número de hojas	Tamaño del injerto (mm)
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	1	0	0	0
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0

CONTINÚA

J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J3	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J3	2	1	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	1	0	0	0
J4	2	1	0	0
J4	1	0	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0

CONTINÚA

J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J7	0	1	5	4
J7	2	1	0	0
J7	2	1	0	0
J7	1	0	0	0
J7	0	1	6	5
J7	2	0	0	0
J7	2	1	0	0
J7	1	0	0	0
J7	2	1	0	0
J7	0	1	5	4

Tabla 22

Resultados obtenidos de las diferentes variables analizadas, en la etapa de microinjertación in vitro, a los 30 días de haber introducido a los injertos en el medio de cultivo.

Tratamiento	Prendimiento	Presencia de callo en el sitio de union	Número de hojas	Tamaño del injerto (mm)
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J	2	1	0	0
J	1	0	0	0
J	1	0	0	0
J	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J1	1	0	0	0
J1	1	0	0	0

CONTINÚA

J1	1	0	0	0
J1	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J2	2	1	0	0
J2	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J3	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J3	2	1	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	1	0	0	0
J3	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J4	1	0	0	0
J4	2	1	0	0
J4	1	0	0	0
J4	2	1	0	0
J4	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0

CONTINÚA

J5	2	1	0	0
J5	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	2	1	0	0
J6	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J6	1	0	0	0
J7	0	1	7	6
J7	2	1	0	0
J7	2	1	0	0
J7	1	0	0	0
J7	0	1	8	5
J7	2	1	0	0
J7	2	1	0	0
J7	1	0	0	0
J7	2	1	0	0
J7	0	1	7	5

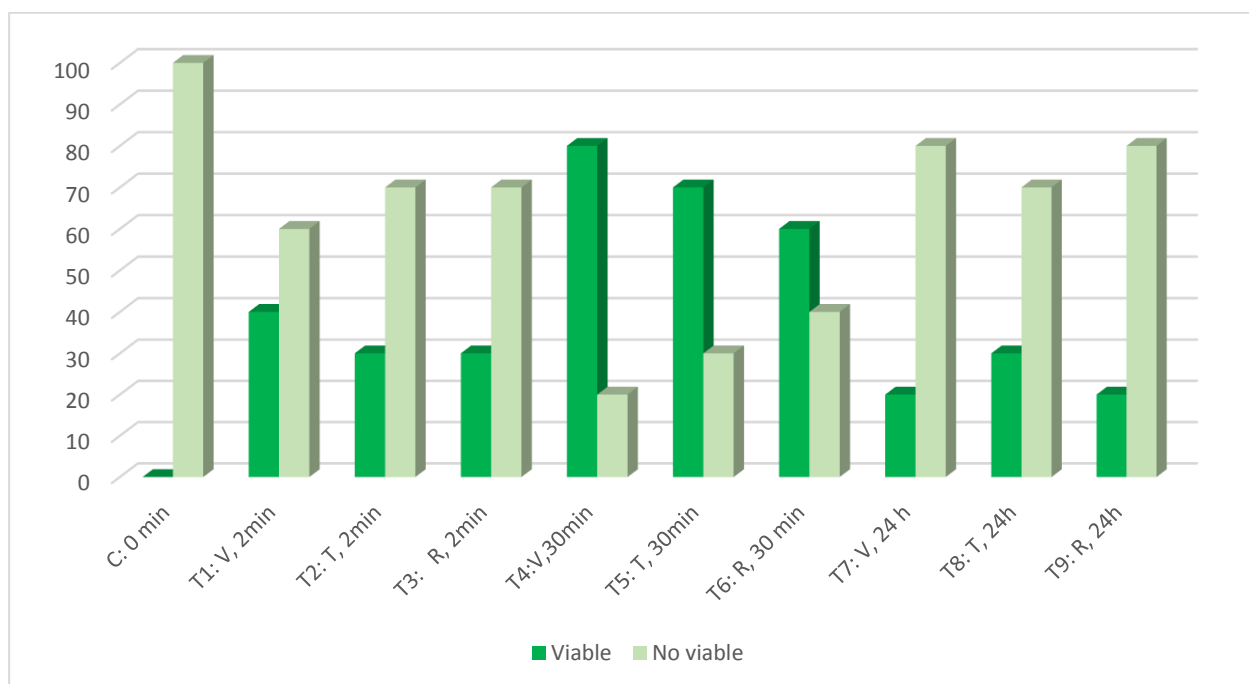


Figura 28. Resultados obtenidos de la técnica de laMosella y Ascui (1975), aplicada en la etapa de microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho.



Figura 29. Microinjerto *in vitro* de brotes babaco en patrones de jigacho, realizado a través de un corte en V, a los 7 días de haber realizado la injertación e introducido en el medio de cultivo.

ANEXO D: Tratamientos previamente realizados en las etapas de introducción y enraizamiento de brotes apicales de babaco y jigacho, y microinjertación *in vitro* de babaco en patrones de jigacho en babaco

ANEXO D1: Tabla con los tratamientos previamente realizados en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho.

Tabla 23

Tratamientos realizados para el establecimiento de la dosis adecuada de auxinas y citoquininas en la etapa de introducción de brotes apicales de babaco y jigacho

Tratamiento	Citocinina:	Auxina:
	6-BAP	AIA
	(mg/L)	(mg/L)
Control	0	0
B1	2	0,3
B2	2,5	0,3

B3	3	0,3
B4	2	0,8
B5	2,5	0,8
B6	3	0,8

ANEXO D2: Tabla con los tratamientos previamente realizados en la etapa de enraizamiento de los patrones de jigacho.

Tabla 24

Tratamientos realizados para el establecimiento de la dosis adecuada de auxinas y citoquininas en la etapa enraizamiento de los patrones de jigacho

Tratamiento	Citocinina: 6-BAP (mg/L)	Auxina: AIA (mg/L)
Control	0	0
B1	0,5	1,5
B2	0,5	3
B3	0,5	5
B4	1	1,5
B5	1	3
B6	1	5