



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: “ELONGACIÓN DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR
DE SEGMENTOS PROXIMALES DE HOJAS DEL HÍBRIDO
BABACO [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]”

AUTOR: TITUAÑA CEVALLOS, JENNIFER JAZMÍN

DIRECTOR: M.Sc. JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ,

Ph.D. (c)

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**ELONGACIÓN DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE SEGMENOS PROXIMALES DE HOJAS DEL HÍBRIDO BABACO [*Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo]**”, realizado por la señorita **JENNIFHER JAZMÍN TITUAÑA CEVALLOS**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **JENNIFHER JAZMÍN TITUAÑA CEVALLOS** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

M.Sc. Mónica Jadán, Ph.D. (c)

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **JENNIFHER JAZMÍN TITUAÑA CEVALLOS**, con cédula de identidad N° 1718643503, declaro que este trabajo de titulación “**ELONGACIÓN DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE SEGMENGOS PROXIMALES DE HOJAS DEL HÍBRIDO BABACO [*Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo]**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

Jennifer Jazmín Tituaña Cevallos

C.C 1718643503



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA

AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **JENNIFHER JAZMÍN TITUAÑA CEVALLOS**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**ELONGACIÓN DE BROTES OBTENIDOS A PARTIR DE SEGMENOS PROXIMALES DE HOJAS DEL HÍBRIDO BABACO [*Vasconcellea x heilbornii* (Badillo) Badillo]**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 10 de Marzo del 2017

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Jennifer J. Cevallos', is written over a horizontal line.

Jennifer Jazmín Tituaña Cevallos

C.C 1718643503

DEDICATORIA

A Dios, mi padre celestial por a su infinito amor y bendiciones, por iluminar a diario mi mente, mi alma y mi corazón. Gracias a él he podido culminar con ésta y cada una de las etapas en mi vida, sin él no podría estar aquí.

A mi madre, Elizabeth, por ser mi fortaleza, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional y por ser la mujer extraordinaria a quien admiro y amo mucho. ¡Lo logramos mamita linda!

A mi padre, Angel por enseñarme que con amor, esfuerzo y disciplina puedo alcanzar todo lo que me proponga y por siempre creer en que soy la mejor.

A mis abuelitos, Luz María y José David, por cuidar de mí, ser como mis padres, ser mi ejemplo a seguir y siempre mostrar su apoyo incondicional.

A mis hermanas, Dagmar e Ingrid, por ser mis primeras amigas, a quienes siempre apoyaré y cuidaré.

A mis sobrinitos, Jhordanita y Angelito, porque con su ternura e inocencia son la alegría de mi vida.

A Santiago, por ser mi amigo, mi apoyo y no permitir que desmaye en los momentos turbulentos y de decline.

Jennifer Jazmín

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por cada una de las experiencias que he tenido que pasar para alcanzar este logro, por iluminar y guiar mi camino, aún en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi papá, Ángel, por ser el hombre trabajador, honesto, cariñoso, al que admiro porque con esfuerzo y tenacidad ha sido un gran ejemplo. A mi mamá, Elizabeth, por ser una extraordinaria mujer y madre, que a diario nos demuestra su amor incondicional, sin su sacrificio no podría estar donde estoy ahora. Los dos son los seres más importantes de mi vida, muchas gracias por el amor que me han dado.

A mis hermanas, Dagmar e Ingrid, por aquellas palabras de aliento que llegaron el momento preciso de mi vida, y sobre todo por el mayor regalo, mis grandes bendiciones, mis pequeños, mi alegría, mi Angelito y mi Jhordanita.

A mis abuelitos, a mi Mamá Luchita y a mi Papá David, por todo su cariño y amor, por sus consejos, y todo su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Que Dios siempre les bendiga y les proteja.

A mis ñaños, David, Iván y Eduardo; por creer en mí, por todos sus consejos y palabras de apoyo.

A todos mis familiares, porque de una u otra forma han formado parte de los eventos más importantes de mi vida.

A mi directora de tesis, M. SC. Mónica Jadán, PhD (c) por permitirme desarrollar mi proyecto de investigación en su laboratorio, por confiar en mí, por sus consejos, orientación, confianza y conocimientos brindados durante este tiempo que me han permitido crecer como persona y profesional, de todo corazón que Dios la bendiga.

A Claudia Segovia PhD., por toda su ayuda para el desarrollo de esta investigación, sin su gran ayuda no sería posible la culminación de este proyecto, pero sobre todo por compartir sus conocimientos en el área académica y en la parte humana.

A Dra. Karina Proaño, PhD., por compartir todos sus conocimientos los cuales hicieron que en mí surja el interés y cariño por la Biotecnología Vegetal.

A Santiago, por su cariño y amor, por ser la persona incondicional y extraordinaria que siempre me ha dado una palabra de aliento.

A mis amigos: Luis, Bryan, Lore y Steeven, por su amistad sincera que ha perdurado años, ni el tiempo ni la distancia ha impedido que nuestra amistad esté intacta. A mis amigas: Kary, Danny, Jasita, Gaby y Dennisse, gracias por brindarme su amistad, por todos los momentos únicos vividos, son recuerdos que guardo con mucho cariño en mi corazón.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Marco teórico.....	5
1.4.1. Babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo]”	5
1.4.1.1. Origen y distribución.....	5
1.4.1.2. Clasificación taxonómica	7
1.4.1.3. Características Morfológicas.....	7
1.4.1.4. Condiciones ambientales de cultivo	11
1.4.1.5. Propagación.....	11

1.4.1.5.1.	Por estacas.....	11
1.4.1.5.2.	Por brotes tiernos	12
1.4.1.5.3.	Por injerto	12
1.4.1.5.4.	Plagas y enfermedades.....	12
1.4.1.5.5.	Producción y comercialización del babaco.....	13
1.4.2.	Cultivo <i>in vitro</i>	14
1.4.2.1.	Organogénesis	16
1.4.2.1.1.	Organogénesis directa.....	16
1.4.2.1.2.	Organogénesis indirecta.....	17
1.4.2.2.	Medios de cultivo	18
1.4.2.2.1.	Agua.....	18
1.4.2.2.2.	Fuente de carbono.....	18
1.4.2.2.2.1.	Maltosa	19
1.4.2.2.3.	Sales minerales	20
1.4.2.2.4.	Medio Woody Plant (WPM).....	20
1.4.2.3.	Fitohormonas.....	21
1.4.2.3.1.	Auxinas	22
1.4.2.3.2.	Citoquinas	22
1.4.2.3.2.1.	Tidiazuron (TDZ)	22
1.4.2.3.3.	Giberelinas.....	23
1.4.2.3.3.1.	Ácido giberélico o GA ₃	24
1.5.	Hipótesis.....	24
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		25
2.1	Localización del ensayo	25

2.2	Fase de campo.....	25
2.2.1	Pre-tratamiento de desinfección y control fitosanitario	26
2.2.2	Recolección de muestras.....	27
2.3	Fase de Laboratorio.....	28
2.3.1	Introducción y desinfección de explantes	28
2.3.2	Inducción a brotes	29
2.3.3	Multiplicación de brotes.....	33
2.3.4	Elongación de brotes.....	35
3	CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	38
3.1	Inducción a brotes	38
3.1.1	Presencia de callo.....	40
3.1.2	Presencia de estructuras organogénicas	46
3.1.3	Número de estructuras organogénicas	53
3.1.4	Número de brotes.....	59
3.2	Multiplicación de brotes.....	66
3.2.1	Presencia de callo.....	67
3.2.2	Número de brotes	74
3.3	Elongación de brotes.....	81
3.3.1	Elongación de brotes.....	82
4	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	88
4.1	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	88
4.2	Inducción y multiplicación de brotes	91
4.3	Elongación de brotes.....	95
5	CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	98

6	CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES	99
7	CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Información referente a la superficie cultivada y producción de babaco en el Ecuador.	14
Tabla 2 Contenido de Microelementos en la composición química del medio Woody Plant.	20
Tabla 3 Contenido de Macroelementos en la composición química del medio Woody Plant.	21
Tabla 4 Variaciones de las concentraciones de TDZ a utilizar para la inducción a brotes.	29
Tabla 5 Variaciones de las concentraciones de TDZ a utilizar para la multiplicación de brotes.	33
Tabla 6 Variaciones de las concentraciones de GA ₃ utilizadas en la elongación de brotes.	36
Tabla 7 Niveles de clasificación para las longitudes de los brotes.	37
Tabla 8 Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de callo en la fase de inducción a brotes.	40
Tabla 9 Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de estructuras organogénicas en la fase de inducción a brote.	46
Tabla 10 Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de estructuras organogénicas en la fase de inducción a brotes.	53
Tabla 11 Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de brotes en la fase de inducción a brotes.	60
Tabla 12. Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.	68
Tabla 13 Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de brotes en la fase de multiplicación de brotes.	75
Tabla 14 Tabla de contingencia para los resultados obtenidos en la variable “longitud de brotes” clasificados por niveles.	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del babaco en el Ecuador en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha y Carchi.....	6
Figura 2. Planta de babaco en cultivo ex vitro.	8
Figura 3. Frutos de babaco en forma pentágona con ápice acuminado.	9
Figura 4. Hojas grandes pentalobulares de babaco.	10
Figura 5. Planta de babaco con “Fusariosis”.....	13
Figura 6. Esquema del proceso de organogénesis directa usando como explante una hoja.....	17
Figura 7. Estructura química de la maltosa.	19
Figura 8. Estructura química de Tidiazorón (TDZ).	23
Figura 9. Planta de babaco ubicada en el invernadero en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.	26
Figura 10. A. Hojas de babaco seleccionadas para ser introducidas en cultivo <i>in vitro</i> , con aproximadamente 5 centímetros de longitud. B. Segmentos de la hoja. 1. Segmento distal. 2. Segmento medial. 3. Segmento proximal utilizado en la investigación.....	27
Figura 11. Proceso de desinfección de hojas de babaco [<i>Vasconcellea</i> × <i>heilbornii</i> (Badillo) Badillo]”. A. Agua corriente. B. Detergente al 1%. C. Cloruro de mercurio 0,5 g/L. D. Hipoclorito de sodio al 0,25%.....	28
Figura 12. Cámara de flujo utilizada para realizar la introducción de los explantes.	30
Figura 13. Tamaño del segmento de hoja de aproximadamente 1 cm ² utilizado en la investigación.	31
Figura 14. Disposición de los explantes en el medio de inducción a brote.	31
Figura 15. Modelo del explante inicial utilizado en la fase de multiplicación, observado en el estéreo microscopio (38X), todos los explantes presentaban 1 brote en su estructura al iniciar esta fase.	34
Figura 16. Presencia de callo en explante evaluado luego de 6 semanas en medio de inducción a brotes, observado en el estéreo microscopio (38X).....	38

Figura 17. Observación de estructuras organogénicas en el estéreo microscopio (38X) luego de 5 semanas en medio de inducción a brotes.	39
Figura 18. Brotes observadas en el estéreo microscopio (38X), a las 6 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de inducción a brotes.	39
Figura 19. Porcentaje de explantes a las 3 y 6 semanas que presentan presencia y ausencia de callo en la fase de inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT ₁ ” (5 mg/L de TDZ) y “AT ₂ ” (7 mg/L de TDZ).	41
Figura 20. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 3 semanas en la fase de inducción a brotes.	42
Figura 21. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 6 semanas en la fase de inducción a brotes.	44
Figura 22. Porcentaje de explantes a las 2 y 5 semanas que presentan presencia y ausencia de estructuras organogénicas en la fase de inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT ₁ ” (5 mg/L de TDZ) y “AT ₂ ” (7 mg/L de TDZ).	47
Figura 23. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de estructuras organogénicas en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brotes.	48
Figura 24. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de estructuras organogénicas en los explantes luego de 5 semanas en la fase de inducción a brote.	51
Figura 25. Número de estructuras organogénicas presentes en cada uno de los tratamientos a las 2 y 5 semanas en la fase de inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT ₁ ” (5 mg/L de TDZ) y “AT ₂ ” (7 mg/L de TDZ).	54
Figura 26. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de estructuras organogénicas en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brotes.	55

Figura 27. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de estructuras organogénicas en los explantes luego de 5 semanas en la fase de inducción a brotes.	57
Figura 28. Número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos a las 3 y 6 semanas en la fase de inducción a brotes, utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT ₁ ” (5 mg/L de TDZ) y “AT ₂ ” (7 mg/L de TDZ).....	61
Figura 29. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 3 semanas en la fase de inducción a brotes.	62
Figura 30. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 6 semanas en la fase de inducción a brotes.	64
Figura 31. Explante con brote (flecha rojo) y callo (flecha celeste) observado en el estéreo microscopio (38x).....	67
Figura 32. Porcentaje de explantes a las 2 y 4 semanas que muestran presencia y ausencia de callo en la fase de multiplicación.	69
Figura 33. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brote.....	70
Figura 34. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 4 semanas en la fase de multiplicación de brotes.....	72
Figura 35. Número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos a las 2 y 4 semanas en la fase de multiplicación de brotes.....	76
Figura 36. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 2 semanas en la fase de multiplicación de brotes.....	77
Figura 37. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 4 semanas en la fase de multiplicación.	79
Figura 38. Medición de la longitud de los brotes (cm.).	82
Figura 39. Frecuencia presente de longitudes pertenecientes a cada nivel, con respecto la concentración de GA ₃	83
Figura 40. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable longitud de brotes en los explantes luego de 2 semanas en la fase de elongación de brotes.	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo.	42
Cuadro 2 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo.	43
Cuadro 3 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable presencia de callo.	45
Cuadro 4 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable presencia de callo.	45
Cuadro 5 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable presencia de estructuras organogénicas.	49
Cuadro 6 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable presencia de estructuras organogénicas.	49
Cuadro 7 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable presencia de estructuras organogénicas.	51
Cuadro 8 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable presencia de estructuras organogénicas.	52
Cuadro 9. Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de estructuras organogénicas.	55
Cuadro 10 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de estructuras organogénicas.	56
Cuadro 11 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable número de estructuras organogénicas.	58
Cuadro 12. Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable número de estructuras organogénicas.	58
Cuadro 13 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 3 semanas para la variable número de brotes.	62
Cuadro 14 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 3 semanas para la variable número de brotes.	63

Cuadro 15 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable número de brotes.....	65
Cuadro 16. Prueba de realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable número de brotes.	65
Cuadro 17 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.	70
Cuadro 18 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.	71
Cuadro 19 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable presencia de callo.....	73
Cuadro 20 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable presencia de callo.....	73
Cuadro 21 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de brotes.	77
Cuadro 22 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de brotes.	78
Cuadro 23 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable número de brotes.....	80
Cuadro 24 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable número de brotes.....	80
Cuadro 25 Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable longitud de brotes.	85
Cuadro 26 Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable longitud de brotes.	86

LISTADO DE ABREVIATURAS

TDZ: Thidiazuron

6-BAP: 6-bencilaminopurina

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar

WPM: Woody Plant Medium (1980)

CH: Caseína Hidrolizada

AdS: Sulfato de adenina

MS: Murashige & Skoog (1962)

v/v: volumen/volumen

p/v: peso/volumen

GA₃: Ácido giberélico

RESUMEN

El babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] es un híbrido natural originado en Ecuador a partir del cruce entre *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea pubescens*, cuyos frutos son considerados singulares, por su elevado contenido de vitamina C y por poseer una elevada fuente proteica. El presente trabajo tiene como objetivo establecer un medio de inducción, multiplicación y elongación de brotes obtenidos a partir de segmentos proximales de hojas de babaco. Para las dos primeras fases se determinó que el medio óptimo para la obtención y multiplicación de brotes fue el medio suplementado con una concentración de 5 mg/L de TDZ ya que luego de 6 semanas de incubación presentó 137 brotes y luego de 2 semanas en incubación se obtuvo 113 brotes, respectivamente. Debido a las altas concentraciones de TDZ en ambos medios la elongación fue limitada por lo que se usó un medio suplementado con ácido giberélico GA₃ de 0,5-4 mg/L, siendo el mejor tratamiento el medio suplementado con 3 mg/L ya que presentó el 50% de los brotes con una longitud de 0,1 a 0,5 centímetros (cm), 25% con una longitud de 0,6 a 1 cm, 10% con una longitud de 1,1 a 1,5 cm y el último 15% con una longitud de 1,6 a 2 cm.

Palabras clave:

- **CULTIVO *IN VITRO***
- **BABACO**
- ***Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo**
- **ORGANOGENESIS DIRECTA**
- **TIDIAZURON**

ABSTRACT

Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] is a natural hybrid from Ecuador that comes from a crossbreeding between *Vasconcellea stipulata* and *Vasconcellea pubescens*, which fruits are considered singular because of its high C vitamin content and its high protein source. The aim's present job is to stablish a media to obtain, multiply and elongate shoots from babaco leaf's proximal segments. In the first two stages the optimum media was whose had 5 mg/L TDZ because after 6 incubation weeks there was 137 shoots and after 2 incubation weeks there was 113 shoots, respectively. Due the high TDZ concentrations, there was necessary to use an elongation media with 0,5-4 mg/L giberelic acid (GA₃), the best treatment was whose had 3 mg/L because it showed 50% of shoots with a length of 0,1 to 0,5 centimeters (cm.), 25% with a length of 0,6 to 1 cm, 10% with a length of 1,1 to 1,5 cm and the last 15% with a length of 1,6 to 2 cm.

Keywords:

- **IN VITRO CULTURE**
- **BABACO**
- ***Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo**
- **DIRECT ORGANOGENESIS**
- **THIDIAZURON**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

Ecuador es reconocido a nivel mundial por su riqueza en flora y fauna, la cual está asociada a una serie de variables ambientales como: el clima, el relieve, el suelo, regímenes de inundación, entre otros factores; que interactúan y dan origen a diferentes paisajes naturales, donde conviven varios tipos de vegetación en permanente amenaza, por una continua y persistente presión del ser humano sobre los recursos naturales (MAE, 2010). Actualmente es importante favorecer a la conservación de la biodiversidad e incrementar la producción y exportación de productos nativos ya que según el plan nacional del buen vivir, es importante promover la “soberanía alimentaria, sostenibilidad, la conservación, el conocimiento del patrimonio natural y la garantía de los derechos de la naturaleza y así conservar un ambiente sano y sustentable” (MAE, 2010).

Dentro de esta variedad de flora se encuentra el babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo], que se origina de la hibridación entre *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea pubescens*, cuyos frutos son considerados singulares, por su elevado contenido de vitamina C y por poseer una sustancia llamada papaína que ayuda a la digestión (Lim, 2012; Fabara *et al.*, 1985; García, 2011).

Según el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) actualmente en el Ecuador existen entre 20 y 25 hectáreas de cultivo a causa de dichos beneficios. Datos del Ministerio de Agricultura, en 2007, señalan que ese año se cosecharon 21 hectáreas frente a las 28 de 2006, con un rendimiento aproximado de 180.000 kilogramo por hectárea. Además el babaco produce buenos rendimientos económicos que superan a otros productos del callejón interandino, tomando en cuenta que el capital inicialmente invertido es de rápida retribución, alcanzando un rentabilidad de 123% (Avilés, 2009; García 2011).

Por ende existe una creciente demanda interna y externa, así como una alta rentabilidad, siendo una importante alternativa de exportación de la región Interandina. Sin embargo, el babaco es un fruto partenocárpico que se puede reproducir solamente por vía asexual, debido a ello se pueden perpetuar los organismos patógenos, que constituyen un gran limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, debido a que causan pérdidas entre 50 - 100% (Viteri, 1992; Coyago *et al.*, 2010; García, 2011). Adicionalmente, el período vegetativo del babaco desde la siembra hasta la recolección es de 14 meses, aunque puede variar entre los 10 a 12 meses de sembrado. Su fructificación empieza a partir del año y medio según la altitud y el clima (García, 2011).

1.2. Justificación

La gran variedad de climas que se presentan en Ecuador han permitido una extensa gama de zonas ecológicas dando origen a una amplia biodiversidad, pues de 25 de las 38 zonas de vida descritas se pueden encontrar en el Ecuador (Matute & Tirado, 2013). Este tipo de zonas permite el crecimiento especies pertenecientes a la Familia *Caricaceae*, muchas de ellas endémicas, entre las que se encuentra el género *Vasconcellea* que ha sido identificada en las provincias de: Loja, Zamora Chinchipe, El Oro, Azuay y Bolívar (Matute & Tirado, 2013).

El babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] presenta un delicado aroma y sabor, por ello es una especie importante en la industria de frutales alimenticios, motivo por el cual es cultivado en forma extensiva a nivel comercial hace aproximadamente 20 años. Además, el cultivo de babaco presenta un potencial económico en los mercados internacionales como fruta exótica, debido a las propiedades sensoriales antes mencionadas y a que es una fuente importante para la extracción de enzimas proteolíticas (García, 2011; Vaca, 2008). Este frutal presenta una de las más altas tasas de retorno dentro de los frutales ya que puede alcanzar un rendimiento promedio de 225 Tm ha⁻¹ durante su período de producción de dos a dos y medio años, con una densidad de

5500 plantas ha⁻¹ (Vaca, 2008). Actualmente, el productor ecuatoriano tiene la oportunidad de exportar a países que conforman la Unión Europea, especialmente Holanda, España, Alemania y Francia, y otros países como Chile, Estados Unidos y Colombia donde está incrementando la aceptación del babaco ecuatoriano (Bravo *et al.*, 2012; Vaca, 2008).

No obstante, siendo una especie endémica su cultivo presenta problemas fitosanitarios siendo el más importante la “Marchitez Vascular del Babaco”, causada por *Fusarium oxysporum* sp. *caricae*, que constituye el principal limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, con una incidencia de hasta el 100% (García, 2011). Debido a la necesidad de exportar este frutal y la gran limitación en el cultivo por problemas fitosanitarios es necesario realizar investigaciones relacionadas con la producción e industrialización del babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo], su comercialización, potencial nutrimental y mejoramiento genético, considerando que esta especie es silvestre (Matute & Tirado, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales permite la obtención de plantas con características genéticas superiores a las de su misma especie, optimizando el tiempo, espacio y costo de producción. Dentro de las técnicas que puede desarrollarse en el cultivo de tejidos vegetales se encuentra la organogénesis directa, la cual permite mejorar significativamente la producción y la calidad de los cultivos, garantizando que éste no presente enfermedad alguna (Roca & Mroginski, 1993). Mediante este trabajo de investigación se han generado nuevos conocimientos acerca del cultivo *in vitro* de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo], que pueden servir como puntal para futuras investigaciones que permitan su rápida y masiva multiplicación con el fin de preservar esta especie endémica y adicionalmente asegurar la soberanía alimentaria del Ecuador.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

“Elongar brotes obtenidos a partir de segmentos proximales de hojas del híbrido Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]”.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar un medio de cultivo óptimo para la formación de brotes a partir de explantes de hojas del híbrido babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo].
- Establecer medios de cultivo para la elongación de las brotes generadas a partir de segmentos de hojas del híbrido babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo].
- Evaluar la formación, multiplicación y elongación de brotes del híbrido babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo].

1.4. Marco teórico

1.4.1. Babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]”

1.4.1.1. Origen y distribución

La primera descripción taxonómica del babaco fue realizada por Heilborn en 1922 quien le asignó el nombre de *Carica pentagona* por creer que se trataba de una nueva especie, sin embargo, Badillo en 1987 presentó evidencias que permiten concluir que el babaco es un híbrido (Soria & Viteri, 1999).

El babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] es una planta nativa del Ecuador (Figura 1), originaria de la provincia de Loja, que se cultiva principalmente en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha y Carchi (Fabara *et al.*, 1985). Existen varios estudios sobre la clasificación de *Vasconcellea x heilbornii*, basados en estudios filogenéticos y moleculares, donde destacan dos hipótesis del origen y la ubicación taxonómica del babaco. La primera se refiere a la hibridación ocasional entre *Vasconcellea stipulata* (toronche) y *Vasconcellea cundimarcensis* (=pubescens; chamburo) (Robles *et al.*, 2016; Caetano *et al.*, 2008); lo cual dio origen a los primeros individuos de *V. heilbornii*, los cuales sufrieron autogamia y se cruzaron con *V. weberbaueri*, lo que dio origen a los primeros individuos partenocarpios de *Vasconcellea x heilbornii*. Mientras que la segunda hipótesis, señala 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).

Este frutal crece a una altura entre 1500-3000 metros, y es la planta más tolerante al frío del género *Vasconcellea* debido a que tolera temperaturas alrededor de -2°C (Lim, 2012), en comparación con otras como *Vasconcellea cundinamarcensis* que está adaptada

a temperaturas de 28° y 36°C (Jordán *et al.*, 2009), sin embargo temperatura óptima del babaco oscila entre 15-20°C y una precipitación anual entre 600-1400 mm para un óptimo crecimiento y desarrollo. Actualmente se cultiva exitosamente en Nueva Zelanda, Australia, Israel, Italia y California (Lim, 2012).



Figura 1. Distribución del babaco en el Ecuador en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha y Carchi.

Fuente: Modificado de Deposithphotos (2016).

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

Según Quintana (2014), la clasificación taxonómica del babaco es la siguiente:

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Brassicales
- **Familia:** Caricaceae
- **Género:** *Vasconcellea*
- **Especie:** *Vasconcellea x heilbornii* (Badillo, 2001).
- **Nombre común:** Babaco (Quintana, 2014).

1.4.1.3. Características Morfológicas

El babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] es un arbusto herbáceo de 1,5 – 3 metros de altura (Figura 2) (Lim, 2012). Su tallo alcanza 20 centímetros de diámetro, es suculento (retiene gran cantidad de agua), presenta poca ramificación y está cubierto por cicatrices foliares. Las hojas están agrupadas en una corona terminal densa (Matute & Tirado, 2013).



Figura 2. Planta de babaco en cultivo ex vitro.

Fuente: (Lim, 2012).

Cuando la planta es joven presenta raíces unitarias de color café claro, de consistencia muy delicada, que al romperse exuda látex pegajoso. Las raíces principales logran poca profundidad (un metro), las raíces secundarias son largas (50 a 60 centímetros), ambos tipos de consistencia carnosa, mientras que las raíces terciarias son de mayor proporción y ramificadas, más blancas, débiles, quebradizas y poseen gran capacidad de retención de agua (AAIC, 2003).

Posee flores femeninas (monoica) solitarias que aparecen de manera continua en las axilas de las hojas, de forma acampanada, sobre cortos pedúnculos, de color verdoso; con 5 pétalos, ovario súpero con 5 carpelos y el estigma es sésil, blanco y dividido en 5 porciones (Matute & Tirado, 2013; AAIC, 2003). Los frutos (Figura 3) sin semilla son partenocárpicos de forma oblonga, es decir, pentágona con ápice acuminado, de color

amarillo, exquisito aroma cuando están maduros y de gran tamaño, llegando a alcanzar aproximadamente 23 centímetros de longitud, 8 centímetros de ancho y un peso de 703,84 g en promedio. El número de frutos puede oscilar entre 60 durante su ciclo de vida de 24 meses (García, 2011; Quillay, 2011).

El fruto posee 0,9 g/100 de fruta en proteína, 6 g/100 de fruta en carbohidratos, 0,7 g/100 de fruta en fibra, 0,2 g/100 de fruta en grasa y 93 g/100 de fruta en agua (Avilés, 2009).

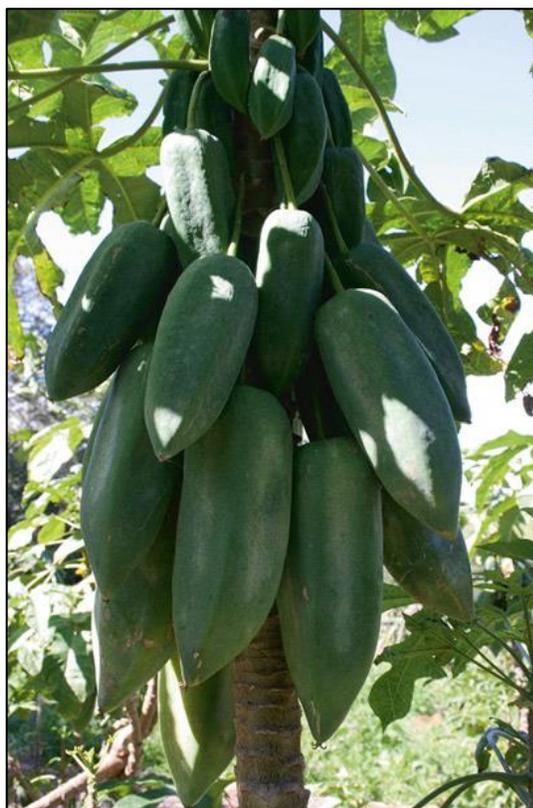


Figura 3. Frutos de babaco en forma pentágona con ápice acuminado.

Fuente: (Lim, 2012).

Las hojas son de color verde cuando permanecen a lo largo del tronco, su pecíolo carnoso puede llegar hasta los 30 centímetros (Figura 4). Son de forma palmeada, están divididas entre 5 a 7 lóbulos de ápice agudo su raquis de la inflorescencia esparcidamente pilosas; los pecíolos miden entre 15 y 45 centímetros (Matute & Tirado, 2013). Una hoja adulta junto con su pecíolo pueden alcanzar una longitud de 60 a 80 centímetros, en esta edad el haz es de color verde oscuro mientras que el envés es de color verde claro y posee nervaduras muy sensibles y acentuadas (AAIC, 2003).



Figura 4. Hojas grandes pentalobulares de babaco.

Fuente: (Lim, 2012).

1.4.1.4. Condiciones ambientales de cultivo

La humedad óptima de crecimiento del babaco oscila entre 60 y 80%, mientras que el fotoperíodo debe ser al menos de 4-5 horas de luz, aunque se ha visto que gran cantidad de luz puede ser favorable ya que se obtiene mejor calidad de fruto y mayor desarrollo de plantas, aquellas expuestas directamente al sol (AAIC, 2003).

En condiciones de invernadero se necesita riegos cada 12 o 15 días. El tipo de suelo ideal para su cultivo es el de textura franco-arcillo-arenoso, suelto y rico en materia orgánica (3%), con un pH óptimo de 7,1 aunque puede oscilar entre 5,8 y 8,2 (AAIC, 2003).

1.4.1.5. Propagación

Considerando que el babaco es un híbrido natural originado entre *Vasconcellea stipulata* y *Vasconcellea cundinamarcensis* y que su fruto carece de semillas, la propagación del babaco solo se realiza de manera asexual. Usualmente los mecanismos son mediante estacas, brotes tiernos o por injertos (Fabara *et al.*, 1985; AAIC, 2003).

1.4.1.5.1. Por estacas

Las estacas se pueden obtener de las plantas más robustas, sanas, maduras, de mínimo de 2 años de edad, de preferencia de cultivos que se encuentren a campo abierto. La longitud de la estaca debe ser entre 20 y 25 centímetros con un diámetro de 3 a 20 centímetros, se debe realizar un corte superior en bisel (AAIC, 2003). La estaca debe permanecer durante 8 días bajo sombra, hasta eliminar el látex y cicatrizar los cortes. Posteriormente las estacas son desinfectadas con fungicida bactericidas como hidróxido

de cobre, para evitar ataque de *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*. El enraizamiento se logra en 10 o 12 semanas (AAIC, 2003).

1.4.1.5.2. Por brotes tiernos

El método consiste en extraer brotes de 10 centímetros de largo y de 1 a 2,5 centímetros de diámetro de las plantas en crecimiento o en producción; para luego insertarlos en un sitio previamente desinfectado con sulfato de cobre y Bavistin DF. Se requiere una humedad relativa del 90% y una temperatura de 22°C (AAIC, 2003).

1.4.1.5.3. Por injerto

Este método consiste en decapitar al patrón a una altura de 10 centímetros, para luego realizar una hendidura diametral longitudinal en la que se injerta al babaco, con un brote tierno del mismo diámetro que el patrón, luego es necesario recubrir con una funda para prevenir el ingreso de parásitos (AAIC, 2003).

1.4.1.5.4. Plagas y enfermedades

El principal problema fitosanitario es la “Fusariosis” o “Marchitez Vascular del Babaco” (Figura 5), causada por *Fusarium oxysporum* sp. *caricae*, que constituye el principal limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, con una incidencia de hasta el 100% (García, 2011).

Adicionalmente el babaco puede ser afectado por plagas generadas por pulgón (*Aphis* sp), ácaros (*Tetranychus urticae*), nematodos (*Melodogine incognita*). Dentro de las enfermedades se tiene la lancha temprana (*Alternaria* sp.), cenicilla (*Oidium* sp.),

antracnosis (*Mycosphaerella* sp.), peca (*Asperosporium* sp.), phoma (*Phyllosticta* sp., *Phoma* sp.), pudrición del fruto (*Colletotrichum* sp.), bacteriosis (*Erwinia caratovora*), pudrición de raíces y tallo (*Fusarium oxiporum*), enfermedades causadas por el virus del mosaico y virus tipo rugoso (AAIC, 2003).



Figura 5. Planta de babaco con “Fusariosis”.

Fuente: (Bravo *et al.*, 2012).

1.4.1.5.5. Producción y comercialización del babaco

El mercado del babaco tiene una gran aceptabilidad a nivel nacional e internacional, siendo un potencial producto de exportación debido a su elevado contenido de vitamina C y además por poseer la enzima papaína que ayuda a la digestión, específicamente al desdoblamiento de la proteína animal. Entre las ventajas de comercialización que posee el babaco son: su presencia, color, olor, sabor y su contenido de sustancias elementales para la nutrición humana (Avilés, 2009).

Según el MAGAP (2013), la superficie promedio de babaco cultivado en el país entre los años 2008 al 2012 (Tabla 1), es de 104,50 hectáreas correspondiente a una producción nacional de 10.223,4 toneladas.

Tabla 1
Información referente a la superficie cultivada y producción de babaco en el Ecuador.

Años	Superficie, Ha.	Producción, Ton.
2008	111	10.359,0
2009	110	10.475,1
2010	104	9.903,8
2011	106	10.094,2
2012	108	10.284,7
Promedio TOTAL	104,50	10.223,4

Fuente: (MAGAP, 2013)

1.4.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, representa una técnica segura para la propagación rápida, masiva y clonal de plantas; que se basa en el principio de totipotencia celular vegetal, capacidad que tiene una célula para regenerar a partir de ella, los diferentes tipos de células que componen un organismo multicelular (Pérez *et al.*, 1998). El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que contribuye al desarrollo tecnológico agrícola y a la conservación de la biodiversidad de las especies vegetales; y que además permite la obtención de plantas con características superiores en la producción, resistencia a patógenos y enfermedades. Los factores que tienen influencia en el cultivo de tejidos son

el genotipo de la planta madre utilizada, el tipo de explante a introducir, el método de regeneración de la planta y el objetivo a alcanzar por la técnica de cultivo *in vitro*. Dentro de los objetivos se puede tener la propagación clonal, la obtención de metabolitos secundarios, la transgénesis de plantas o la obtención de embriones somáticos. El cultivo *in vitro* presenta algunas ventajas como la rápida multiplicación de plantas de difícil reproducción en un menor espacio y tiempo, bajo condiciones totalmente asépticas y controladas (temperatura, intensidad de luz, humedad relativa, fotoperiodo) (Roca & Mroginski, 1993).

El cultivo de tejidos permite propagar grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y en espacios reducidos. Además permite obtener plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma y estudios relacionados con ingeniería genética (Vaca, 2016).

El proceso de micropropagación *in vitro* inicia con la etapa O, en la cual se selecciona a las plantas donadoras que posean mejores características y que no tengan enfermedades con el objetivo de que al concluir el cultivo *in vitro* se tenga como resultado plantas sanas y en buen estado (Martínez & Agustí, 2006).

Una vez que se ha realizado la selección de la planta donadoras se continúa con la etapa I. En esta etapa se selecciona el tipo de explante con el que se va a trabajar, para luego continuar con el establecimiento del proceso de desinfección con el que obtendrá explantes libres de contaminación. En esta etapa se establece un medio de cultivo que permita el crecimiento adecuado del explante sembrado (Martínez & Agustí, 2006).

La etapa II corresponde a la multiplicación de las plantas que ya están introducidas, para lo cual se requiere el uso de algunos fitoreguladores como citoquina, auxinas, brasinolidas, etileno y ácido abscísico. Una vez que el explante sembrado presenta brotes, estos brotes son cortados y separados, para luego sembrarlos en un medio de multiplicación fresco, siendo repetitivo este proceso con el fin de obtener mayor número de plantas (Martínez & Agustí, 2006).

Luego de la etapa de multiplicación se procede con la fase III, donde se establece un protocolo de enraizamiento, donde una vez que se tienen brotes separados de las plantas se procede a cambiarlos de medio con diferentes concentraciones de auxinas, con las cuales se puede generar el crecimiento y enraizamiento de la planta. En el caso de algunas plantas esta fase se puede llevar a cabo a nivel *ex vitro* (Martínez & Agustí, 2006).

Para finalizar se procede con la etapa IV, de aclimatación, donde se induce a la planta a un proceso de adaptación a un ambiente *ex vitro*. La planta a ser aclimatada es una planta completa con raíces, hojas y de buen tamaño (Martínez & Agustí, 2006).

1.4.2.1. Organogénesis

La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explante que se quiera cultivar *in vitro* dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aún poco conocidas (Llorente, 2000).

1.4.2.1.1. Organogénesis directa

Se conoce al proceso de organogénesis directa a la formación de brotes directamente de una parte de la planta (Figura 6), sin la formación de callo, los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o con potencial para la producción de meristemas adventicios llevan rápidamente a este enfoque (Roca & Mroginski, 1993).

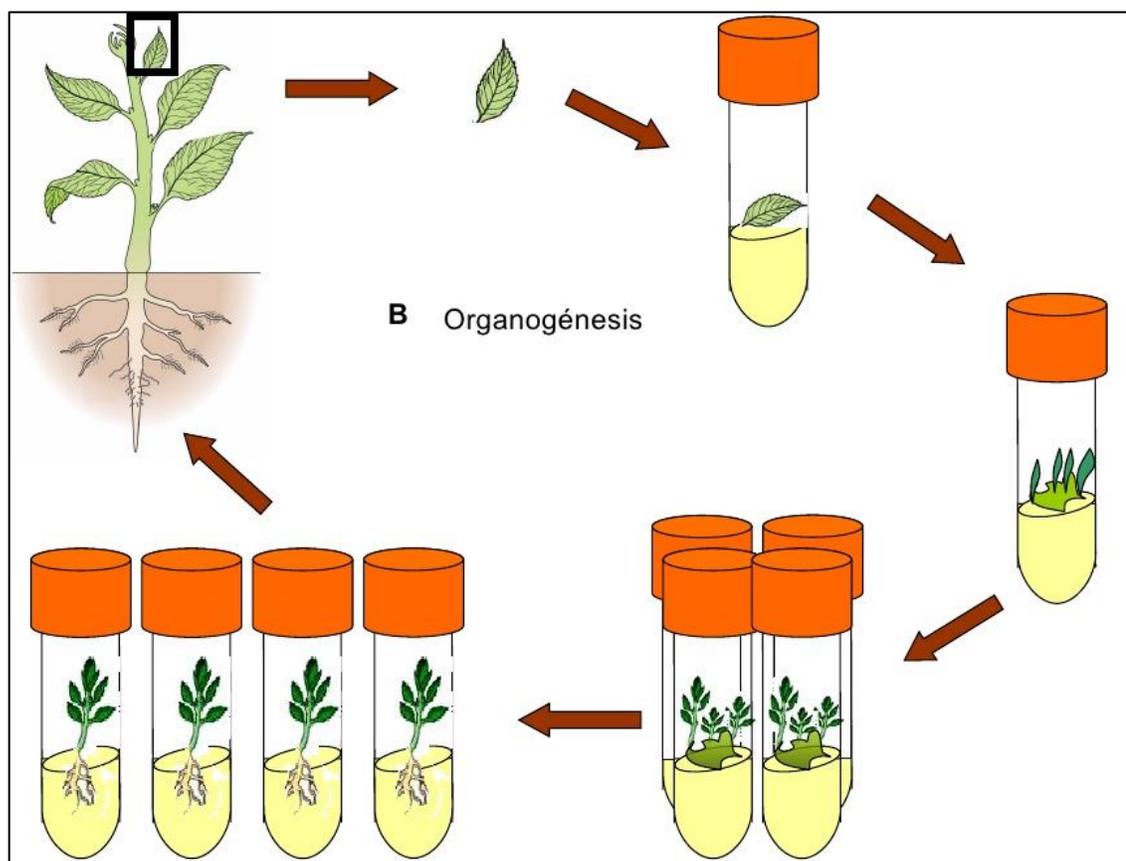


Figura 6. Esquema del proceso de organogénesis directa usando como explante una hoja.

Fuente: (Luna, 2006).

1.4.2.1.2. Organogénesis indirecta

Se conoce al proceso de organogénesis indirecta al desarrollo de órganos a partir de callos, se conocen gran variedad de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes, mediante la adición de fitohormonas (citocininas y auxinas) al medio básico; consecuentemente, se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas – citocininas (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo vegetal *in vitro* simula los nutrientes que se encuentran en el ambiente natural de la planta, éste debe contener todos los requerimientos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la especie vegetal. Mismos que pueden variar dependiendo del tipo de planta y sus necesidades. Usualmente un medio de cultivo está compuesto principalmente por: agua, fuente de carbono, sales minerales, vitaminas, fitohormonas y reguladores de crecimiento, agente gelificante y otros componentes (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.2.1. Agua

Este elemento constituye casi del 95% del medio de cultivo, aquí se disuelven los nutrientes que consume la planta (Roca & Mroginski, 1993).

1.4.2.2.2. Fuente de carbono

La fuente de carbono es un componente esencial para medio de cultivo, los explantes no son suficientemente autótrofos ya que no crecen en las condiciones apropiadas para la fotosíntesis y la fuente de carbono permite satisfacer las necesidades fotosintéticas de la planta, pues su función principal es ser fuente de energía (Vaca, 2008).

La fuente de carbono usualmente son azúcares, los cuales actúan como fuente de energía e incrementan el potencial osmótico del medio. La fuente más utilizada es la sacarosa, sin embargo, otros azúcares como la glucosa, fructosa, trehalosa, lactosa y maltosa pueden sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos (Llorente, 2000).

1.4.2.2.1. Maltosa

La maltosa o azúcar de malta, es un disacárido que se produce cuando se hidroliza el almidón mediante el uso de la enzima diastasa, presente en la malta o cebada germinada. Por otro lado, la maltasa, rompe selectivamente el enlace alfa-glicosídico hidrolizando totalmente la maltosa para dar dos unidades de D-glucosa. La maltosa es un azúcar reductor, es dextrógira y tiene un poder rotatorio específico (+136°). La estructura de este compuesto corresponde a dos unidades de glucosa unidas a través de un enlace α -glicosídico de forma “cabeza-cola” que va del carbono 1 de una molécula de glucosa al carbono 4 de la segunda molécula de glucosa (Linstromberg, 1997).

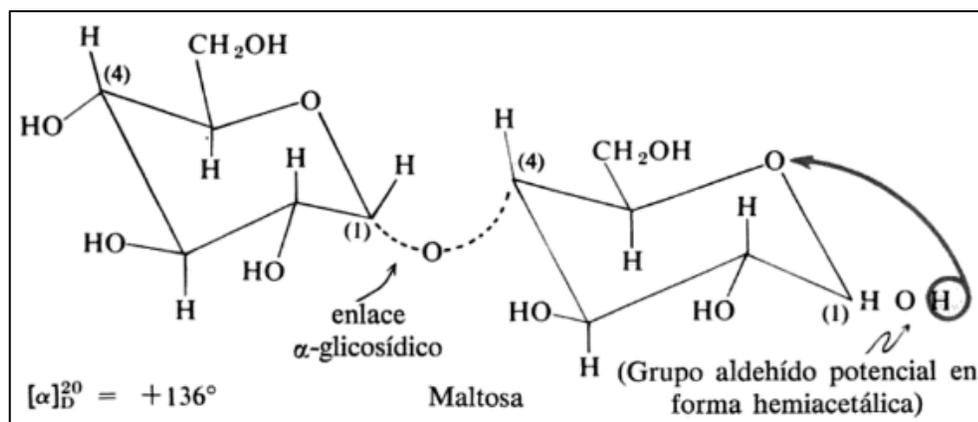


Figura 7. Estructura química de la maltosa.

Fuente: (Linstromberg, 1997).

Para algunas especies como *Carica papaya*, la maltosa promueve la morfogénesis, en comparación con otras fuentes de carbono. Este efecto puede ser atribuido a su habilidad para estabilizar la osmolaridad del medio de cultivo inicial, para hacer que el

oxígeno esté disponible en el medio de cultivo o debido a la tasa lenta de degradación de maltosa en glucosa (Jordan & Piwanski, 1997).

1.4.2.2.3. Sales minerales

En forma general el medio de cultivo tiene las siguientes principales sustancias inorgánicas: macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) que son necesarios para el crecimiento del explante actuando como activadores enzimáticos o coenzimas (Roca & Mroginski, 1993; Vaca, 2008).

1.4.2.2.4. Medio Woody Plant (WPM)

El medio *Woody Plant* ha sido formulado especialmente para el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales. En este medio el nitrato de amonio y nitrato de calcio sirven como recurso de nitrato, además es extremadamente higroscópico y debe protegerse de la humedad atmosférica. Si es posible, todo el contenido de cada botella debe utilizarse inmediatamente después de abrir o de lo contrario la porción no utilizada debe ser almacenada en un desecador y refrigerado a 2-8° C (Lloyd & McCown, 1980). La composición del medio se describe a continuación en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2
Contenido de Microelementos en la composición química del medio Woody Plant.

Microelementos	mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
FeNaEDTA	36,30

H_3BO_3	6,20
$MnSO_4 \cdot H_2O$	22,30
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,60

Fuente: (Lloyd & McCown, 1980).

Tabla 3
Contenido de Macroelementos en la composición química del medio Woody Plant.

Macroelementos	mg/L
$CaCl_2$	72,50
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	471,26
KH_2PO_4	170,00
K_2SO_4	990,00
$MgSO_4$	180,54
NH_4NO_3	400,00

Fuente: (Lloyd & McCown, 1980).

1.4.2.3. Fitohormonas

Las fitohormonas son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores y otros de tipo sintético, ambos tienen una actividad semejante, distribuyen los compuestos que la planta biosintetiza y determinan el crecimiento de los órganos de la planta. Los reguladores de crecimiento se han dividido en diversos grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, entre otros (Vaca, 2008).

1.4.2.3.1. Auxinas

Las auxinas tienen la capacidad de promover el agrandamiento y alargamiento celular, además de la división celular. En el cultivo de tejidos sus principales y mayores efectos son formación de raíces y brotes adventicios, embriogénesis, formación y crecimiento de callos, inhibición del desarrollo de yemas axilares y del crecimiento de la raíz (Vaca, 2008).

1.4.2.3.2. Citoquinas

Las citoquinas promueven la germinación, formación y crecimiento de callo, el desarrollo de yemas laterales, retardan la senescencia, inhiben el desarrollo de raíces adventicias, en presencia de auxinas promueven la división y elongación celular. Estas hormonas están involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, específicamente en la síntesis de ADN, de aquí su acción en la división celular y organogénesis (Vaca, 2008).

1.4.2.3.2.1. Tiazuron (TDZ)

Tiazuron (TDZ: N-fenil-N'-[(1,2,3-tiazol-5-il)urea]), es un herbicida y fenilurea sintético, que es un potente regulador del crecimiento y desarrollo vegetal *in vitro* (Murthy *et al.*, 1998). TDZ promueve la organogénesis planta (regeneración de brotes) y la regeneración de la planta, además esta fitohormona permite la producción de plantas madre libres de virus, acelera el crecimiento, y proporciona nuevos genotipos para el mercado. En la Figura 8 se observa la estructura química del Tiazuron (SIGMA-ALDRICH, 2016).

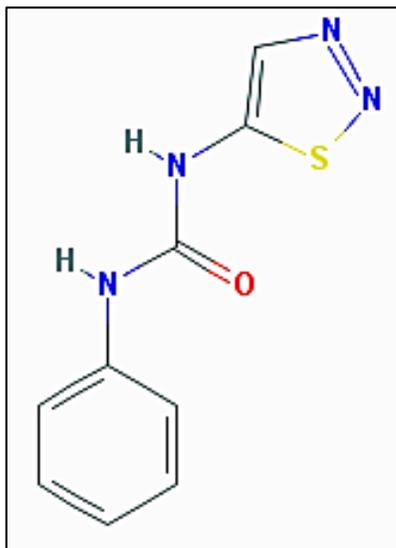


Figura 8. Estructura química de Tiazurón (TDZ).

Fuente: (SIGMA-ALDRICH, 2016).

1.4.2.3.3. Giberelinas

Las giberelinas se denominan así debido a que fueron aisladas del hongo *Gibberella fujikutoi*. Dentro de los principales efectos que presentan las giberelinas son la división y la elongación celular, actuando como un acelerador del crecimiento y la ruptura de la dormancia, inducen a la floración e inhibe la formación de raíces adventicias. Actualmente existen más de 150 formas conocidas de esta hormona, sin embargo la más usada es el ácido giberélico o GA₃ (Vaca, 2008).

1.4.2.3.3.1. Ácido giberélico o GA₃

El ácido giberélico es una hormona vegetal que estimula el crecimiento y desarrollo de la planta, es un compuesto tetracíclico di-terpenoide. GA₃ estimula la germinación de las semillas, desencadena las transiciones de meristemo a brotes, las hojas jóvenes a adultas, determina la expresión sexual y el desarrollo del grano. El sitio principal bioactivo de la fitohormona son los estambres que influyen en la producción de flores masculinas y el crecimiento del pedicelo (Gupta & Chakrabarty, 2013).

1.5. Hipótesis

El balance de fitohormonas proporciona las condiciones adecuadas para inducir la elongación de brotes obtenidos a partir de segmentos de hojas de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]”.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del ensayo

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, localizada en Sangolquí, Av. General Rumiñahui, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm.

2.2 Fase de campo

Se utilizaron 30 plantas de 2 años edad, debido a que son plantas maduras que han cumplido su ciclo de producción (Viteri, 1992). Las plantas se colocaron en fundas negras con tres cuartas partes de suelo franco-areno-arcilloso y una parte de materia orgánica (humus), provenientes de la parroquia de Yaruquí ubicada a 32 kilómetros de la ciudad de Quito, mantenidas en condiciones controladas en un invernadero dentro de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, manteniendo condiciones de 26°C de temperatura y 30% de humedad, como se presenta en la Figura 9.



Figura 9. Planta de babaco ubicada en el invernadero en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

2.2.1 Pre-tratamiento de desinfección y control fitosanitario

El tratamiento fitosanitario previo a la introducción *in vitro*, con el fin de eliminar cualquier microorganismo que pueda causar problemas durante la desinfección de los explantes se realizó 1 vez por semana. Dicho tratamiento consistió en una aplicación a nivel foliar con el producto comercial “Solvendazim” al 0.2% (v/v), cuyo componente principal es Carbendazim (500 g/L). Adicionalmente se realizó una aspersion semanal con 6-BAP (Bencilaminopurina) en el área foliar a una concentración de 0,5 mg/l (p/v).

2.2.2 Recolección de muestras

Se seleccionó las hojas pequeñas, jóvenes y verdes de al menos 3 semanas de brotadas, de alrededor de 3 centímetros de longitud, además para la recolección se incluyó el pecíolo con una longitud aproximada de entre 2 a 5 centímetros de longitud desde la base de la hoja como se observa en la Figura 10 (Jordán & Piwanski, 1997).



Figura 10. A. Hojas de babaco seleccionadas para ser introducidas en cultivo *in vitro*, con aproximadamente 5 centímetros de longitud. B. Segmentos de la hoja. 1. Segmento distal. 2. Segmento medial. 3. Segmento proximal utilizado en la investigación.

2.3 Fase de Laboratorio

2.3.1 Introducción y desinfección de explantes

Una vez finalizado el pre-tratamiento fitosanitario de las plantas madre, la selección y corte de los explantes (hoja), se inició el proceso de desinfección para eliminar todos los patógenos presentes, descrito en la Figura 11. Para ello se aplicó el protocolo modificado del proceso indicado por Moitreyee (2010), donde en primer lugar las hojas permanecieron por 10 minutos en un lavado con agua corriente, a continuación se sumergieron en una solución de detergente al 1% (p/v) durante 10 minutos para luego realizar 3 lavados con agua destilada estéril, posteriormente, una a una las hojas fueron colocadas en una solución de cloruro de mercurio a una concentración de 0.5 g/L (p/v) durante 5 segundos y finalmente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.25% (v/v) con 3 gotas/L de Tween 20, durante 5 minutos para finalmente realizar 3 lavados con agua destilada estéril (Chérrez, 2015).

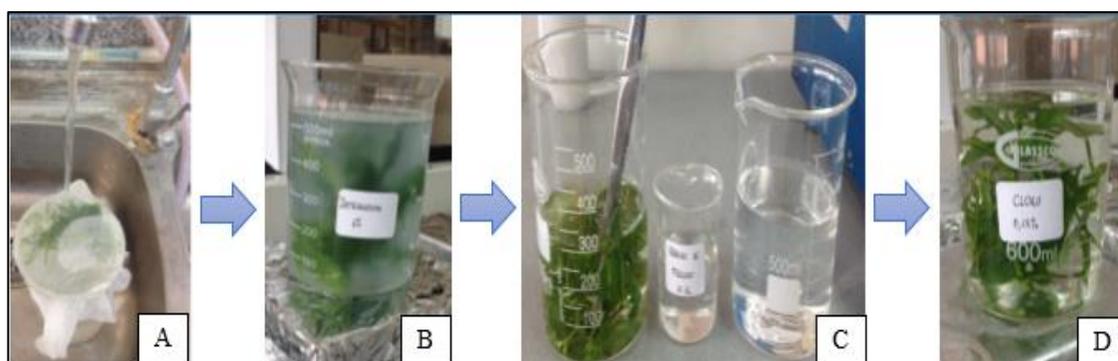


Figura 11. Proceso de desinfección de hojas de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]". A. Agua corriente. B. Detergente al 1%. C. Cloruro de mercurio 0,5 g/L. D. Hipoclorito de sodio al 0,25%.

2.3.2 Inducción a brotes

A continuación, los explantes fueron sembrados en los medios de inducción a brotes (AC, AT₁ y AT₂), cuyo medio base está compuesto por 2,41 g/L de Woody Plant Medium plant basal salt mixture (Phyto Technology Laboratories), 10 mL/L de vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 20 g/L de maltosa, 500 mg/L de caseína hidrolizada (CH) y 80 mg/L de sulfato de adenina (AdS) (Jordán & Piwanski, 1997).

Se formuló un diseño completamente al azar para experimentar con 3 tratamientos donde se varió las concentraciones de TDZ como se presenta en la Tabla 4. El pH del medio se ajustó entre 5.7 y 5.8, y posteriormente se autoclavó los mismos a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

Tabla 4
Variaciones de las concentraciones de TDZ a utilizar para la inducción a brotes.

Tratamiento	TDZ (mg/L)
AC	0
AT ₁	5
AT ₂	7

Los explantes se sembraron dentro de una cámara de flujo, como se observa en la Figura 12, en condiciones totalmente asépticas para evitar contaminación de parte del medio ambiente y/o del operador, donde se eliminó las partes afectadas por el proceso de desinfección.



Figura 12. Cámara de flujo utilizada para realizar la introducción de los explantes.

De cada hoja, se cortó un explante de aproximadamente 1 cm^2 incluyendo un segmento de pecíolo, a continuación se colocaron dos explantes en la superficie del medio de cultivo asegurando un buen contacto del envés de la hoja con el mismo, como se observa en la Figura 13 y Figura 14.



Figura 13. Tamaño del segmento de hoja de aproximadamente 1 cm² utilizado en la investigación.



Figura 14. Disposición de los explantes en el medio de inducción a brote.

Los frascos fueron almacenados en oscuridad a una temperatura aproximada de 19-23°C durante 3 días y posteriormente sometidos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30°C y una humedad ambiental de 25%. Es importante realizar un cambio de medio cada dos semanas (Jordán & Piwanski, 1997).

Durante esta fase se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, teniendo como unidad experimental cada explante; tomando en cuenta que se sembraron 2 explantes por frasco, se tuvo un total de 10 frascos, es decir 20 explantes para esta fase del proyecto. En esta etapa se evaluaron cuatro variables: presencia de callo, presencia de estructuras organogénicas, número de estructuras organogénicas y número de brotes.

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. La presencia o ausencia de callo fue evaluado a las 3 y 6 semanas de haber sembrado los explantes en los medios de inducción a brotes.

Presencia de estructuras organogénicas. 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 brotes y/o tejido organogénico, y el valor de 1 a los explantes con presencia de los mismos. La presencia de estructuras organogénicas (Figura 16) fue evaluada a las 2 y 5 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de inducción a brotes.

Número de estructuras organogénicas. Esta variable fue medida mediante observación y el conteo del número de estructuras organogénicas a las 2 y 5 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de inducción a brotes.

Número de brotes. Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes y el conteo del número de brotes (Figura 17) en el estéreo

microscopio (38X) de marca Leica, a las 3 y 6 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de inducción a brotes.

Los tratamientos utilizados en esta fase fueron evaluados mediante un análisis estadístico y exploratorio de datos con gráficas. Luego se evaluó si los datos tomados siguen una distribución paramétrica, para esto se utilizó un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica de Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado; si mediante estas pruebas se comprueba que los datos siguen una distribución paramétrica se realizará una prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el software estadístico *InfoStat*.

2.3.3 Multiplicación de brotes

Luego del proceso de inducción a brotes, estos fueron colocados en los medios de multiplicación, donde el medio base está compuesto por 2,41 g/L de WPM plant basal salt mixture (Phyto Technology Laboratories), 10 mL/L de vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 20 g/L de maltosa, 500 mg/L de caseína hidrolizada (CH) y 80 mg/L de sulfato de adenina (AdS) (Jordán & Piwanski, 1997). Para esta fase se formuló un diseño completamente al azar para experimentar con 4 tratamientos donde se varió las concentraciones de TDZ como se presenta en la Tabla 5. Los medios serán ajustados a un pH de 5.7 a 5.8, y posteriormente autoclavados a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

Tabla 5
Variaciones de las concentraciones de TDZ a utilizar para la multiplicación de brotes.

Tratamiento	TDZ (mg/L)
-------------	------------

BC	0
BT ₁	3
BT ₂	5
BT ₃	7

Los explantes con brotes fueron cortados para multiplicarlos (Figura 18), y luego sembradas dentro de una cámara de flujo en condiciones totalmente asépticas para evitar la contaminación de parte del medio ambiente y/o del operador. Cuando hubo desarrollo de callo se removió el mismo. Los frascos fueron expuestos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30 °C y una humedad ambiental de 25% (Jordán & Piwanski, 1997).



Figura 15. Modelo del explante inicial utilizado en la fase de multiplicación, observado en el estéreo microscopio (38X), todos los explantes presentaban 1 brote en su estructura al iniciar esta fase.

Durante esta fase se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, teniendo como unidad experimental cada explante. En esta etapa se evaluaron dos variables: presencia o ausencia de callo y número de brotes.

Presencia o ausencia 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. La presencia o ausencia de callo fue evaluado a las 2 y 4 semanas de haber sembrado los explantes en los medios de multiplicación de brotes.

Número de brotes. Esta variable fue medida mediante observación de cada uno de los explantes y el conteo del número de brotes en el estéreo microscopio (38X), a las 2 y 4 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de multiplicación de brotes.

Para el análisis de los resultados se desarrolló para cada variable, un análisis exploratorio de los datos mediante la construcción de gráficas y tablas de contingencia. Además se realizó un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Shapiro-Wilks y un análisis no paramétrico para las variables dicotómicas con la prueba de Kruskal – Wallis, utilizando el software estadístico *InfoStat*.

2.3.4 Elongación de brotes

Luego del proceso de multiplicación de brotes estos fueron colocadas en los medios de elongación, donde el medio base está compuesto por 2,41 g/L de WPM plant basal salt mixture (Phyto Technology Laboratories), 10 mL/L de vitaminas de Murashige y Skoog (1962) 20 g/L de maltosa, 500 mg/L de caseína hidrolizada (CH) y 80 mg/L de sulfato de adenina (AdS) (Jordán & Piwanski, 1997).

Se formuló un diseño completamente al azar para experimentar con 6 tratamientos donde se varió las concentraciones de GA₃ como se presenta en la Tabla 6. Los medios serán ajustados a un pH de 5.7 a 5.8, y posteriormente autoclavados a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. A continuación los brotes fueron sembrados dentro de una cámara de flujo donde se colocaron dos brotes en la superficie del medio de cultivo asegurando un buen contacto con el mismo. Se procuró remover la formación de callo en caso de que se presente el mismo. Los frascos fueron sometidos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30 °C y una humedad ambiental de 25% (Jordán & Piwanski, 1997).

Tabla 6
Variaciones de las concentraciones de GA₃ utilizadas en la elongación de brotes.

Tratamiento	GA ₃ (mg/L)
CC	0
CT ₁	0,5
CT ₂	1
CT ₃	2
CT ₄	3
CT ₅	4

Durante esta fase se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, teniendo como unidad experimental cada explante. Se evaluó la longitud del explante como variable de respuesta.

Elongación de brotes. En esta variable se registró la longitud desarrollada de los brotes existentes, para ello se utilizó una regla para determinar la longitud (centímetros) que alcanzaron los explantes a las 2 semanas, midiendo desde la base del mismo. Se utilizó un cuadro de clasificación para las medidas de los mismos (Tabla 7).

Tabla 7
Niveles de clasificación para las longitudes de los brotes.

Rango de longitud	Nivel
(0,1 – 0,5) cm	1
(0,6 – 1,0) cm	2
(1,1 – 1,5) cm	3
(1,6 -2) cm	4
>2 cm	5

Los tratamientos utilizados en esta fase fueron evaluados mediante un análisis estadístico y exploratorio de datos con gráficas. Luego se evaluó si los datos tomados siguen una distribución paramétrica, para esto se utilizó un análisis inferencial mediante el análisis de varianza (ANOVA) con sus supuestos: gráfica de Q-Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado; si mediante estas pruebas se comprueba que los datos siguen una distribución paramétrica se realizará una prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el software estadístico *InfoStat*.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Inducción a brotes

Una vez obtenido el material vegetal desinfectado se dio inicio a la etapa de inducción a brotes, donde el explante fue introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia total, en una cámara de flujo. Para luego ser almacenado en oscuridad a una temperatura aproximada de 19 -23°C durante 3 días y posteriormente sometidos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30°C y una humedad ambiental de 25%. Las variables de respuesta evaluadas fueron: presencia de callo, presencia de estructuras organogénicas, número de estructuras organogénicas y número de brotes (Figuras 16, 17, y 18); cuyos resultados se registraron en el Anexo A1.



Figura 16. Presencia de callo en explante evaluado luego de 6 semanas en medio de inducción a brotes, observado en el estéreo microscopio (38X).



Figura 17. Observación de estructuras organogénicas en el estéreo microscopio (38X) luego de 5 semanas en medio de inducción a brotes.



Figura 18. Brotes observadas en el estéreo microscopio (38X), a las 6 semanas de haber sembrado los explantes en el medio de inducción a brotes.

3.1.1 Presencia de callo

3.1.1.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 3 tratamientos (ver Tabla 4) para la inducción a brotes a partir de segmentos de hoja de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 8) en base a los resultados registrados en el Anexo A1, donde se puede observar que el tratamiento “AT₁” presentó menor número de explantes (9) con presencia de callo a las 6 semanas, el tratamiento “AT₂” presentó 14 explantes con presencia de callo, mientras que todos los explantes (20) en el tratamiento “AC” o control presentaron callo.

Tabla 8

Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de callo en la fase de inducción a brotes.

Tratamiento	Presencia de callo 3 semanas	Ausencia de callo 3 semanas	Presencia de callo 6 semanas	Ausencia de callo 6 semanas
AC	16	4	20	0
AT ₁	6	14	9	11
AT ₂	8	12	14	6

Para analizar la diferencia que existe entre los tratamientos utilizados en este ensayo se elaboró una gráfica de frecuencia como aprecia en la Figura 19, donde se observa que el tratamiento “AT₁” exhibió la menor presencia de callo con una frecuencia de 45%.

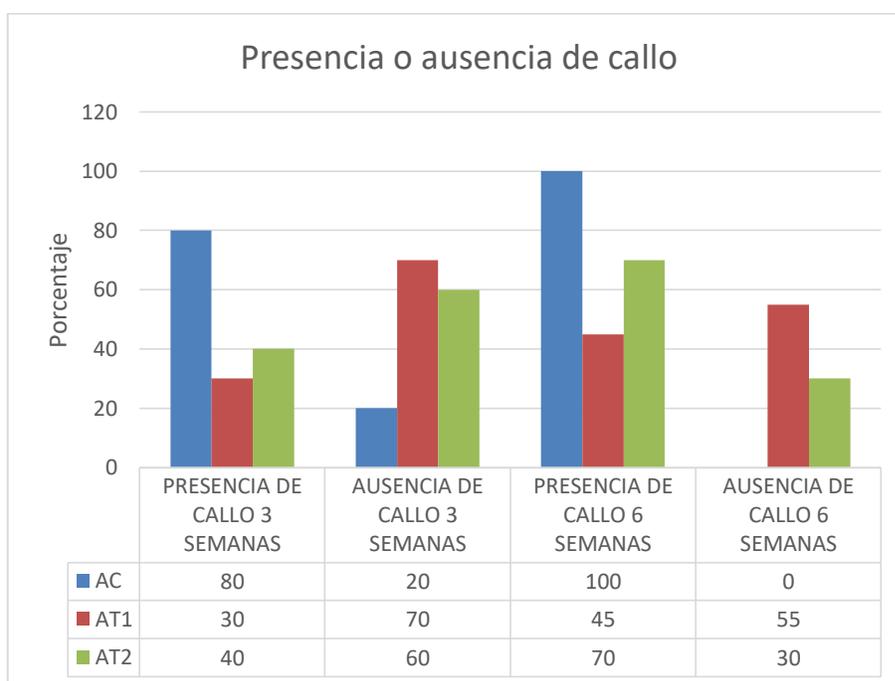


Figura 19. Porcentaje de explantes a las 3 y 6 semanas que presentan presencia y ausencia de callo en la fase de inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT₁” (5 mg/L de TDZ) y “AT₂” (7 mg/L de TDZ).

3.1.1.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 3 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B1). Al ser el valor de $p=0,0028$ en el análisis de varianza (Anexo B1), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos. Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 20.

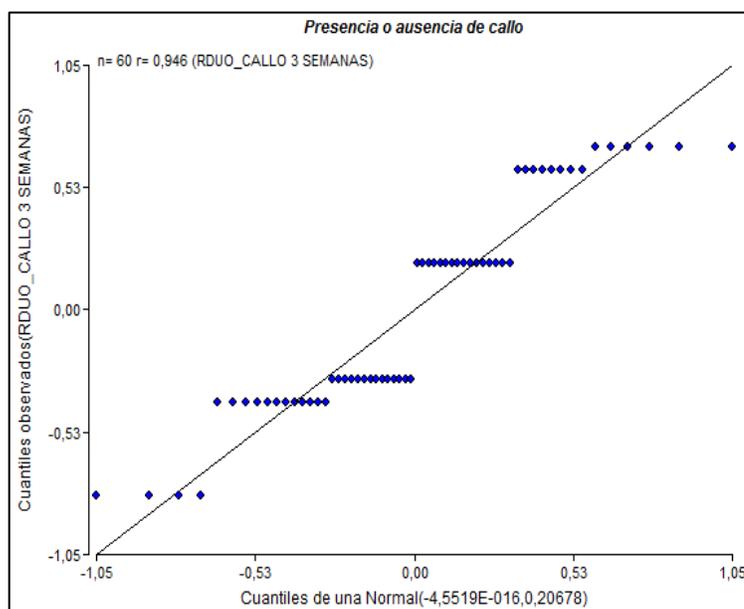


Figura 20. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 3 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 20, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO CALLO 3 SEMANAS	60	0,00	0,45	0,86	<0,0001

En el Cuadro 1, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por ello se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CALLO 3 SEMANAS	AC	20	0,80	0,41	1,00	8,26	0,0041
CALLO 3 SEMANAS	AT1	20	0,30	0,47	0,00		
CALLO 3 SEMANAS	AT2	20	0,40	0,50	0,00		

Trat.	Ranks	
AT1	24,50	A
AT2	27,50	A
AC	39,50	B

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

En el Cuadro 3 se puede ver que el tratamiento “AC” (Control) posee el valor más alto de las medias (0,80) y una desviación estándar de 0,41; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de callo en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,30) y una desviación estándar de 0,47. Mientras que el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) presentó una media de 0,40 y una desviación estándar de 0,50. A causa de esto, se presentan rangos en los cuales se agrupa a los tratamientos en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes.

Con respecto a los datos obtenidos a las 6 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B1).

Al ser el valor de $p=0,003$ en el análisis de varianza (Anexo B1), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 21.

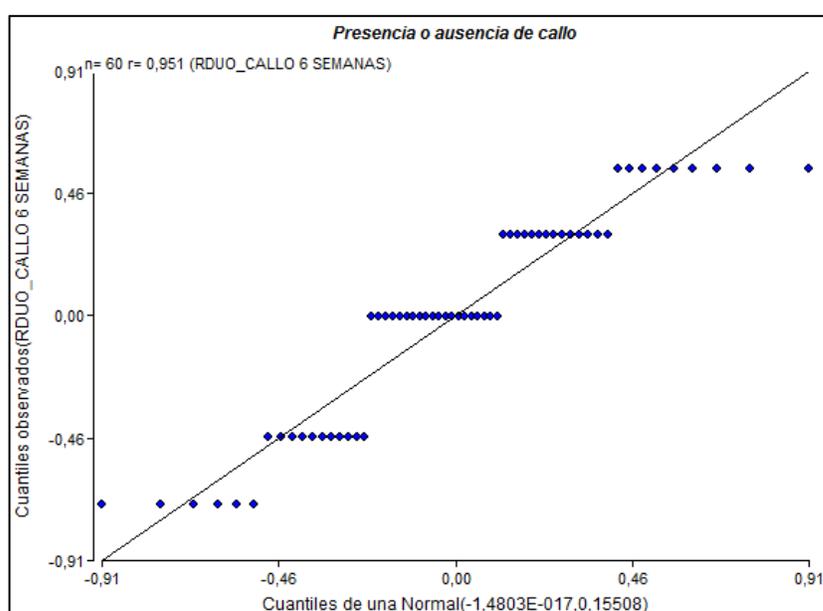


Figura 21. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 6 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 21, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable presencia de callo.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	
RDUO CALLO 6 SEMANAS	60	0,00	0,39	0,86	<0,0001	

En el Cuadro 3, se puede observar que el valor de p (<0,0001) es menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 4.

Cuadro 4

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable presencia de callo.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CALLO 6 SEMANAS	AC	20	1,00	0,00	1,00	8,95	0,0006
CALLO 6 SEMANAS	AT1	20	0,45	0,51	0,00		
CALLO 6 SEMANAS	AT2	20	0,70	0,47	1,00		
Trat. Ranks							
AT1		22,50	A				
AT2		30,00	A B				
AC		39,00	B				
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</i>							

En el Cuadro 4 se puede ver que el tratamiento los posee el valor más alto de las medias (1,00) y una desviación estándar de 0,00; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de callo en los explantes. Seguido por el tratamiento “AT₂” (7

mg/L de TDZ) que presentó una media de 0,70 y una desviación estándar de 0,47. Mientras que el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,45) y una desviación estándar de 0,51. Por lo antes mencionado, se agrupa a los tratamientos en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferente, siendo el tratamiento “AT₁” el que puede inducir a la menor formación de callo en los explantes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] en la fase de inducción a brote.

3.1.2 Presencia de estructuras organogénicas

3.1.2.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 3 tratamientos (Tabla 5) para la inducción a brotes a partir de explantes de hoja de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 8) en base a los resultados registrados en el Anexo A1, donde se puede observar que el tratamiento “AT₁” presentó mayor número de explantes (8) con presencia de brotes a las 5 semanas, el tratamiento “AT₂” presentó 3 explantes con presencia de estructuras organogénicas, mientras que ningún explante en el tratamiento “AC” o control presentó estructuras organogénicas.

Tabla 9

Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de estructuras organogénicas en la fase de inducción a brote.

Tratamiento	Presencia de	Ausencia de	Presencia de	Ausencia de
	estructuras organogénicas	estructuras organogénicas	estructuras organogénicas	estructuras organogénicas
	2 semanas	2 semanas	5 semanas	5 semanas

AC	0	20	0	20
AT₁	3	17	9	11
AT₂	2	18	3	17

Para analizar la diferencia que existe entre los tratamientos utilizados en este ensayo se elaboró una gráfica de frecuencia como aprecia en la Figura 22, donde se observa que el tratamiento “AT₁” luego de 5 semanas exhibió la mayor presencia de estructuras organogénicas con una frecuencia de 45%.

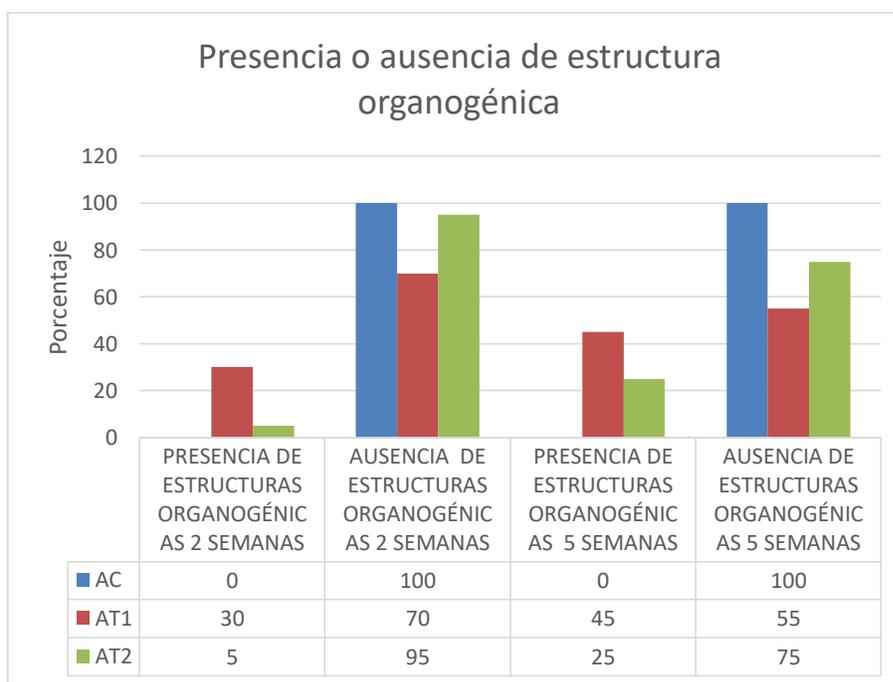


Figura 22. Porcentaje de explantes a las 2 y 5 semanas que presentan presencia y ausencia de estructuras organogénicas en la fase de

inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT₁” (5 mg/L de TDZ) y “AT₂” (7 mg/L de TDZ).

3.1.2.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 2 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B2). Al ser el valor de $p=0,0055$ en el análisis de varianza (Anexo B2), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos. Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 23.

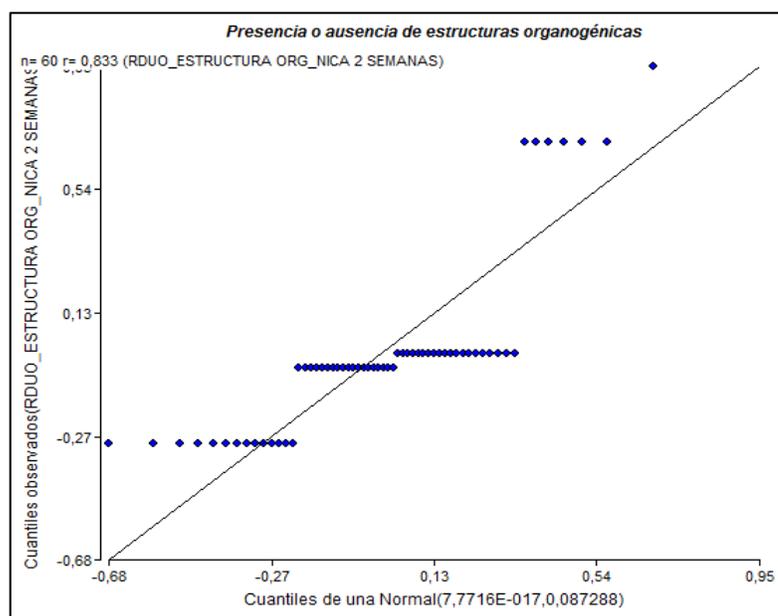


Figura 23. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de estructuras organogénicas en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 23, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 5.

Cuadro 5
Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable presencia de estructuras organogénicas.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	
RDUO ESTRUCTURA ORG NICA 2..	60	0,00	0,30	0,69	<0,0001	

En el Cuadro 5, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. A continuación, los datos se evaluaron con un análisis de varianza no paramétrica con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 6.

Cuadro 6
Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable presencia de estructuras organogénicas.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 2 ..	AC	20	0,00	0,00	0,00	3,05	0,0072
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 2 ..	AT1	20	0,30	0,47	0,00		
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 2 ..	AT2	20	0,05	0,22	0,00		
Trat. Ranks							
AC		27,00	A				
AT2		28,50	A				
AT1		36,00	A				
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</i>							

En el Cuadro 6 se puede ver que a las 2 semanas el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (0,30) y una desviación estándar de 0,47; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de estructuras organogénicas en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,05) y una desviación estándar de 0,22. Mientras que el tratamiento “AC” (control) presentó una media y una desviación estándar de 0,00; lo que sugiere que los explantes en este medio no desarrollan estructuras organogénicas. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en el grupo A; lo que quiere decir que no existe diferencia estadística a las 2 semanas de evaluación entre los tratamientos.

Con respecto a los datos obtenidos a las 5 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de estructuras organogénicas (Anexo B2).

Al ser el valor de $p=0,0025$ en el análisis de varianza (Anexo B2), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 24.

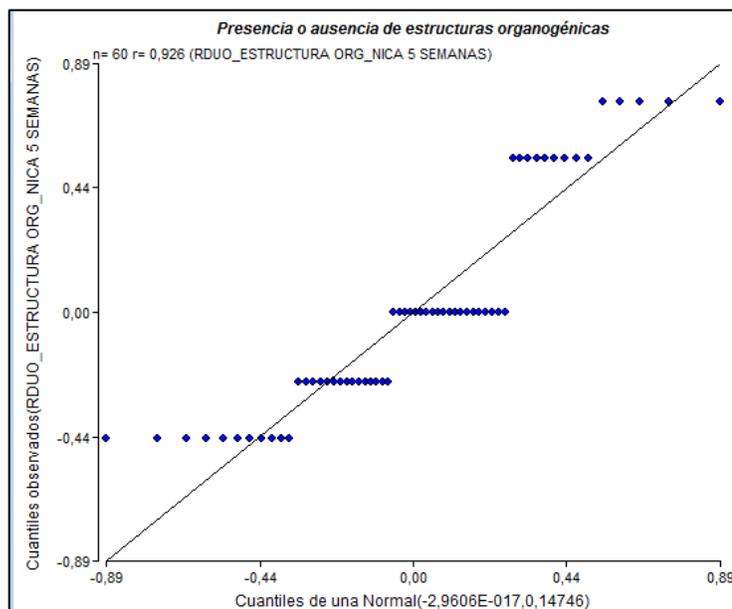


Figura 24. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de estructuras organogénicas en los explantes luego de 5 semanas en la fase de inducción a brote.

Como se exhibe en la Figura 24, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 7.

Cuadro 7

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable presencia de estructuras organogénicas.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO ESTRUCTURA ORG NICA 5..	60	0,00	0,38	0,82	<0,0001

En el Cuadro 7, se puede observar que el valor de p ($<0,0001$) es menor que $0,05$, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con un análisis de varianza no paramétrica con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 8.

Cuadro 8

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable presencia de estructuras organogénicas.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 5 ..	AC	20	0,00	0,00	0,00	6,00	0,0037
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 5 ..	AT1	20	0,45	0,51	0,00		
ESTRUCTURA ORGANOGÉNICA 5 ..	AT2	20	0,25	0,44	0,00		
Trat. Ranks							
AC	23,50	A					
AT2	31,00	A B					
AT1	37,00	B					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)							

En el Cuadro 8 se puede ver que el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (0,45) y una desviación estándar de 0,51; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de estructuras organogénicas en los explantes. Seguido por el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) que presentó una media de 0,25 y una desviación estándar de 0,44. Mientras que el tratamiento “AC” (control) obtuvo un valor de media y desviación estándar de 0,00 lo que sugiere que los explantes en este medio no desarrollan estructuras organogénicas.

Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A se encuentran los tratamientos “AC” y “AT₂” con un puntaje de 23,50 y 31,00 (puntajes menores) lo cual sugiere que en dichos tratamientos existe menor o nulo desarrollo de estructuras organogénicas. Mientras que en el grupo B se encuentran los tratamientos “AT₂” y “AT₁”

con un puntaje de 31,00 y 37,00; lo que sugiere que ambos tratamientos inducen a la formación de estructuras organogénicas, siendo el tratamiento “AT₁” el que presente el mejor puntaje luego de 5 semanas de evaluación en los explantes de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] en la fase de inducción a brotes.

3.1.3 Número de estructuras organogénicas

3.1.3.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 3 tratamientos (Tabla 5) para la inducción a brote a partir de explantes de hoja de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 10) en base a los resultados registrados en el Anexo A1.

Tabla 10
Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de estructuras organogénicas en la fase de inducción a brotes.

Tratamiento	Número de estructuras organogénicas 2 semanas	Número de estructuras organogénicas 5 semanas
AC	0	0
AT ₁	31	55
AT ₂	14	31

En la Figura 25 se puede observar que el tratamiento “AT₁” presentó mayor número de estructuras organogénicas (55) a las 5 semanas, el tratamiento “AT₂” presentó

31, mientras que ningún explante en el tratamiento “AC” o control presentó estructuras organogénicas.

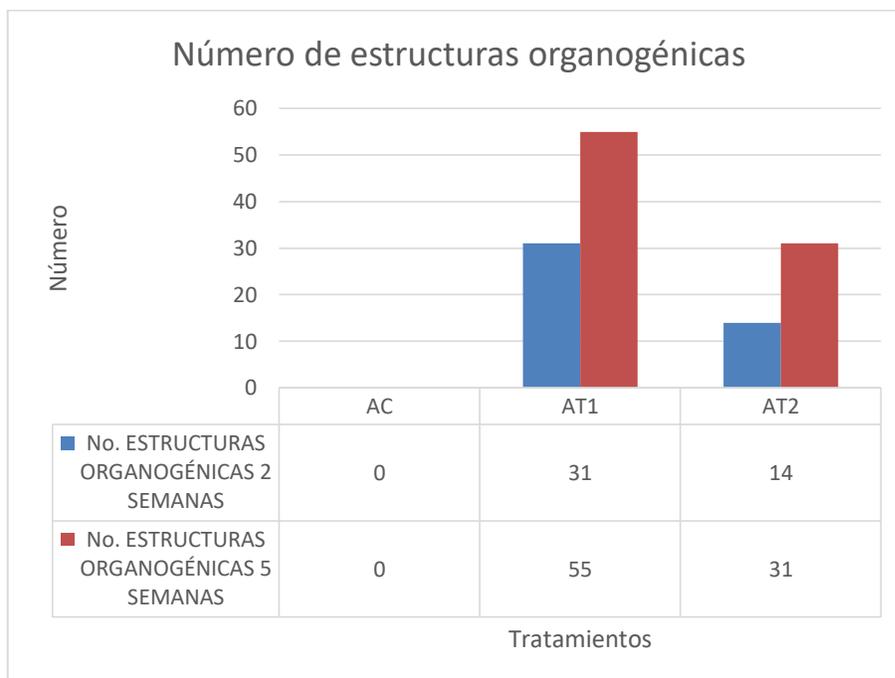


Figura 25. Número de estructuras organogénicas presentes en cada uno de los tratamientos a las 2 y 5 semanas en la fase de inducción a brotes utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT₁” (5 mg/L de TDZ) y “AT₂” (7 mg/L de TDZ).

3.1.3.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 2 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B3). Al ser el valor de $p=0,0018$ en el análisis de varianza (Anexo B3), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser

menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos. Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 26.

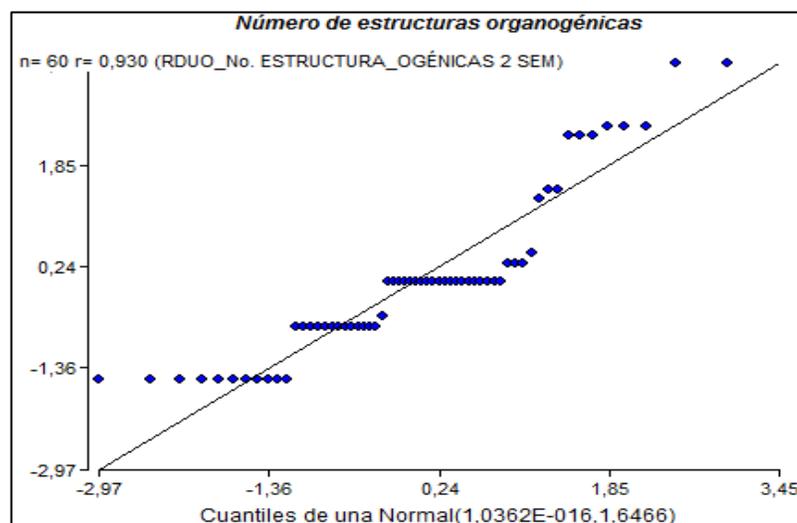


Figura 26. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de estructuras organogénicas en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 26, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 9.

Cuadro 9.

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de estructuras organogénicas.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO No. ESTRUCTURA OGÉNIC..	60	0,00	1,28	0,84	<0,0001

En el Cuadro 9, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto los datos se evaluaron con análisis de la varianza no paramétrica mediante la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 10.

Cuadro 10

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de estructuras organogénicas.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AC	20	0,00	0,00	0,00	7,10	0,0028
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AT1	20	1,55	1,96	0,00		
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AT2	20	0,70	1,13	0,00		
<hr/>							
Trat. Ranks							
AC	22,50	A					
AT2	32,03	A B					
AT1	36,98	B					
<hr/>							
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)							

En el Cuadro 10 se puede ver que a las 2 semanas el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (1,55) y una desviación estándar de 1,96; indicando que es el tratamiento que presenta el mayor número de estructuras organogénicas en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,70) y una desviación estándar de 1,13. Mientras que el tratamiento “AC” (control) presentó una media y una desviación estándar de 0,00; lo que sugiere que los explantes en este medio no producen estructuras organogénicas.

Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes a las 2 semanas de evaluación.

Por otro lado, con respecto a los datos obtenidos a las 5 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en el número de estructuras organogénicas (Anexo B3).

Al ser el valor de $p=0,0023$ en el análisis de varianza (Anexo B3), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 27.

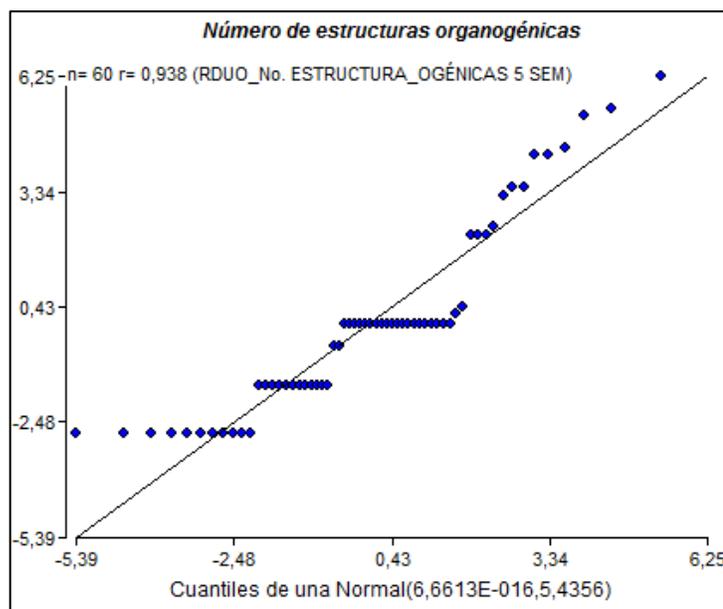


Figura 27. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de estructuras organogénicas en los explantes luego de 5 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 27, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 11.

Cuadro 11

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable número de estructuras organogénicas.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO No. ESTRUCTURA OGÉNIC..	60	0,00	2,33	0,86	<0,0001

En el Cuadro 11, se puede observar que el valor de p (<0,0001) es menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 12.

Cuadro 12.

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 5 semanas en la variable número de estructuras organogénicas.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AC	20	0,00	0,00	0,00	7,50	0,0026
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AT1	20	2,75	3,34	0,00		
No. ESTRUCTURAS ORGANOGÉNI..	AT2	20	1,55	2,39	0,00		
Trat. Ranks							
AC	22,00	A					
AT2	33,03	B					
AT1	36,48	B					
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</i>							

En el Cuadro 12 se puede ver que el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (2,75) y una desviación estándar de 3,34; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de estructuras organogénicas en los explantes. Seguido por el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) que presentó una media de 1,55 y una desviación estándar de 2,39. Mientras que el tratamiento “AC” (control) obtuvo un valor de media y desviación estándar de 0,00 lo que sugiere que los explantes en este medio no producen estructuras organogénicas. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B, los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A se encuentra el tratamiento “AC” con un puntaje de 22,00, mientras que en el grupo B se encuentran el tratamiento “AT₂” con un puntaje de 33,03 y el tratamiento “AT₁” con un puntaje de 36,48; los cuales no son estadísticamente diferentes sin embargo el último presenta el mejor puntaje.

3.1.4 Número de brotes

3.1.4.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 3 tratamientos (ver Tabla 5) para la inducción a brotes a partir de explantes de hoja de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 11) en base a los resultados registrados en el Anexo A1, donde se puede observar que el tratamiento “AT₁” presentó mayor número de brotes (137) a las 6 semanas, el tratamiento “AT₂” presentó 40 brotes en todos sus explantes, mientras que ningún explante en el tratamiento “AC” o control presentó brotes.

Tabla 11

Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de brotes en la fase de inducción a brotes.

Tratamiento	Número de brotes	Número de brotes 6
	3 semanas	semanas
AC	0	0
AT₁	57	137
AT₂	20	40

En la Figura 28 se puede observar que el número de brotes aumenta con forme transcurre el tiempo en los tratamientos “AT₁” y “AT₂”, siendo el primer tratamiento mencionado el que presenta mayor número de brotes (137) a las 2 semanas, mientras que el segundo presenta menor número de brotes (40) y en el caso del tratamiento “AC” no se presentan brotes.

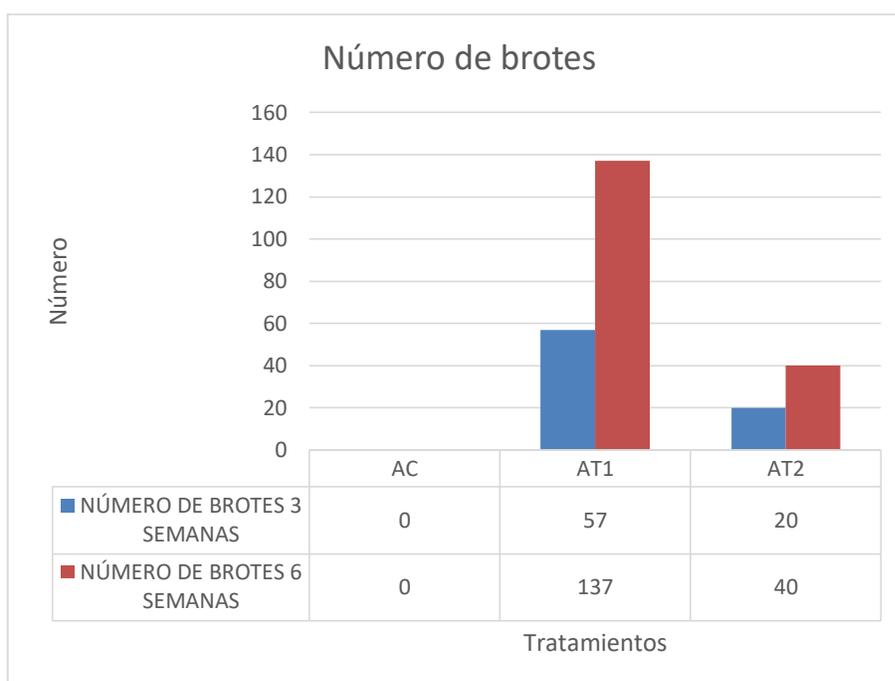


Figura 28. Número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos a las 3 y 6 semanas en la fase de inducción a brotes, utilizando los tratamientos “AC” (Control, 0 mg/L de TDZ), “AT₁” (5 mg/L de TDZ) y “AT₂” (7 mg/L de TDZ).

3.1.4.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 3 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B4).

Al ser el valor de $p=0,0003$ en el análisis de varianza (Anexo B4), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 29.

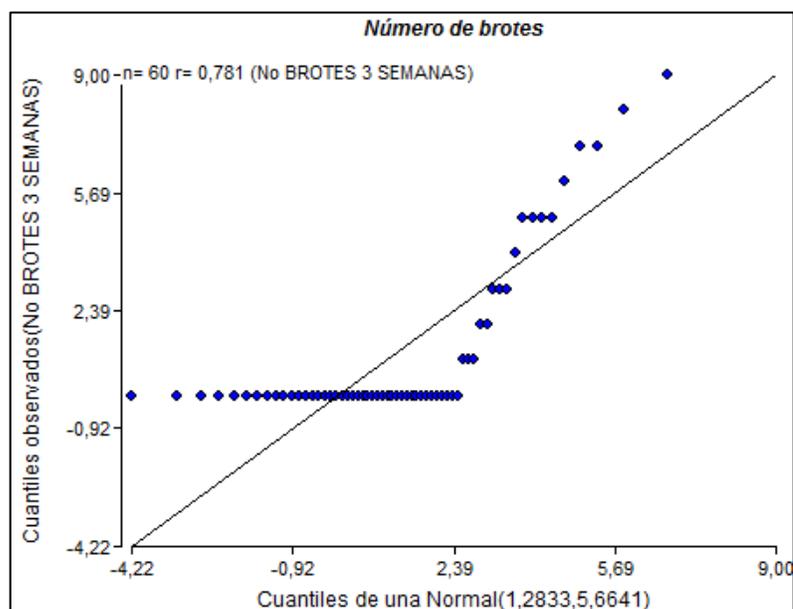


Figura 29. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 3 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 29, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 13.

Cuadro 13

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 3 semanas para la variable número de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO No BROTES 3 SEMANAS	60	0,00	2,06	0,89	<0,0001

En el Cuadro 13, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. A continuación, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 14.

Cuadro 14

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 3 semanas para la variable número de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
No BROTES 3 SEMANAS	AC	20	0,00	0,00	0,00	8,50	0,0015
No BROTES 3 SEMANAS	AT1	20	2,85	3,38	0,00		
No BROTES 3 SEMANAS	AT2	20	1,00	1,34	0,00		
<hr/>							
Trat. Ranks							
AC	21,50	A					
AT2	32,98	B					
AT1	37,03	B					
<hr/>							
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)							

En el Cuadro 14 se puede ver que a las 3 semanas el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (2,85) y una desviación estándar de 3,38; indicando que es el tratamiento que presenta el mayor número de brotes en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (1,00) y una desviación estándar de 1,34. Mientras que el tratamiento “AC” (control) presentó una media y una desviación estándar de 0,00; lo que sugiere que los explantes en este medio no producen brotes. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes a las 3 semanas de evaluación.

Por otro lado, con respecto a los datos obtenidos a las 6 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en el número de brotes (Anexo B4).

Al ser el valor de $p=0,0001$ en el análisis de varianza (Anexo B4), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 30.

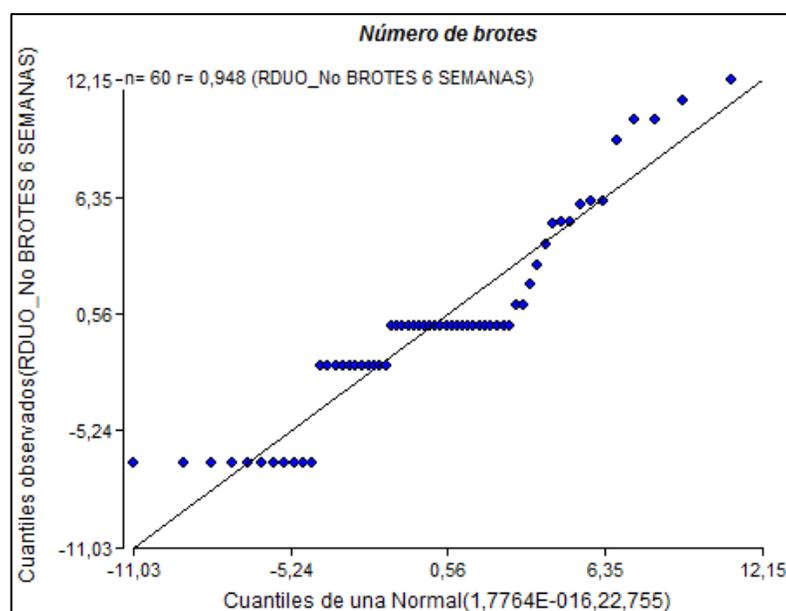


Figura 30. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 6 semanas en la fase de inducción a brotes.

Como se exhibe en la Figura 30, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 15.

Cuadro 15
Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable número de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	
RDUO No BROTES 6 SEMANAS	60	0,00	4,77	0,88	<0,0001	

En el Cuadro 15, se puede observar que el valor de p (<0,0001) es menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 16.

Cuadro 16.
Prueba de realizada para analizar los resultados obtenidos a las 6 semanas en la variable número de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
No BROTES 6 SEMANAS	AC	20	0,00	0,00	0,00	8,50	0,0015
No BROTES 6 SEMANAS	AT1	20	6,85	7,97	0,00		
No BROTES 6 SEMANAS	AT2	20	2,00	2,68	0,00		
Trat. Ranks							
AC		21,50	A				
AT2		32,98	B				
AT1		37,03	B				
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)							

En el Cuadro 16 se puede ver que el tratamiento “AT₁” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (6,85) y una desviación estándar de 7,97; lo que sugiere que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de brotes en los explantes. Seguido por el tratamiento “AT₂” (7 mg/L de TDZ) que presentó una media de 2,00 y una desviación estándar de 2,68. Mientras que el tratamiento “AC” (control) obtuvo un valor de media y desviación estándar de 0,00 lo que sugiere que los explantes en este medio no producen brotes. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A se encuentra el tratamiento “AC” con un puntaje de 21,50; mientras que en el grupo B se encuentran el tratamiento “AT₂” con un puntaje de 32,98 y el tratamiento “AT₁” con un puntaje de 37,03; siendo el último mencionado el que presenta mejor puntaje en la fase de inducción a brotes.

3.2 Multiplicación de brotes

Una vez obtenidas los brotes de segmento de hoja de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] se dio inicio a la etapa de multiplicación, donde el explante fue introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia total, en una cámara de flujo. Para luego ser sometidos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30°C y una humedad ambiental de 25%. Se evaluaron dos variables de respuesta: presencia de callo y número de brotes (Figura 31); cuyos resultados se registraron en el Anexo A3.

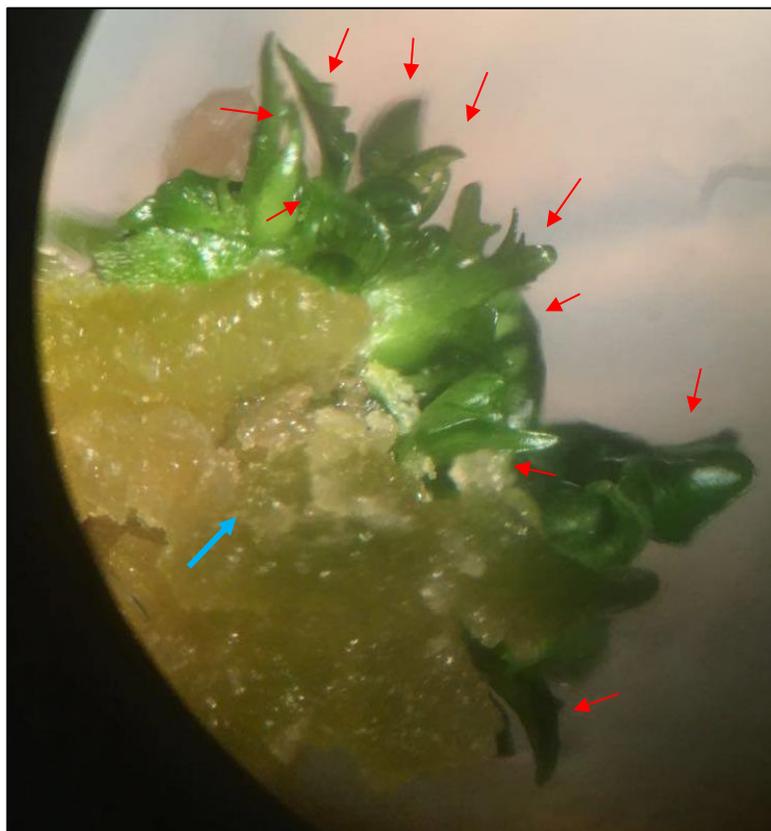


Figura 31. Explante con brote (flechas rojo) y callo (flecha celeste) observado en el estéreo microscopio (38x).

3.2.1 Presencia de callo

3.2.1.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 4 tratamientos (ver Tabla 5) para la multiplicación de brotes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 12) en base a los resultados registrados en el Anexo A3, donde se puede observar que los tratamientos “BT₃” y “BT₂” presentaron menor número de explantes (8) con presencia de callo a las 4 semanas,

mientras que en el tratamiento “BT₁” se obtuvo 15 explantes y en el tratamiento “BC” o control se obtuvo 17 explantes que presentaron callo.

Tabla 12. Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.

Tratamiento	Presencia de callo 2 semanas	Ausencia de callo 2 semanas	Presencia de callo 4 semanas	Ausencia de callo 4 semanas
BC	14	6	17	3
BT ₁	8	12	15	5
BT ₂	3	17	8	12
BT ₃	2	18	8	12

Para analizar la diferencia que existe entre los tratamientos utilizados en este ensayo se elaboró una gráfica de frecuencia como aprecia en la Figura 32, donde se observa que los tratamientos “BT₂” y “BT₃” exhibieron la menor presencia de callo con una frecuencia de 40%.

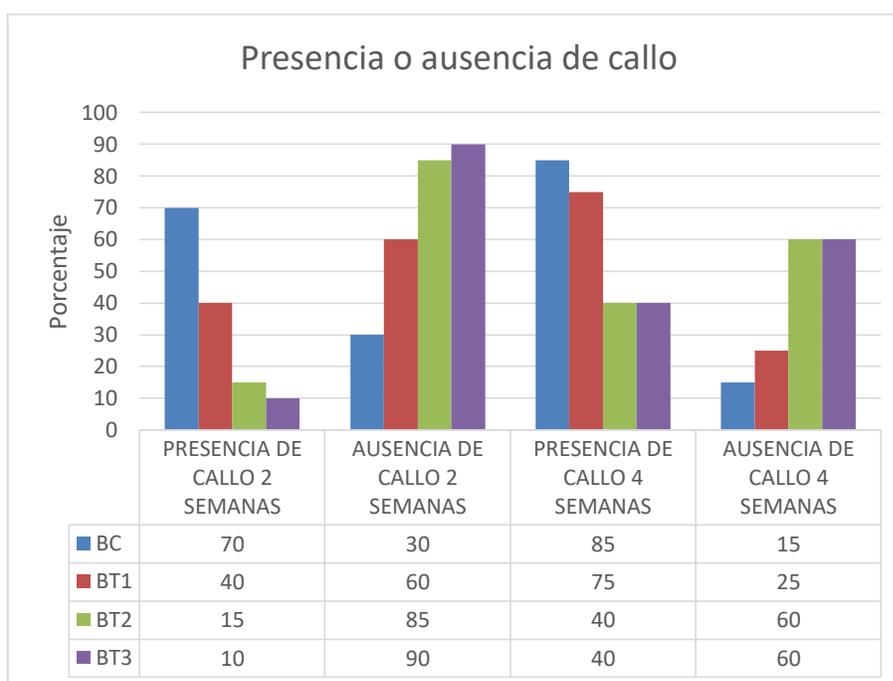


Figura 32. Porcentaje de explantes a las 2 y 4 semanas que muestran presencia y ausencia de callo en la fase de multiplicación.

3.2.1.1 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 2 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B5).

Al ser el valor de $p=0,0001$ en el análisis de varianza (Anexo B5), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 33.

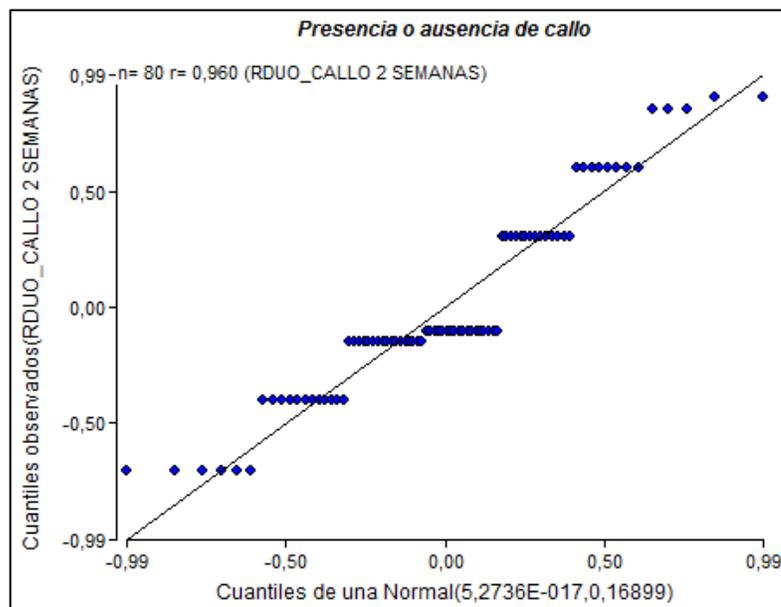


Figura 33. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 2 semanas en la fase de inducción a brote.

Como se exhibe en la Figura 33, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 17.

Cuadro 17

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO CALLO 2 SEMANAS	80	0,00	0,41	0,89	<0,0001

En el Cuadro 17, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 18.

Cuadro 18

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos en la variable presencia de callo en la fase de multiplicación de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CALLO 2 SEMANAS	BC	20	0,70	0,47	1,00	13,44	0,0002
CALLO 2 SEMANAS	BT1	20	0,40	0,50	0,00		
CALLO 2 SEMANAS	BT2	20	0,15	0,37	0,00		
CALLO 2 SEMANAS	BT3	20	0,10	0,31	0,00		

Trat. Ranks		
BT3	31,00	A
BT2	33,00	A
BT1	43,00	A B
BC	55,00	B

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

En el Cuadro 18 se puede ver que el tratamiento “BC” (Control) posee el valor más alto de las medias (0,70) y una desviación estándar de 0,47; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de callo en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “BT₁” (3 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,40) y una desviación estándar de 0,50. Por otro lado el tratamiento “BT₂” (5 mg/L de TDZ) presentó una media de 0,15 y una desviación estándar de 0,37. Mientras que el tratamiento “BT₃” (7 mg/L de TDZ) presentó una media de 0,10 y una desviación estándar de 0,31. A causa de esto, se presentan rangos en los cuales se agrupa a los tratamientos en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes.

Con respecto a los datos obtenidos a las 4 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la presencia de callo (Anexo B5).

Al ser el valor de $p=0,0024$ en el análisis de varianza (Anexo B5), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 34.

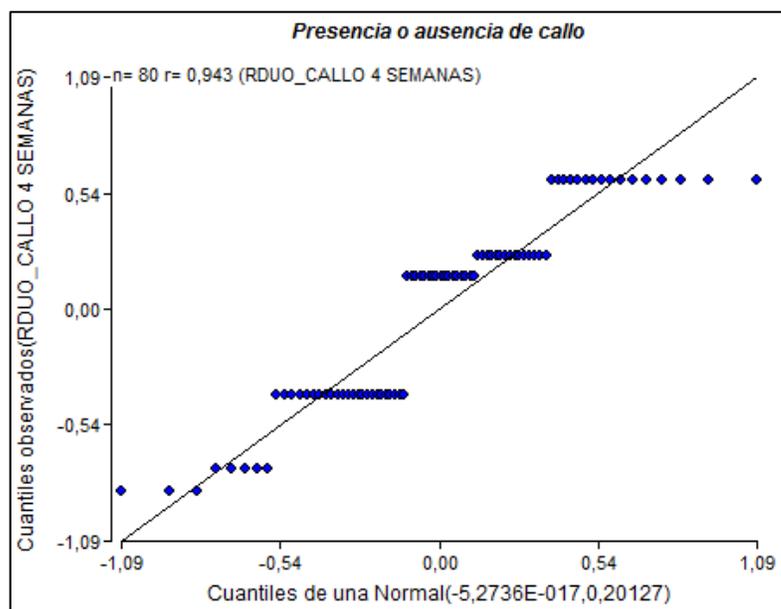


Figura 34. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable presencia de callo en los explantes luego de 4 semanas en la fase de multiplicación de brotes.

Como se exhibe en la Figura 34, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 19.

Cuadro 19

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable presencia de callo.

Shapiro-Wilks (modificado)						
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	
RDUO CALLO 4 SEMANAS	80	0,00	0,45	0,85	<0,0001	

En el Cuadro 19, se puede observar que el valor de p ($<0,0001$) es menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Debido a esto, los datos se evaluaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 20.

Cuadro

20

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable presencia de callo.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CALLO 4 SEMANAS	BC	20	0,85	0,37	1,00	9,78	0,0035
CALLO 4 SEMANAS	BT1	20	0,75	0,44	1,00		
CALLO 4 SEMANAS	BT2	20	0,40	0,50	0,00		
CALLO 4 SEMANAS	BT3	20	0,40	0,50	0,00		

Trat.	Ranks	
BT3	32,50	A
BT2	32,50	A
BT1	46,50	A B
BC	50,50	B

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

En el Cuadro 20 se puede ver que el tratamiento “AC” (Control) posee el valor más alto de las medias (0,85) y una desviación estándar de 0,37; lo que sugiere que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de callo en los explantes. Seguido por el tratamiento “BT₁” (3 mg/L de TDZ) que presentó una media de 0,75 y una desviación estándar de 0,44. Mientras que el tratamiento “BT₂” (5 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,40) y una desviación estándar de 0,50. Además el tratamiento “BT₃” (7 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media (0,40) y una desviación estándar de 0,50. Por lo antes mencionado, se agrupa a los tratamientos en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A: los tratamientos “BT₃” y “BT₂” presentaron un puntaje inferior de 32,50; en el grupo A y B: el tratamiento “BT₁” un puntaje de 46,50 y en el grupo B: el tratamiento “BC” un puntaje alto de 50,50 por lo que este podría inducir a la mayor formación de callo en los explantes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] en la fase de multiplicación de brotes.

3.2.2 Número de brotes

3.2.2.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 4 tratamientos (ver Tabla 5) para la multiplicación de brotes obtenidos a partir de segmentos proximales de hojas de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se realizó una tabla de contingencia (Tabla 13) en base a los resultados registrados en el Anexo A2., donde se puede observar que el tratamiento “BT₂” presentó mayor número de brotes (113) a las 4 semanas, el tratamiento “BT₃” presentó 70 brotes en todos sus explantes, el tratamiento

“BT₁” presentó mayor número de brotes (65) mientras en el tratamiento “BC” o control se presentó 21 brotes.

Tabla 13

Tabla de contingencia para los datos obtenidos para la variable número de brotes en la fase de multiplicación de brotes.

Tratamiento	Número de brotes 2 semanas	Número de brotes 4 semanas
BC	17	21
BT ₁	33	65
BT ₂	56	113
BT ₃	26	70

En la Figura 35 se puede observar que el número de brotes aumenta con forme transcurre el tiempo en todos los tratamientos, siendo el tratamiento “BT₂” el que presenta mayor número de brotes (113) a las 4 semanas, el tratamiento “BT₃” presentó 70 brotes, el tratamiento “BT₁” presentó 65 brotes, mientras que el tratamiento “BC” presentó 21 brotes.

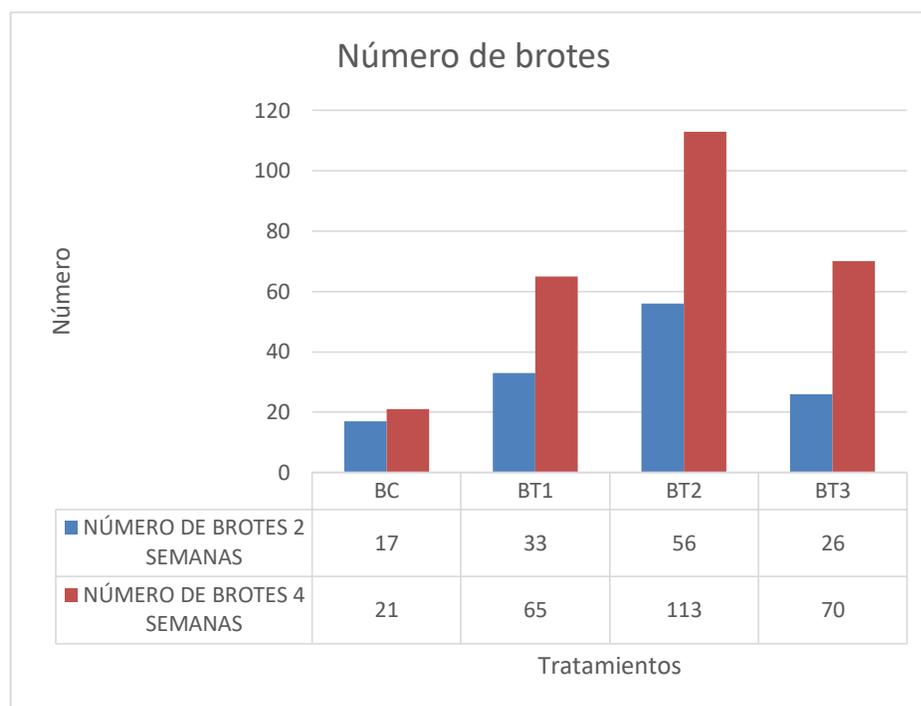


Figura 35. Número de brotes presentes en cada uno de los tratamientos a las 2 y 4 semanas en la fase de multiplicación de brotes.

3.2.2.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 2 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en el medio de multiplicación de brotes (Anexo B6).

Al ser el valor de $p=0,0019$ en el análisis de varianza (Anexo B6), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 36.

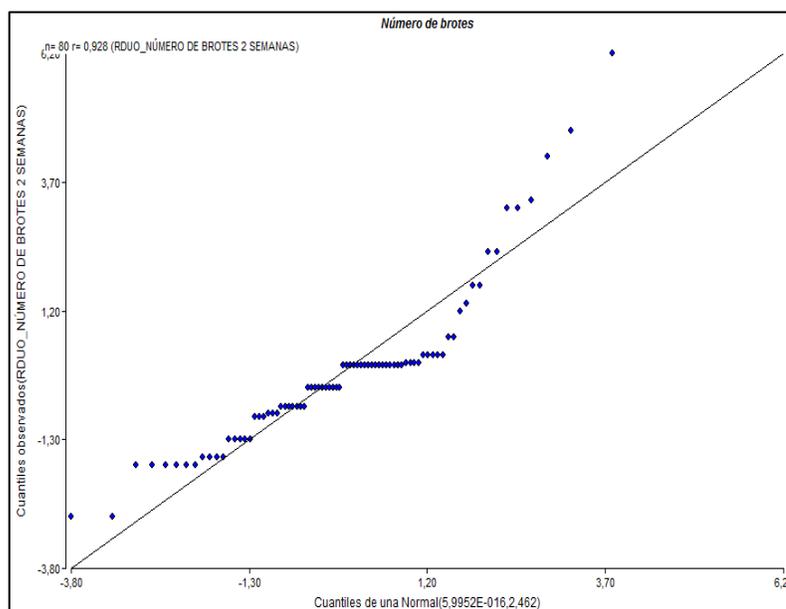


Figura 36. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 2 semanas en la fase de multiplicación de brotes.

Como se exhibe en la Figura 36, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 21.

Cuadro 21

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO NÚMERO DE BROTES 2 SE..	80	0,00	1,57	0,87	<0,0001

En el Cuadro 21, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir, menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos, por lo cual se puede aplicar el análisis de la varianza no paramétrica mediante la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 22.

Cuadro 22

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable número de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NÚMERO DE BROTES 2 SEMANAS..	BC	20	0,85	0,37	1,00	10,52	0,0070
NÚMERO DE BROTES 2 SEMANAS..	BT1	20	1,65	1,42	1,00		
NÚMERO DE BROTES 2 SEMANAS..	BT2	20	2,80	2,46	2,00		
NÚMERO DE BROTES 2 SEMANAS..	BT3	20	1,30	1,42	1,00		
<hr/>							
Trat. Ranks							
BC	30,45	A					
BT3	35,73	A					
BT1	42,90	A B					
BT2	52,93	B					
<hr/>							
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)							

En el Cuadro 22, se puede ver que a las 2 semanas el tratamiento “BT₂” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (2,80) y una desviación estándar de 2,46; indicando que es el tratamiento que presenta el mayor número de brotes en los explantes. Por otro lado, el tratamiento “BT₁” (3 mg/L de TDZ) obtuvo un valor menor de media de 1,65 y una desviación estándar de 1,42. Además el tratamiento “BT₃” presentó un valor de media de 1,30 y una desviación estándar de 1,42. Mientras que el tratamiento “BC” (control) presentó una media de 0,85 y una desviación estándar de 0,37. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en dos grupos: A y B; los cuales son estadísticamente diferentes a las 2 semanas de evaluación.

Adicionalmente, con respecto a los datos obtenidos a las 4 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en el número de brotes (Anexo B6).

Al ser el valor de $p=0,0001$ en el análisis de varianza (Anexo B6), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Para determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 37.

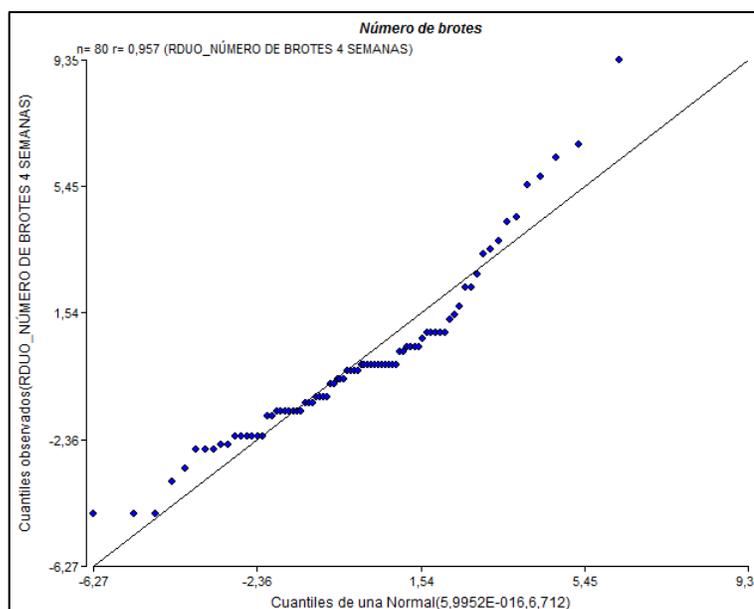


Figura 37. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable número de brotes en los explantes luego de 4 semanas en la fase de multiplicación.

Como se exhibe en la Figura 37, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 23.

Cuadro 23

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable número de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO NÚMERO DE BROTES 4 SE..	80	0,00	2,59	0,92	<0,0001

En el Cuadro 23, se puede observar que el valor de p (<0,0001) es menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos, por ello se puede realizar un análisis de la varianza no paramétrico usando la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 24.

Cuadro 24

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 4 semanas en la variable número de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NÚMERO DE BROTES 4 SEMANAS..	BC	20	1,05	0,69	1,00	28,50	<0,0001
NÚMERO DE BROTES 4 SEMANAS..	BT1	20	3,25	2,81	2,50		
NÚMERO DE BROTES 4 SEMANAS..	BT2	20	5,65	3,82	5,00		
NÚMERO DE BROTES 4 SEMANAS..	BT3	20	3,50	2,24	3,00		
Trat. Ranks							
BC	18,55	A					
BT1	40,48	B					
BT3	46,68	B C					
BT2	56,30	C					
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)							

En el Cuadro 24 se puede ver que el tratamiento “BT₂” (5 mg/L de TDZ) posee el valor más alto de las medias (5,65) y una desviación estándar de 3,82; indicando que es el tratamiento que presenta la mayor cantidad de brotes en los explantes. Seguido por el tratamiento “BT₃” (7 mg/L de TDZ) que presentó una media de 3,50 y una desviación estándar de 2,24. Adicionalmente, el tratamiento “BT₁” (3 mg/L de TDZ) presentó una media de 3,25 y una desviación estándar de 2,81. Mientras que el tratamiento “BC” (control) obtuvo un valor de media de 1,05 y desviación estándar de 0,69. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en tres grupos: A, B y C, los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A se encuentra el tratamiento “AC” con un puntaje de 18,55; en el grupo B se encuentran los tratamientos “BT₁” con un puntaje de 40,48 y el tratamiento “BT₃” con un puntaje de 46,68; mientras que en el grupo C se encuentran los tratamientos “BT₃” y el tratamiento “BT₂” con un puntaje de 56,03 lo que sugiere que en estos tratamientos los explantes generan mayor cantidad de brotes a las 4 semanas de evaluación en los explantes de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] en la fase de multiplicación de brotes.

3.3 Elongación de brotes

Luego de la multiplicación de los brotes se procedió con la fase de elongación de los mismos, donde el explante fue introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia total, en una cámara de flujo. Para luego ser almacenado y posteriormente sometidos a un fotoperiodo de 16 horas con luz fluorescente con una intensidad aproximada de 3000 luxes, una temperatura media de 30°C y una humedad ambiental de 25%. La variable de respuesta evaluada fue la elongación de los brotes (Figura 38); cuyos resultados se presentan en el Anexo A3.

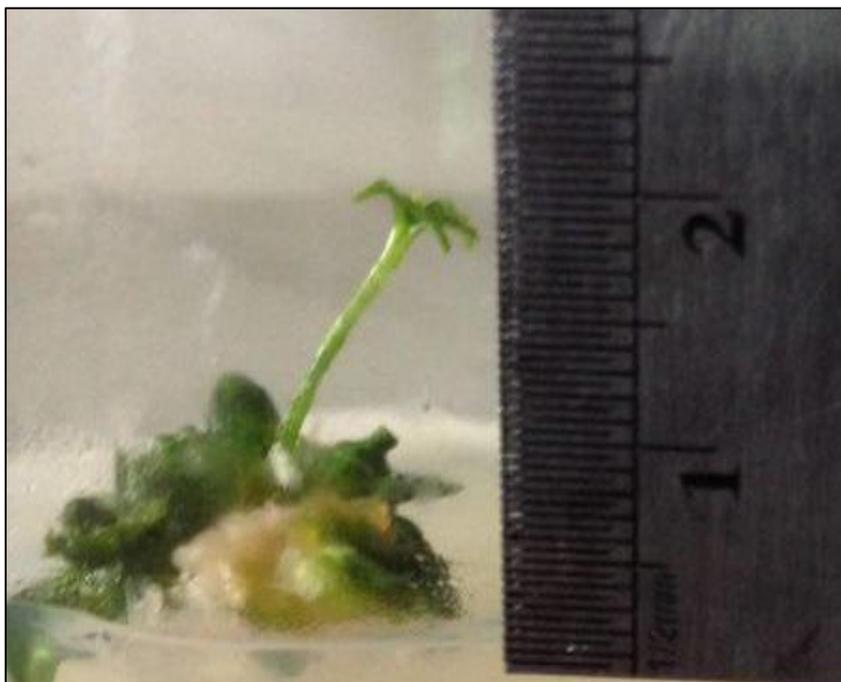


Figura 38. Medición de la longitud de los brotes (cm.).

3.3.1 Elongación de brotes

3.3.1.1 Análisis exploratorio de datos

Para esta etapa se evaluó 6 tratamientos (ver Tabla 6) para la elongación de brotes a partir de segmentos de hoja de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo]. Para el análisis de los resultados se elaboró la tabla de contingencia (Tabla 14) y un gráfico de frecuencia de longitudes pertenecientes a cada nivel con respecto a los tratamientos.

Tabla 14

Tabla de contingencia para los resultados obtenidos en la variable “longitud de brotes” clasificados por niveles.

Tratamiento	Longitud				
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
CC	10	10	0	0	0
CT ₁	10	7	3	0	0
CT ₂	12	6	2	0	0
CT ₃	13	2	4	1	0
CT ₄	10	5	2	3	0
CT ₅	10	6	2	0	2

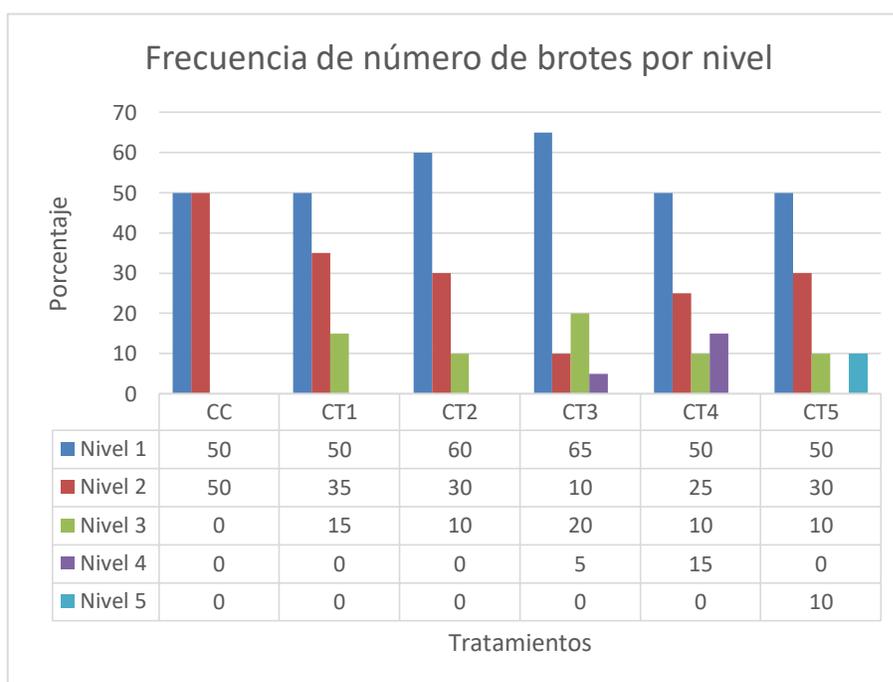


Figura 39. Frecuencia presente de longitudes pertenecientes a cada nivel, con respecto la concentración de GA₃

En la Figura 39 se puede observar que en el tratamiento “CC” el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1 y el 50% restante pertenecen al nivel 2. En el caso del tratamiento “CT₁”, el 50% de los brotes perteneció al nivel 1, un 35% perteneció al nivel 2 y el 15% restante perteneció al nivel 3. Para el tratamiento “CT₂”, el 60% de los brotes perteneció al nivel 1, el 30% de los brotes perteneció al nivel 2, y el 10% restante perteneció al nivel 3. Por otro lado, el tratamiento “CT₃” presentó un 65% de brotes perteneciente al nivel 1, un 10% perteneciente al nivel 2, un 20% perteneciente al nivel 3 y un 5% perteneciente al nivel 4. Además en el caso del tratamiento “CT₄”, el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 25% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 15% restante pertenecen al nivel 4. Mientras que en el caso del tratamiento “CT₅”, el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 30% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 10% restante pertenecen al nivel 5.

3.3.1.2 Análisis inferencial

Con los resultados obtenidos a las 2 semanas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe o no diferencias significativas entre los tratamientos empleados en la elongación de los brotes (Anexo B7).

Al ser el valor de $p=0,0031$ en el análisis de varianza (Anexo B7), los tratamientos presentan diferencias significativas, por ser menor que el nivel de significancia nominal ($\alpha=0,05$), con lo que se rechaza la igualdad de medias en los tratamientos.

Con el fin de determinar si los datos siguen una distribución normal, se realizó la gráfica de Q-Q plot, presentada en la Figura 40.

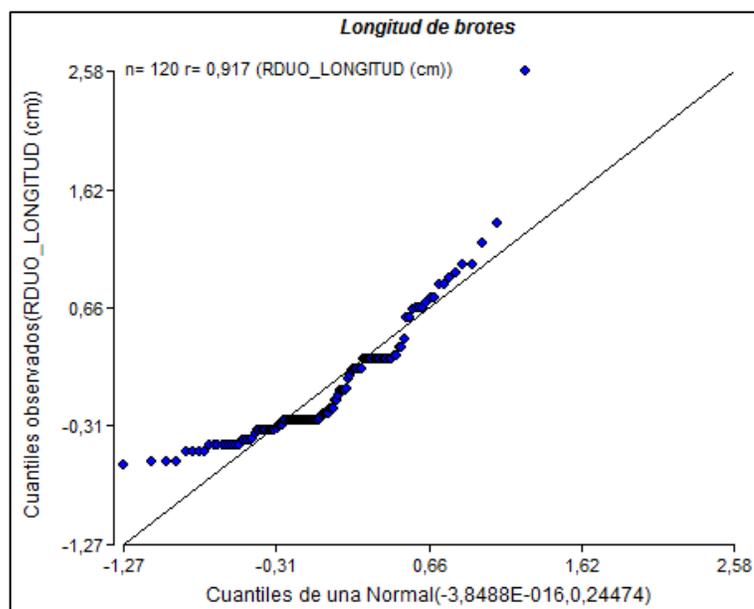


Figura 40. Gráfica Q-Q plot de los residuos de la variable longitud de brotes en los explantes luego de 2 semanas en la fase de elongación de brotes.

Como se exhibe en la Figura 40, los datos no siguen una distribución normal, por se lo comprobó realizando una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado, presente en el Cuadro 25.

Cuadro 25

Prueba de Shapiro-Wilks realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable longitud de brotes.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO LONGITUD (cm)	120	0,00	0,49	0,85	<0,0001

En el Cuadro 25, se puede observar que el valor de $p < 0,0001$, es decir menor que 0,05, por que se establece que dichos datos no son paramétricos. Por ello los datos serán evaluados con un análisis de la varianza no paramétrica, mediante la prueba estadística Kruskal Wallis, presente en el Cuadro 26.

Cuadro 26

Prueba de Kruskal Wallis realizada para analizar los resultados obtenidos a las 2 semanas para la variable longitud de brotes.

Prueba de Kruskal Wallis						
Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H p
LONGITUD (cm)	CC	20	0,36	0,26	0,40	10,73 0,0470
LONGITUD (cm)	CT1	20	0,44	0,37	0,40	
LONGITUD (cm)	CT2	20	0,36	0,34	0,15	
LONGITUD (cm)	CT3	20	0,56	0,60	0,25	
LONGITUD (cm)	CT4	20	0,70	0,52	0,50	
LONGITUD (cm)	CT5	20	0,92	0,76	0,65	

Trat. Ranks	
CT2	48,50 A
CC	51,10 A B
CT1	55,95 A B
CT3	56,98 A B
CT4	71,30 B C
CT5	82,15 C

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

En el Cuadro 26 se puede ver que el tratamiento “CT₅” (4 mg/L de GA₃) presentó el valor más alto de las medias (0,92) y una desviación estándar de 0,76. El tratamiento “CT₄” (3 mg/L de GA₃) presentó un valor de media de 0,70 y una desviación estándar de 0,52. Adicionalmente, el tratamiento “CT₃” (2 mg/L de GA₃) presentó un valor de media de 0,56 y una desviación estándar de 0,60. Además el tratamiento “CT₁” (1 mg/L de GA₃) presentó un valor de media de 0,44 y una desviación estándar de 0,37. Por otro lado, el

tratamiento “CT₂” (1 mg/L de GA₃) presentó un valor de media de 0,36 y una desviación estándar de 0,34. Mientras que el tratamiento “CC” (control) presentó una media de 0,36 y una desviación estándar de 0,26. Considerando lo antes mencionado los tratamientos se han agrupado en tres grupos: A, B y C, los cuales son estadísticamente diferentes. En el grupo A, se encuentra En el grupo A se encuentran los tratamientos: “CT₂”, “CC”, “CT₁” y “CT₃”, donde el tratamiento “CT₂” presenta un puntaje de 48,50; “CC” un puntaje de 51,10; “CT₁” un puntaje de 55,95 y “CT₃” con un puntaje de 56,98. En el grupo B se encuentran los tratamientos: “CC”, “CT₁” “CT₃”y “CT₄”, donde el tratamiento “CT₄” presentó un puntaje de 71,30. Mientras que en el grupo C se encuentras los tratamientos “CT₄” y “CT₅”; el último con un puntaje de 82,15; lo que sugiere que en este tratamiento existe un mayor número de explantes que desarrollan mayor.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento del cultivo *in vitro*

La importancia del uso de técnicas de cultivo *in vitro* como método de conservación y preservación de especies de plantas ha tomado fuerza debido a que mediante dicha técnica se puede realizar una rápida multiplicación clonal de variedades seleccionadas y desarrollar plántulas completas a partir de una planta madre mediante la totipotencia de las células de las plantas. Diferentes potencialidades biotecnológicas han sido exploradas dentro de ellas se encuentra el cultivo de tejidos, ésta técnica ha llegado a ser una valiosa ayuda orientada a las actividades económicas (Murashige, 1974).

Dentro de las diversas actividades económicas que se desarrollan en Ecuador, se presentan la agricultura y exportación de productos como los frutales, dentro de estos se presentan diferentes especies pertenecientes a la familia Caricaceae, presentan resistencia a virosis, así como genes de tolerancia para el frío (Jordan *et al.*, 2009). Una de ellos es el babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo], fruto que se destaca debido a sus compuestos enzimáticos que presentan acción proteolítica, siendo así una fuente de germoplasma y potencial genético de interés (Jordán *et al.*, 2009). El babaco es considerado como una buena fuente enzimática debido a que es rica en diferentes enzimas principalmente proteasas, lipasas, peroxidasas y glicosidasas, siendo la extracción y purificación de dichas enzimas una potencial aplicación industrial (Reyes, 2007).

Adicional a ello, Matute & Tirado (2013), en su trabajo de investigación referente al análisis bromatológico de muestras de babaco de la provincia de Bolívar, describen al fruto como dulce-ácido, con un olor prominente dulce y afrutado, de color amarillo pálido mate; con alto contenido de agua (76,46%) y con un valor de fibra de 15,83%, una fuente media de carbohidratos, proteína y algunos minerales como hierro, potasio, calcio, cobre, manganeso y baja presencia de zinc; que industrialmente se pueden exportar por su

tamaño, peso y dimensión. Por lo antes mencionado, este frutal representa un esencial objeto de investigación, motivo por el cual se desarrolló la presente investigación que partió por la selección de la planta donadora de explantes, donde se utilizaron plantas jóvenes de 2 años de edad provenientes de la parroquia de Yaruquí, lo cual concuerda con Jordán & Piwanski (1997) quienes afirma que es recomendable usar plantas de babaco de aproximadamente 2 años almacenadas en un invernadero.

Es importante mencionar que el correcto muestreo de la planta madre es esencial para el éxito de la introducción a cultivo *in vitro* (Abdelnour & Escalant, 1994) y con el fin de reducir los riesgos bióticos y abióticos, las plantas madre se almacenaron en un pequeño invernadero, de esta manera se mantuvieron las condiciones controladas, de acuerdo a Pierik (1990) así se reducen las posibilidades de que se produzca alguna infección y es más fácil de controlar el crecimiento y desarrollo de dicha planta.

Con el fin de prevenir y controlar la posible presencia de cualquier microorganismo se realizó un proceso de pre-tratamiento de desinfección y control fitosanitario una vez por semanas con el uso del producto comercial “Solvendazim” al 0.2% (v/v), cuyo ingrediente activo es Carbendazim (500 g/L)”, pertenece al grupo de benzimidazoles, y es un fungicida orgánico sistémico de efecto preventivo y curativo de amplio espectro que se absorbe a través de las raíces y los tejidos verdes con translocación acropétala (ascendente). Este fungicida es un inhibidor de la síntesis de la beta-tubulina. Actúa sobre la división celular, impidiendo la formación del huso acromático a nivel de la profase y de la culminación de la división celular (mitosis). Inhibe el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el desarrollo del micelio (Solagro, 2006).

La aplicación semanal de 6-BAP en las plantas donadoras de explantes fue necesario debido a que con esto se buscó incrementar la cantidad de yemas o brotes de donde se usó las hojas para la introducción esto es corroborado por Nabors (2005) quien afirma que la aplicación directa de esta citoquinina puede impulsar el crecimiento de las yemas ya que influye en el crecimiento vegetal, controlando la división y diferenciación celular, contrarrestando la dominancia apical y retrasando el envejecimiento de las hojas.

El mecanismo usual de multiplicación a nivel *ex vitro* es mediante el uso de estacas (AAIC, 2003), por eso mediante el uso de hojas, se desarrolló un mecanismo alternativo de obtención de plantas clones libre de virus y bacterias. La selección de la hoja como explante se debió a que presenta la característica de desempeñar funciones esenciales para la planta relacionadas a la nutrición. Según Curtis y sus colaboradores (2008) las hojas son órganos fotosintéticos por excelencia donde se transforma la energía lumínica en energía química. En *Gerbera hybrida* Bol. L., la micropropagación usando yemas axilares ha reportado diferencias clonales significativas durante las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro*; además se han observado fenotipos extremadamente espesos que corresponden a ramificaciones excesivas (malformado) las cuales aumenta con las subcultivos sucesivos, requiriendo una reiniciación frecuente de los cultivos; por lo que la regeneración de los brotes usando la hoja como explante inicial puede representar una alternativa efectiva a los métodos actuales de micropropagación (Reynoird *et al.*, 1993).

Para esta investigación se consideraron las hojas jóvenes pequeñas de color verde de alrededor de 3 centímetros de longitud, se incluyó el pecíolo con una longitud aproximada de entre 2 a 5 centímetros de longitud desde la base de la hoja; con el fin de que al ser un tejido joven se pueda acelerar el proceso de desarrollo; esto es respaldado por Abdelnour & Escalante (1994) quienes mencionan que entre más pequeño sea el explante a introducir a cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar. Adicional a ello, se ha reportado en otros estudios como el realizado por Reynoird y sus colaboradores (1992) en la regeneración de hojas en algunas especies de *Gerbera*, el uso de hojas jóvenes revela una gran habilidad de regeneración de tejido.

Mediante el presente trabajo de investigación se consiguió una elongación de brotes obtenidos a partir de segmentos proximales de hojas de babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo], siguiendo un proceso metódico partiendo desde el proceso de introducción, la inducción a brotes, multiplicación y elongación de los mismos.

4.2 Inducción y multiplicación de brotes

Para la fase de inducción a brotes se basó en la investigación realizada por Jordan & Piwanski (1997), donde de cada hoja se consideró usar aproximadamente 1 cm² incluyendo un segmento de pecíolo, como lo describió anteriormente en la metodología, considerando que se presenta un crecimiento preexistente asociado con el sistema vascular de la planta de babaco por lo que se pueden generar brotes. Según Richard (1939), la hoja posee un hacecillo vascular constituido por el pecíolo, el cual está formado por vasos porosos, según Raven y sus colaboradores (1992) se denominan haces vasculares o nervios los cuales contienen xilema y floema para transportarlo hacia la hoja siendo esencial para el desarrollo y manutención de dicha estructura.

Posterior a la introducción los explantes fueron almacenados en oscuridad a una temperatura aproximada de 19 -23°C durante 3 días, con fin el de promover el proceso de formación de brotes. Una investigación previa realizada por Jordan & Piwanski (1997) destacan la importancia de este período en la oscuridad debido a los procesos fisiológicos que se dan. Dentro de los procesos fisiológicos que se pueden presentar está la fase oscura de la fotosíntesis donde se produce la fijación del dióxido de carbono y su reducción por los protones aportados por el nicotínamida adenín dinucleótido fosfato dihidrogenado (NADPH₂) (Gama, 2004). Por otro lado, según Arrillaga & Merkle (1993) el efecto de la incubación oscura sobre la regeneración directa de brotes en *Robinia pseudoacacia* L., dieron como resultado una alta frecuencia de regeneración del 91,7%.

Dentro de los componentes del medio de inducción a brotes se consideró la caseína hidrolizada (CH) en una concentración de 500 mg/L y sulfato de adenina en una concentración de 80 mg/L lo cual pudo favorecer al desarrollo de los brotes debido a que enriquecen el medio de cultivo, esto es corroborado por Reuveni y sus colaboradores (1989) que destacaron el uso de ambos compuestos para el mejoramiento de la proliferación de babaco. Según Krikorian (1991), la caseína hidrolizada se utiliza en el cultivo *in vitro*, como suplemento para las plantas, con el fin de aumentar el crecimiento

mediante el suministro de una fuentes de nitrógeno reducido; además puede contener concentraciones bajas de algunos aminoácidos como la metionina, triptófano y fenilalanina. Adicional a ello, Cohen & Cooper (1982) sugieren una adición de 500 mg/L de caseína hidrolizada para el cultivo de babaco *in vitro*.

Al inicio de esta fase se observó que al utilizar el fitoregulador TDZ, los tratamientos “AT₁” (5 mg/L) y “AT₂” (7 mg/L) generan la mayor cantidad de estructuras organogénicas (55 y 31 respectivamente) luego de 5 semanas; en la presente investigación las primeras estructuras organogénicas empezaron a formarse a los 25 días en el medio de inducción a brotes. Estudios realizados por Jordan & Piwanski (1997) con concentraciones de 5 mg/L y 7 mg/L presentaron estructuras organogénicas iguales a las obtenidas en este estudio. Además, Jordan (2011) obtuvo resultados similares utilizando explantes de secciones nodales de *Vasconcellea chilensis* ex *Carica chilensis*, lo que se corroboró en la presente investigación.

Por otro lado los tratamientos “AT₁” (5 mg/L de TDZ) y “AT₂” (7 mg/L de TDZ) generan la mayor cantidad de brotes (137 y 40 respectivamente) luego de 6 semanas. Investigaciones previas muestran resultados similares a los obtenidos en esta fase de experimentación, Jordan & Piwanski (1997) con concentraciones de 5 mg/L y 7 mg/L presentaron 38,5% y 61,5% de obtención de brotes, respectivamente, a las 4 semanas.

Con respecto al uso de TDZ en otras especies, un estudio reportado por Raghu y sus colaboradores (2006), donde se ensayó con bencil adenina, quinetina y TDZ (0,272 μ M), únicamente éste último reveló una media de $16,3 \pm 0,9$ en generación de brotes por explante, es decir este reactivo tiene un gran potencial de poder inducir organogénesis directa. Reinoird y sus colaboradores (1992), destacan la capacidad del TDZ en una concentración de 0,5 μ M (suplementado con 10 μ M BA +2.5 μ M NAA) para la generación de brotes a partir de la regeneración de hojas en *G. piloselloides* con un 39,7%. Jordán (2011) evaluó el uso de TDZ, ácido indolacético (AIA) y en presencia de adenina orgánica (hidrolizado enzimático de caseína, sulfato de adenina y cisteína) incluidas en el medio nutritivo “WPM”, donde se obtuvo brotes en forma de agregados

compactos y/o en hileras, sobre la superficie del explante (hoja) de *Vasconcellea chilensis ex Carica chilensis*. Además Varutharaja y sus colaboradores (2014), obtuvieron brotes via organogénesis directa a partir de segmentos de hojas, cultivadas en un medio Murashige y Skoog (MS) que contenía 1 mg/L de TDZ a los 21 días de incubación un número de $23,6 \pm 0,16$ en *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schult. Por otro lado Jordan y sus colaboradores (2009), en un resumen referente a las condiciones inductoras de respuesta morfogénicas y regenerativas en varias Caricáceas mencionan el uso de un medio MS suplementado con TDZ (solo o combinado) con caseína hidrolizada y sulfato de adenina, para la formación de brotes (elementos bulboso) en lámina foliar de *V. heilbornii* nm. *pentagona*.

Una vez establecido el mejor tratamiento para la fase de inducción a brotes se prosiguió con la fase de multiplicación con los tratamientos “BT₂” y “BT₃” con concentraciones de 5 mg/L de TDZ y 7 mg/L de TDZ, respectivamente se obtuvo la mayor cantidad de brotes luego de 4 semanas (113 y 70, respectivamente); como se mencionó anteriormente esto debido al potencial de generación que posee el TDZ. Es importante mencionar que pese a que para la fase de multiplicación se recomienda establecer una relación entre auxinas y citoquinas (Martínez & Agustí, 2006), en esta investigación no se utilizó auxinas, pues según Anis & Ahmand (2016) se ha demostrado que TDZ imita tanto las respuestas de auxina como de citoquinina, por lo que en altas concentraciones puede inducir a la generación de brotes. Según Murthy y sus colaboradores (1998), el TDZ es efectivo solo o en combinación con otros reguladores de crecimiento en la inducción de procesos de regeneración en el cultivo celular vegetal.

Pese a que con el tratamiento “BT₂” (5 mg/L) se alcanzó un gran número de brotes (113) en la fase de multiplicación luego de 4 semanas, éstos presentaron una longitud muy corta por lo que se recurrió al uso de otra fitohormona (GA₃) que se utilizó en la fase de elongación. Esto coincide con lo descrito por Huetteman & Preece (1993), quien afirma que el TDZ en altas concentraciones promueve la formación de brotes pero inhibe y retarda la elongación.

Con respecto a la formación de callo en los tratamientos de inducción a brotes y multiplicación, es importante la remoción del mismo ya que éste era friable y no organogénico, esto es respaldado por Jordán & Piwanski (1997) quienes en su estudio también presentaron formación de callo a partir de los 30-40 días en diferentes partes de los explantes pero este tejido no era organogénico. Además según Huettman & Preece (1993), las altas concentraciones de TDZ favorecen a la formación de callo. En los resultados obtenidos en la fase de inducción a brote el tratamiento “AT₂” (7 mg/L) con mayor concentración de fitohormona presentó mayor frecuencia en la formación de callo, mientras que en la fase de multiplicación los tratamientos “BT₂” (5 mg/L) y “BT₃” (7 mg/L) presentaron mayor frecuencia en la formación de callo; lo cual coincide con lo mencionado anteriormente.

Se han realizado pocas investigaciones utilizando TDZ radiomarcado para caracterizar el destino del TDZ, uno de estos estudios fue realizado por Mork y Mork en 1985 quienes estudiaron el metabolismo de [¹⁴C]-TDZ en callo de *Phaseolus lunatus* y encontraron que el TDZ no fue metabolizado en las primeras 48 horas siendo los metabolitos primarios residuos de glucósido (Murch & Saxena, 2001). Además en la investigación realizada por Murch & Saxena (2001) en explantes de geranio (*Pelargonium × hortorum* Bailey) donde se utilizó dos versiones radiomarcadas de Tiazurón ([¹⁴C-5-thidiazol]-TDZ y ¹⁴C-Uphenyl]-TDZ); revelaron que el TDZ funciona como una molécula intacta en forma libre como conjugada o secuestrada, lo cual sugiere que el papel del TDZ en la inducción de la morfogénesis de las plantas implica la estimulación del crecimiento de los procesos individuales del regulador del crecimiento de las mismas y el mantenimiento del estado fisiológico del tejido vegetal durante el proceso de cultivo. Según Murch & Saxena (2001) estos datos pueden ser indicio de acciones del TDZ en los tejidos vegetales como la respuesta a estrés metabólico y la modulación de respuestas mediadas por proteínas.

Además TDZ es un reactivo costoso, según SIGMA-ALDRICH (2016) los 100 mg de este reactivo cuestan alrededor de 400 dólares, por lo tanto es importante optimizar

dicho reactivo que usualmente es utilizado en altas concentraciones en procesos de organogénesis directa donde se usan como explantes la hoja, especialmente para arboles tropicales (Anis & Ahmad, 2016).

4.3 Elongación de brotes

Para la fase de elongación de brotes, se obtuvieron los siguientes resultados: el tratamiento “CC” (control) con 50% de los brotes y el 50% restante pertenecen al nivel 2. En el caso del tratamiento “CT₁” (1 mg/L de GA₃), el 50% de los brotes perteneció al nivel 1, un 35% perteneció al nivel 2 y el 15% restante perteneció al nivel 3. Para el tratamiento “CT₂” (1 mg/L de GA₃), el 60% de los brotes perteneció al nivel 1, el 30% de los brotes perteneció al nivel 2, y el 10% restante perteneció al nivel 3. Por otro lado, el tratamiento “CT₃” (2 mg/L de GA₃) presentó un 65% de brotes perteneciente al nivel 1, un 10% perteneciente al nivel 2, un 20% perteneciente al nivel 3 y un 5% perteneciente al nivel 4. Además en el caso del tratamiento “CT₄” (3 mg/L de GA₃), el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 25% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 15% restante pertenecen al nivel 4. Mientras que en el caso del tratamiento “CT₅” (4 mg/L de GA₃), el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 30% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 10% restante pertenecen al nivel 5. Los tratamientos que presentaron mejores resultados para generar elongación en los brotes luego de 2 semanas, son el tratamiento “CT₄” y “CT₅” con puntajes de 71,30 y de 82,15, respectivamente. Con lo que se evidencia un crecimiento de los brotes debido al efecto generado por la fitohormona GA₃ perteneciente a las giberelinas. Esto es corroborado por Raven y sus colaboradores (1992) quienes afirman que las giberelinas tienen efectos sorprendentes sobre el alargamiento del tallo en las plantas intactas, la respuesta más común de las plantas vasculares es un incremento notable del crecimiento de los brotes debido a que estimulan tanto la división celular como elongación celular. El ácido giberélico (GA₃) estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas, desencadenando transiciones desde el

meristemas hasta el crecimiento de los brotes, además estudios fisiológicos revelaron que esta fitohormona desempeña un papel importante en el alargamiento de entrenudos, como se presentó en este estudio (Gupta & Chakrabarty, 2013). En el estudio realizado por Jordan & Piwanski (1997), la elongación de los brotes se desarrolló mediante el subcultivo en un medio libre de fitohormonas que duró 8 semanas. No obstante en la presente investigación se recurrió al uso de GA₃ con el fin de acelerar este proceso, obteniéndose a las 2 semanas longitudes de hasta 2 centímetros en el tratamiento “CT₅” (4 mg/L).

No se han reportado investigaciones en *Vasconcelleas* para la elongación de brotes, sin embargo se han reportado estudios en otras especies como el caso de Ullah y sus colaboradores (2012), donde se usó menor cantidad que el tratamiento “CT₅”. En este trabajo, que se enfocó en la evaluación del efecto del ácido giberélico en la propagación de la variedad de papa “Desiree”, la dosificación de 0,25 mg/L de GA₃ en un medio MS registró los mejores resultados en cuanto a la longitud obtenida de los tallos, raíz y número de hojas en la plántula.

Adicionalmente, se ha empleado el ácido giberélico en combinación con otras fitohormonas como la benciladenina, como en el estudio realizado por Bidarigh & Azarpour (2013) en Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd) donde se evaluó 5 mg/L de GA₃ con 0,1 mg/L de benciladenina y 5 mg/L de GA₃ con 1 mg/L de benciladenina obteniéndose longitudes de 21,73 milímetros y 22,60 milímetros

Dentro del efecto molecular que puede tener el ácido giberélico (GA₃), Chander y sus colaboradores (1984) caracterizaron dos clones de cDNA que corresponden a diferentes especies de ARN cuyo nivel es aumentado por GA₃ en capas de aleurona de cebada (*Hordeum vulgare* L.) donde demostraron que GA₃ y ácido abscísico regulan la síntesis de α -amilasa en capas de aleurona de cebada principalmente a través de la acumulación de ARNm de α -amilasa, en esta investigación se asocia el efecto de GA₃ en la producción de α -amilasa, enzima necesaria en el desarrollo de plántulas de cebada y además está implicada en la hidrólisis del almidón.

Cabe mencionar que los estudios citados anteriormente tienen más de 5 años de antigüedad, sin embargo son los más recientes ya que no se han reportado más investigaciones en babaco.

El logro más importante de la presente investigación fue obtener brotes vía organogénesis directa utilizando segmentos proximales de hojas de babaco [*Vasconcellea* × *heilbornii* (Badillo) Badillo] mediante el uso de un medio suplementado con una concentración de 5 mg/L de TDZ ya que luego de 6 semanas y adicionalmente se usó un medio suplementado con 3 mg/L de GA₃. La importancia del uso de técnicas biotecnológicas en la generación de plantas, radica esencialmente en la producción de plantas libres de virus y bacterias, en el caso del babaco libre de *Fusarium oxysporum* sp.*caricae*, agente responsable de hasta el 100% en la pérdida de producción a nivel *ex vitro*. Adicionalmente la inducción mediante organogénesis directa a partir de hojas en lugar de yemas axilares evita que se obtengan fenotipos malformados como ha ocurrido en otras especies (Reynoird *et al.*, 1993). Dentro de las futuras investigaciones que se podrían realizar sería el uso de sistemas de inmersión temporal, y también la generación de embriones somáticos con el fin de incrementar la producción de brotes de babaco.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se logró elongar brotes obtenidos a partir de segmentos proximales de hojas del híbrido babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] luego de 2 semanas en el medio de elongación de brotes.

El medio óptimo para la formación de brotes a partir de explantes de hojas del híbrido babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] fue el medio “AT₁” (5 mg/L de TDZ) ya que luego de 6 semanas de incubación presentó 137 brotes, sin embargo el análisis inferencial no reveló diferencia estadística entre dicho tratamiento y el tratamiento “AT₂”, pero el primero presentó mejor puntaje (37,07) en la agrupación mediante la prueba de Kruskal Wallis.

Los mejores medios de cultivo para la elongación de las brotes generadas a partir de segmentos de hojas del híbrido babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] fueron los suplementados con 3 mg/L y 4 mg/L de GA₃, debido a que el tratamiento “CT₄” (3 mg/L), el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 25% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 15% restante pertenecen al nivel 4. Mientras que en el caso del tratamiento “CT₅” (4 mg/L), el 50% de los brotes pertenecen al nivel 1, el 30% pertenecen al nivel 2, el 10% pertenecen al nivel 3 y el 10% restante pertenecen al nivel 5.

Luego de evaluar la formación, multiplicación y elongación de brotes del híbrido babaco [*Vasconcellea × heilbornii* (Badillo) Badillo] se puede determinar que el proceso inicial de formación de brotes se demora pues los primeros brotes empiezan a aparecer a las 5 semanas en incubación, pero una vez obtenidos dichos brotes el proceso de multiplicación es acelerado y a las 2 semanas en el medio de multiplicación se pueden obtener hasta 113 brotes en el caso del tratamiento “BT₂”, pero dichos brotes son pequeños en cuanto a su longitud por lo que es necesario realizar un subcultivo en un medio suplementado con GA₃.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

Es importante el manejo de las plantas donadoras por lo cual se recomienda la suplementación semanal de 6-BAP junto con el riego, así como el pre-tratamiento fitosanitario con el fin de disminuir el riesgo de contaminación en los explantes.

Tomando en cuenta el elevado costo del TDZ, es importante optimizar al máximo su uso por lo que en la fase de inducción a brotes y multiplicación recomendaría usar 5 mg/L.

Considerando que a causa del uso de la fitohormona TDZ se genera la formación de callo, es recomendable realizar una remoción del mismo para evitar que éste interrumpa en la formación de brotes.

Es importante desarrollar investigaciones futuras como el enraizamiento, aclimatación, entre otras como las enfocadas en la Biología Molecular con el fin de comparar los brotes obtenidos a nivel *in vitro*, y los que se generan a nivel *ex vitro*, para descartar algún tipo de variación somaclonal.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

AAIC. *Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar. El cultivo de babaco en invernadero*. Quito: Abya Yala.

Abdelnour, A. & Escalante, J. (1994). *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Costa Rica: Orton.

Anis, M. & Ahmad, N. (2016). *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. (1 ed.). Singapur: Springer Science+Business Media Singapore Pte Ltd. Páginas: 260-261.

Arellano, A. (2014). *Plan de negocios para la producción y comercialización de babaco orgánico en la provincia de Tungurahua-Ambato*. Quito: Universidad de las Américas.

Arrillaga, I. & Merkle, S. (1993). *Regenerating Plants from in Vitro Culture of Black Locust Cotyledon and Leaf Explants*. HortScience 28(9):942-945.

Avilés, H. (2009). Evaluación de la producción y de los sistemas de comercialización de babaco (*Vasconcellea heilbornii* Heil) en el cantón Paute. Cuenca: Universidad de Cuenca.

Badillo, V. (2001). Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hill. y no *Vasconcellea* (*Caricaceae*). Ernstia 11 (1), 75-76.

Bidarigh, S. & Azarpour, E. (2013). Effect of BA and GA₃ Application on Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd) under *In-Vitro* Conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. Recuperado el 19 de noviembre de 2016. Disponible en: <http://ijagcs.com/wp-content/uploads/2013/05/1053-1057.pdf>

Bravo, J. & Esquivel, R. (2010). Evaluación de 3 bioles a 3 dosis de aplicación para el enraizamiento de estacas en 2 especies de Caricáceas babaco (*Carica pentagona*)

y jigacho (*Carica stipulata*) en la parroquia Eloy Alfaro, Cantón Latacunga. Latacunga: Unidad académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Bravo, C., Larriva, W. & Minchala, L. (2012). Boletín Técnico N° 409. Manejo integrado de la marchitez vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de babaco. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP. Página: 5.

Caetano, M., Lagos, T., Sandoval, C., Posada, C., Caetano, D. (2008). Citogenética de especies de *Vasconcellea* (Caricaceae). Recuperado el 27 de octubre de 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v57n4/v57n4a04.pdf>

Chander, P., Zwar, J., Jacobsen, J., Higgins, T. & Inglis, A. (1984). The effects of gibberellic acid and abscisic acid on α -amylase mRNA levels in barley aleurone layers studies using an α -amylase cDNA clone. *Plant Molecular Biology* 3:407-418.

Chérrez, J. (2015). Obtención de brotes del híbrido babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) a partir de explantes de hojas *ex vitro*, vía organogénesis directa. Quito. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Cohen, D. & Cooper, P. (1982). *Microprogation of Babaco. A Carica hybrid from Ecuador*. 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokio on Lake Yamahake, Japan. *Plant Tissue Culture*. Páginas: 743-744.

Coyago, R., León, F. & Patiño, V. (2010). Evaluación del comportamiento del babaco (*Vasconcellea x heilbornii nm. pentagona*) en tres tipos de alturas de podas en plantas de seis años de producción en la parroquia Bulán, cantón Paute, provincia del Azuay. Revisado el 18 de agosto del 2016. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4747/1/UPS-CT001969.pdf>

Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. & Massarini, A. (2008). *Biología* (7 ed). Buenos Aires: Médica Panamericana. Páginas: 860- 865.

Depositphotos. Mapa de Ecuador contorno. Revisado el 30 de noviembre del 2016. Disponible en: <http://sp.depositphotos.com/32469361/stock-illustration-contour-ecuador-map.html>

Fabara, J., Bermeo, N. & Barberán, C. (1985). *Manual de Manual del cultivo del babaco. Universidad técnica de Ambato, Consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT)*. Quito – Ecuador. Página: 104.

Gama, M. (2004). *Biología: Biogénesis y microorganismos*. (2 ed). México: Pearson Educación. Página: 126.

García, P. (2011). Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de *Vasconcellas* a *Fusarium sp.* Como posible portainjertos para babaco (*Vasconcellea x heilborni*) bajo cubierta plástica en la estación experimental del Austro Iniap. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Páginas: 13-25.

Gupta, R. & Chakrabarty, S. (2013). *Gibberellic acid in plant. Still a mystery unresolved*. Plant Signaling & Behavior. Landes Bioscience.

Huetteman, C. & Preece, J. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 105-119.

Jordan, M. (2011). *In vitro* morphogenic responses of *Vasconcellea chilensis* Planch. ex A. DC (Caricaceae). *Agronomía Colombiana* 29(3), 481-485, 2011.

Jordan, M. & Piwanski, D. (1997). Regeneration of babaco (*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo) using leaf explants and shoot-tip culture. Argentina: Revista Internacional de Botánica Experimental.

Jordan, M., Vélez, D. & Armijos, R. (2009). *Bioteconologías aplicables al desarrollo de algunas especies de Caricáceas cultivadas en la región Andina: avances y problemas*. Colombia: Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas.

Krikorian, A. (1991). *Medios de cultivo. Generalidades, composición y preparación en Cultivo de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia: Eds. Roca y Mroginski. Centro Internacional Agricultura Tropical. Páginas: 41-48.

Lim, T. (2012). *Vasconcellea x heilbornii*. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. London: Springer Science+Business. Página: 718-721.

Linstromberg, W. (1977). *Curso breve de química orgánica*. España: Reverté. Página: 385.

Llorente, B. (2000). Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Argentina: Universidad Nacional de la Plata.

Lloyd, G. & McCown, B. (1980). *International Plant Propagators' Society*. Revisado el 30 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.himedialabs.com/TD/PT026.pdf>

Luna, S. (2006). Cultivo de tejidos. Platica Conserv Spp Veg Mex Xct. Revisado el 16 de noviembre del 2016. Disponible en: <http://es.slideshare.net/susylunar/platica-conserv-spp-veg-mex-xct-presentation>

MAE. Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2010). *Reservas de Biosfera del Ecuador: lugares excepcionales*. Revisado el 18 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/Plan-estrategico-MAE-2012.pdf>

MAGAP. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (2013). *Producción de babaco en la provincia de Tungurahua*. Ambato, Ecuador.

Martínez, E. & Agustí, L. (2006). *Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales*. Barcelona: Publicaciones 1 Ediciones de la Universidad de Barcelona.

Matute, L. & Tirado, B. (2013). Análisis bromatológico de *Vasconcellea pulchra* V.M. Badillo y *Vasconcellea x heilbornii* V.M. Badillo procedentes de la provincia Bolívar, Ecuador. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.

Moitreyee, S. (2010). *In vitro* culture studies of axillary bud explants from field grown plants of *Carica Papaya L.* - Bacterial discontamination. *Bionano frontier*, 178-181.

Murashige, T. (1974). *Plant propagation through tissue cultures*. *Plant Physiology*. 25:135-66.

Murch, S. & Saxena, P. (2001). Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium × hortorum* Bailey. *Plant Growth Regulation* 35: 269–275.

Murthy, B., Murch, S. & Saxena P. (1998). *Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. Review. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 34: 267-275. Octubre-Diciembre.

Nabors, M. (2005). Introducción a la botánica. Pearson. <http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/10/citocininas.html>

Pérez, J., Alvarado, Y., Gómez, R., Jimenez, E., & Orellana, P. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de biotecnología de las plantas. Volumen 1.

Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las Plantas Superiores*. Mundi-Prensa.

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

Quintana, M. (2014). *Establecimiento de un protocolo para inducir embriogénesis somática aplicando la técnica de plaqueo en callos de babaco, jigacho y sus fusionantes*

a partir de suspensiones celulares. Quito: Tesis de Grado - Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Raghu, A., Geetha S., Martin, G., Balachandran, I., Ravindran, P. (2006). Direct shoot organogenesis from leaf explant of *Embelia ribes* Burn. f.: a vulnerable medicinal plant. *J For Res* 11: 57-60.

Raven, P., Evert, R. & Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. España: Editorial Reverté. Páginas: 427-430.

Reyes, M. (2007). *Determination of glycosidases in babaco (Vasconcellea x Heilbornii cv. Babaco) Purification and characterization of α -Mannosidase from babaco latex*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.

Reuveni, O., Shlesinger, D. & Lavi, U. (1989). *In vitro clonal propagation of dioecious Carica papaya*. *Plant Cell*

Richard, A. (1939). *Nuevos elementos de Botánica y de fisiología vegetal*. Barcelona: Imprenta José Rubio. Páginas: 166-168.

Rivera, M. & Jadán, M. (2010). Aislamiento, Purificación y Fusión de Protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.

Robles, A., Herrera, L. & Torres, R. (2016). El babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona Badillo). Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control. *Centro Agrícola*, 43 (2): 83-92; Abril-Junio, 2016. Recuperado el 27 de octubre de 2016. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v43n2/cag11216.pdf>

Roca, W., & Mroginski. (1993). *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT. Centro Internacional de la Agricultura Tropical.

Scheldeman, X., Kyndt, T., Coppens, G., Ming, R., Drew, R., Van Droogenbroeck, B., Van Damme, P. & Moore, P. (2011). C. Kole (ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic*

and Breeding Resources, Tropical and Subtropical Fruits, DOI 10.1007/978-3-642-20447-0_11, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.

SIGMA-ALDRICH. (2016). *Thidiazuron: plant cell culture tested*, BioReagent. Revisado el 28 de agosto del 2016. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6186?lang=en®ion=EC>

Solagro. Productos-Fungicidas. Revisado el 11 de noviembre del 2016. Disponible en: <http://www.solagro.com.ec/web/proddet.php?vcodigo=FU.SOLVEN&vtipo=FUN>

Soria, N. & Viteri, P. (1999). *Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador*. INIAP. Proyecto de Fruticultura.

Ullah, I., Jadoon, M., Rehman, A., Zeb, T. & Khan, K. (2012). Effect of Different GA3 Concentration on *in vitro* Propagation of Potato Variety Desiree. *Asian Journal of Agricultural Sciences* 4(2): 108-109, 2012.

Vaca, I. (2008). Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv babaco) *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.

Varutharaju, K., Soundar C., Thilip, C., Aslam, A. & Shajahan, A. (2014). High Efficiency Direct Shoot Organogenesis from Leaf Segments of *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schult by Using Thidiazuron. *Hindawi. The Scientific World Journal*. Revisado el 17 de noviembre del 2016. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/652919/>

Vega, R. & Kitto, S. (1991). Regeneration of Babaco (*Carica pentagona*) from Ovular callus. United States: *Journal of the American Society for Horticultural Science*.

Viteri, P. (1992). *El cultivo del Babaco en el Ecuador*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santa Catalina. Revisado el 25 de agosto del 2016. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2450/1/iniapscm19c.pdf>