

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

La recolección del material vegetal para esta investigación se realizó en la provincia de Tungurahua; sectores Patate, Guadalupe y Leito; sitios estratégicos en el país por tener ecotipos de tomate de árbol idóneos en resistencia biótica y buena producción; la recolección se conformó de ramas compuestas de yemas apicales, axilares y de frutos de plantas consideradas madre por evolución selectiva frente a enfermedades; esta recolección fue realizada cada 15 días durante la estandarización de la etapa de desinfección. El genotipo escogido fue el tomate de árbol amarillo puntón con pulpa del mismo color, conocido también como tamarillo; el cual es especialmente solicitado en el mercado nacional e internacional.

La investigación y propagación *in vitro* de la especie se llevó a cabo en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicado en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui de la provincia de Pichincha, a 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; y altitud: 2516 msnm; donde se cuenta con todo el material y reactivos necesarios para el desarrollo de la investigación.

2.2 Etapa de toma de muestras y establecimiento *in vitro*.

Para la toma de muestras vegetales de campo, ideales para su introducción al sistema de cultivo *in vitro*, se eligieron los especímenes que presentaron las mejores características fenotípicas como son: mayor número de renuevo de yemas, plantas libres de hongos o algún tipo de enfermedad, vigorosas, con follaje perenne y denso (Pierik, 1990). Todo el ensayo se desarrolló en un ambiente de 25 ± 1 °C de temperatura, 60 ± 2 % de humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de 2100 a 2400 luxes.

2.2.1 Establecimiento del medio nutritivo.

En este ensayo se evaluó el medio nutritivo de introducción ideal para el cultivo *in vitro* de *Solanum betaceum*, en donde se probó dos tipos de medios de cultivo, el

medio generado por las sales de Murashige y Skoog (1962) o conocido también como medio de cultivo MS, y un medio propuesto por Chu y colaboradores (1975) llamado también medio de cultivo N6. Ambos medios nutritivos presentaron variaciones en sus concentraciones, especialmente en macronutrientes, pues se analiza la cantidad de éstos para la adaptación de la especie al sistema de cultivo *in vitro* y lograr que la especie tome una modalidad semi heterótrofa. Establecido ya el medio de cultivo se lo utilizó en las siguientes etapas del cultivo con la variación de carga hormonal, específicamente en la etapa de multiplicación

2.2.1.1 Recolección de muestras

De las plantas de campo ubicadas en la zona geográfica descrita en el punto 2.1; se cortó de las ramas más prematuras las yemas apicales y axilares y se las transportó en frascos de vidrio boca ancha con agua estéril y ácido cítrico en concentración de $0,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para evitar así la oxidación y el necrosamiento; no se colocó ácido ascórbico porque es fotosensible y termolábil. Las ramas transportadas tenían una longitud de 10 a 15 centímetros; en donde se ubican de 3 a 5 yemas axilares y una yema apical. Se utilizó antibiótico de amplio espectro para evitar la contaminación de bacterias Gram negativas y positivas como fue cloranfenicol en concentración $0,25 \text{ g L}^{-1}$ y tetraciclina en concentración $0,065 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente; disueltos en el agua estéril donde se transporta los explantes.

2.2.1.2 Tratamientos de desinfección

Se analizaron diferentes tratamientos de desinfección, los cuales variaron en la concentración del hipoclorito de sodio utilizado. El tratamiento general de desinfección utilizado fue:

1. Se realizó un lavado con agua estéril por 10 minutos en agitación constante con 5 g L^{-1} detergente
2. Se enjuagó la solución de detergente con 3 lavados con agua estéril
3. Se realizó un lavado de 10 minutos en el fungicida Score 250EC con una concentración de 2 mL L^{-1}
4. Se enjuagó el fungicida con 3 lavados con agua estéril
5. Se colocó los explantes en alcohol etanol 70% por 40 segundos
6. Se aplicó hipoclorito de sodio en dos concentraciones diferentes; 2 % y 1,2 %

7. Finalmente se realizó 3 lavados con agua estéril del hipoclorito de sodio dentro de la cámara de flujo laminar y se dejó los explantes en agua estéril para proceder a la siembra en los tubos con medio nutritivo.

2.2.1.3 Medios de establecimiento

Se analizaron dos medios de establecimiento, uno proporcionado por Murashige & Skoog (Cuadro 2.1) y un medio generado por Chu y colaboradores (N6) (Cuadro 2.2) modificado para cultivo de forestales (Jaramillo, 2008).

Cuadro 2.1 a Macronutrientes utilizados en la preparación del medio propuesto por Murashige & Skoog (Tomado de Murashige & Skoog, 1962)

STOCK	SALES	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)
I	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
II	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	MnSO ₄ H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025
III	CaCl ₂ .6 H ₂ O	440
	KI	0,83
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,025
IV	KH ₂ PO ₄	170
	H ₃ BO ₃	6,2
	NaMoO ₄ .2 H ₂ O	0,25
V	FeSO ₄ .7 H ₂ O	27,84
	Na ₂ EDTA	37,24

Cuadro 2.1b Micronutrientes modificado del medio propuesto por Murashige & Skoog, (modificado por Espinoza, 2005)

Micronutrientes	Concentración (mg L ⁻¹)
Inositol	100
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2
Tiamina	1
Piridoxina	0,5
Glutamina	2,5

Cuadro 2.2 Componentes del medio de Chu y colaboradores, 1975 (N6)
(Modificado por Jaramillo, 2008)

Componentes	Concentración (mg L ⁻¹)
KNO ₃	1174,8
KH ₂ PO ₄	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	185
(NH ₄) ₂ SO ₄	387,4
CaCl ₂ .2 H ₂ O	166
KI	0,8
MnSO ₄ H ₂ O	2,98
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	1,6
FeSO ₄ .7 H ₂ O	13,93
Na ₂ EDTA	18,63
Sacarosa	25gr/L
Tiamina HCl	1
Piridoxina HCl	1
Ácido nicotínico	1
Mioinositol	100
Biotina	0,01
AG3	1
BAP	0,5

Los tratamientos que se prepararon con medio de cultivo MS tuvieron una concentración de macronutrientes reducida en una cuarta parte, con lo cual se pretendió reducir la cantidad de nutrientes en el medio para evitar la oxidación y el auto-necrosamiento de los explantes. Los tratamientos fueron planteados en un diseño completamente al azar (DCA), como se detallan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Tratamientos aplicados para la evaluación de medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de explantes de tomate de árbol.

TRATAMIENTO	% CLORO	TIPO DE MEDIO
1	2	N6
2	2	M&S
3	1,2	N6
4	1,2	M&S

Repeticiones: 20

Unidad experimental: una yema sembrada en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Se realizó la evaluación de todas variables una semana después de la siembra.

Contaminación bacteriana y fúngica: se realizó la observación de presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo. Con fines de análisis estadístico se evaluó con cero (0) la presencia de contaminación y la ausencia de ésta, con uno (1). Se empleó una prueba chi cuadrado y un análisis de porcentajes para esta variable.

Nivel de Oxidación: se estableció tres niveles distintos de oxidación que presentan los explantes luego de la desinfección: oxidado muerto (1), que significa necrosamiento total; oxidado vivo (2), que presenta necrosamiento pero no en un nivel avanzado permitiendo viabilidad del explante; y no oxidado (3), donde el explante es viable y no presenta oxidación degenerativa de tejido (Figura 2.1). Se realizó un análisis de varianza (ADEVA) y prueba de Tukey con un 95% de confianza para observar diferentes grupos estadísticos.

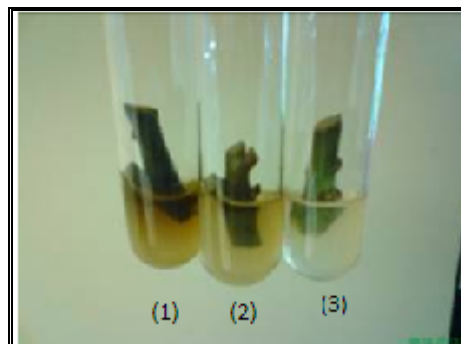


Figura 2.1 Representación gráfica de los tres niveles de oxidación evaluados en el ensayo

2.2.2 Establecimiento del tratamiento de desinfección más apropiado para la especie

En este ensayo se evaluó los mejores bactericidas-fungicidas funcionales para esta especie, para incluirlos en el protocolo de desinfección de los explantes; ya que el ensayo antes descrito presentó gran contaminación exógena y endógena en su desarrollo *in vitro*; por lo cual se trabajó con solución de fungicidas de principio activo sulfato de cobre pentahidratado (0,24%), difenoconazole (3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-

1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter)), y marcas de químicos comerciales Captan-Benomil, agentes químicos recomendados en bibliografía, (Espinoza *et al.*, 2005). De igual manera se evaluó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio para encontrar el mejor tratamiento de desinfección.

2.2.2.1 Recolección de muestras

Se recolectó ramas de las plantas madre con una longitud aproximada de ocho centímetros que contenían 3 a 4 yemas incluida la apical; se las transportó totalmente sumergidas en agua estéril en frascos de vidrio de boca ancha con una solución de ácido cítrico en concentración $0,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ como agente antioxidante, y $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de cloranfenicol y $0,065 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de tetraciclina como antibióticos.

2.2.2.2 Medio de establecimiento

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se decidió trabajar en adelante con el medio MS modificado en un 75% de su concentración de macronutrientes y suplementado con las vitaminas utilizadas en el cuadro 2.1b. El pH se mantuvo en $5,8 \pm 1$; como agente solidificante 8 g de agar y como fuente de carbono 10 g de azúcar blanca (sacarosa).

2.2.2.3 Tratamientos de desinfección

Se trabajó con el método de desinfección general; con la adición de diferentes tipos de fungicida-bactericida, los cuales fueron Captan®-Benomil® en relación 1:1, $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$; sulfato de cobre pentahidratado (0,24%) (Phyton) $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ y difenoconazole (Score 250EC) $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$. Se planteó un arreglo factorial $3 \times 2 \times 2 + 1$; a partir del uso de los tres fungicidas descritos; además se planteó dos concentraciones de cloro (0,8% y 1,2%) con dos tiempos de inmersión (10 y 15 min), resultando un total de 12 tratamientos, más un adicional, detallado en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Tratamientos aplicados para la evaluación de fungicida bactericida en el proceso de desinfección de tomate de árbol.

TRATAMIENTO	FUNGICIDA-BACTERICIDA	TIEMPO CLORO (min)	CONCENTRACIÓN CLORO (%)
1	Captan-Benomil	10	0,8
2	Captan-Benomil	15	0,8
3	Captan-Benomil	10	1,2
4	Captan-Benomil	15	1,2
5	Phyton	10	0,8
6	Phyton	15	0,8
7	Phyton	10	1,2
8	Phyton	15	1,2
9	Score	10	0,8
10	Score	15	0,8
11	Score	10	1,2
12	Score	15	1,2
13 (adicional)	Captan-Benomil	15	0,6

Repeticiones: 10

Unidad experimental: una yema sembrada en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Contaminación bacteriana y fúngica: presencia de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo. Se evaluó con uno (1) el medio de cultivo contaminado y con cero (0) los medios de cultivo sin presencia de contaminación.

Viabilidad: desarrollo positivo del explante en el sistema de cultivo *in vitro* representado con cero (0), el cual determina que la yema sobrevivió al tratamiento de desinfección; y uno (1) al explante que presentó necrosamiento ya sea por oxidación o por contaminación.

Nivel de oxidación: el necrosamiento de los explantes por la acción fenólica que genera la especie como autodefensa se evaluó en distintos porcentajes tomando como referencia la escala de oxidación aplicada por Jaramillo (2008) (Cuadro 2.3) (Figura 2.2)

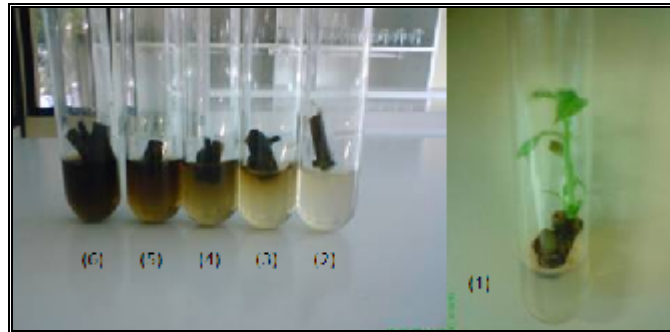


Figura 2.2 Representación gráfica de los seis niveles de oxidación evaluados.

Cuadro 2.3 Escala de niveles de oxidación equivalente en porcentaje de oxidación de los explantes (Jaramillo, 2008)

Nivel	Porcentaje
0	5%
1	15%
2	30%
3	45%
4	60%
5	75%
6	90%

Evaluación: una semana después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleó un análisis de chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas, además se realizó un análisis de varianza (ADEVA) de los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

2.2.3 Establecimiento del fungicida idóneo para el protocolo de desinfección.

A partir del apartado 2.2.2; en esta ocasión se decidió evaluar los fungicidas-bactericidas que presentaron mejores resultados, es decir, menor contaminación y oxidación; la solución de fungicidas de principio activo sulfato de cobre pentahidratado (0,24%) y difenoconazole fueron las mejores. Se varió las concentraciones y los tiempos de inmersión, y se mantuvo una concentración constante de hipoclorito de sodio al 1,2%; ya que fue la mejor concentración encontrada en el ensayo anterior.

2.2.3.1 Recolección de muestras

La recolección se la hizo acorde al apartado 2.2.2.1, se extrajo los explantes de una zona cercana al Valle de Patate llamada Leito, de una plantación de 5 años en la cual se han colocado fungicidas como Mucoses y Fitoraz en el suelo, y no en las plantas. El traslado de las plantas se lo realizó como se indica en el apartado 2.2.1.1; con la única variación que se cambió el tipo de antibiótico a ampicilina en concentración de 1g L^{-1} ; el cual se utilizó en los frascos de vidrio con boca grande y agua estéril para el traslado de los explantes.

2.2.3.2 Tratamientos de desinfección

Se aplicó un método de desinfección similar al utilizado en el ensayo anterior, con pocas variaciones, se planteó un diseño completamente al azar (DCA) donde se evaluó los fungicidas-bactericidas que presentaron mejores resultados en diferentes tiempos de inmersión, aplicados en un arreglo factorial 2x2 (Tabla 2.3). El método general se detalla a continuación:

1. Lavado en agitación con 5 g L^{-1} de detergente y jabón líquido por 15 minutos.
2. 3 lavados con agua estéril
3. Lavado con los distintos fungicidas a diferentes tiempos de inmersión.
4. 3 lavados con agua estéril
5. Lavado en etanol 70 % por 40 segundos
6. Lavado en hipoclorito de sodio al 1,2 % por 12 minutos
7. 3 lavados con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Tabla 2.3 Tratamientos aplicados en la evaluación del uso de los distintos fungicidas.

TRATAMIENTO	FUNGICIDA-BACTERICIDA	TIEMPO DE INMERSIÓN (min)
1	Phyton	15
2	Phyton	20
3	Score	15
4	Score	20

Repeticiones: 25

Unidad experimental: una yema sembrada en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Contaminación bacteriana y fúngica: generación de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo. Se evaluó con uno (1) el medio de cultivo contaminado y con cero (0) los medios de cultivo no contaminados.

Viabilidad: determina la sobrevivencia del explante al proceso de desinfección, se expresa con su desarrollo en el medio de cultivo, se mide determinando sobrevivencia, vivo cero (0) y muerto uno (1).

Nivel de oxidación: se evaluó la cantidad de necrosamiento que presenta el explante a causa de la oxidación fenólica que genera como autodefensa a la manipulación. Se evaluó cualitativamente en porcentaje aplicado de Jaramillo (2008) (Cuadro 2.3 y figura 2.2).

Una semana después de la siembra se evaluó las muestras empleando la prueba de Chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas, además se realizó un análisis de varianza (ADEVA) de los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

2.2.4 Evaluación del uso de antibiótico en la desinfección

El presente ensayo evaluó otro una solución de fungicida de principio activo carbendazim (0,5%), el cual fue utilizado en otra investigación de cultivo *in vitro* desarrollada en los mismos laboratorios con la especie *Jatropha curcas* (Peña, 2009), el motivo de su uso fue porque con esta especie arbustiva similar a la tratada en esta investigación presentó buenos resultados en la etapa de desinfección, se lo empleó a una concentración de 2 mL L⁻¹; combinado con los mejores fungicidas encontrados en los ensayos precedentes. De igual manera se trató de analizar el uso de antibióticos en la desinfección del material vegetal, los cuales fueron ampicilina y rifamicina, químicos de amplio espectro bactericida tanto para Gram positivas como para Gram negativas. (Phillips *et al.*, 1981)

2.2.4.1 Recolección de muestras

La recolección de muestras de este ensayo se la realizó de otro sector ubicado en la Provincia de Tungurahua aledaño a Patate llamado Guadalupe, en esta ocasión se evito traer ramas de contextura gruesa, pues en el apartado 2.2.3.1 se observó que generaron mucha contaminación, por lo cual se extrajo explantes de las ramas más apicales. El transporte se lo realizó en los frascos de vidrio boca ancha con agua estéril, $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de ácido cítrico y como antibiótico se utilizó $0,67 \text{ g L}^{-1}$ de tetraciclina.

2.2.4.2 Tratamientos de desinfección

En esta fase la metodología sufrió ciertas modificaciones en cuanto al proceso de desinfección de la siguiente manera:

- De los frascos de traslado de explantes se extrajo las muestras y sobre servilletas estériles se procedió a cortar en segmentos más pequeños que contengan máximo tres yemas.
- Los explantes obtenidos se los lavó a flujo constante de agua durante 1 minuto.
- Se colocaron los explantes en agua estéril con 3 g L^{-1} de detergente y 2 mL L^{-1} de jabón liquido a agitación constante por 10 minutos.
- Se realizaron tres lavados con agua estéril para retirar residuos de jabón.
- Se realizó dos tratamientos con fungicidas-bactericidas, carbendazim ($0,5\%$), (2 mL L^{-1}); sulfato de cobre pentahidratado ($0,24\%$) (1 mL L^{-1}); y difenoconazole (1 mL L^{-1}).
- Se retiró el químico con tres lavados de agua estéril.
- Se mantuvo los explantes durante 2 minutos en etanol al 70%
- Sin enjuagar se procedió a colocarlos en hipoclorito de sodio, en donde se aplicaron dos tratamientos a distinta concentración, $1,5 \%$ y 2% .
- Se retiró el hipoclorito con tres lavados con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar.
- La siembra de cada explante desinfectado se realizó sobre papel estéril.
- Se sumergió durante 10 segundos en distinta solución de antibiótico (ampicilina (1 g L^{-1}) y rifamicina ($0,67 \text{ g L}^{-1}$)) a cada uno de los explantes, antes de su siembra en los tubos de vidrio con medio de cultivo.

En la tabla 2.4 se detalla el DCA planteado con tratamientos utilizando combinación de fungicidas, distintas concentraciones de hipoclorito de sodio, y el uso de antibióticos.

Tabla 2.4 Diferentes tratamientos de desinfección empleando antibióticos como control de la contaminación

TRATAMIENTO	FUNGICIDA	% CLORO	ANTIBIOTICO
1	Bavistin + Phytol	2	Ampicilina
2	Bavistin + Score	2	Rifanmicina
3	Bavistin + Score	1,5	Rifanmicina
4	Bavistin + Phytol	1,5	Ampicilina

Repeticiones: 20

Unidad experimental: una yema sembrada en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Contaminación bacteriana y fúngica: presencia (1) o ausencia (0) de colonias bacterianas o fúngicas en el medio de cultivo.

Viabilidad: determina la sobrevivencia del explante al proceso de desinfección del cual proviene, observando si el explante presenta viabilidad en su metabolismo o si el necrosamiento por oxidación o contaminación omitió su vitalidad. Se mide determinando sobrevivencia, vivo cero (0) y muerto uno (1).

Nivel de oxidación: se evaluó la cantidad de necrosamiento que presenta el explante a causa de la oxidación fenólica que genera como autodefensa a la manipulación. Se evaluó cualitativamente en porcentaje aplicado por Jaramillo (2008) (Cuadro 2.3 y figura 2.2).

Evaluación: una semana después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleó una prueba de Chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas; un análisis de varianza (ADEVA) para

los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante una prueba de Tukey al 5%.

2.3 Germinación de semillas *in vitro*.

Para la generación de explantes libres de contaminación, se decidió partir de semillas obtenidas de frutos de plantas madre con las características indicadas anteriormente, el ecotipo fue el tomate amarillo puntón con pulpa de similar color, proveniente de la provincia de Tungurahua, sector Patate. La utilización de semillas para generar plantas madre puras *in vitro*, se realizó para posteriormente determinar diferencias entre plantas ingresadas al sistema *in vitro*, y plantas generadas en este sistema; esto es, comparar explantes que provienen de organogénesis somática y explantes generados por embriogénesis zigótica en sistemas *in vitro*. El proceso se dio a 23 °C y 68 % de humedad relativa; con un fotoperiodo de 16 horas e intensidad lumínica de 2100 a 2400 luxes.

2.3.1 Tratamiento de desinfección y variables evaluadas

La desinfección que se aplicó en este ensayo es diferente a la aplicada en ensayos anteriores, por el tipo de explante que se utiliza. Las semillas se encuentran estériles dentro del fruto, en este punto lo que se necesita es retirar la capa gelatinosa que las cubre llamada cubierta seminal o episperma, el cual contiene las dos capas, testa al exterior y tegmen en el interior, para así lograr que la semilla se quede solo en la capa del endosperma, pues ahí se consigue un mejor desarrollo del embrión, ya que el tejido meristemático está mucho más cercano a los nutrientes del medio de cultivo. Todo el proceso de desinfección se lo realizó en la cabina de flujo laminar y se lo estructuró de la siguiente manera:

- Se flameó el fruto donante de las semillas con etanol al 90 %
- Se cortó transversalmente el fruto por la mitad.
- Se retiró la cubierta seminal de cada semilla con la utilización de pinza y bisturí estériles.
- Se utilizó una jeringa de 5 mL con algodón en la punta para que funcione como filtro autoclavado, en donde se colocó las semillas ya procesadas.

- Llena la jeringuilla se procedió a absorber etanol al 70 % y mantener las semillas sumergidas durante dos minutos.
- De la misma forma se lava las semillas con agua estéril por tres veces.
- Se absorbió hipoclorito de sodio al 1,5 % por ocho minutos, y se lavó nuevamente tres veces con agua estéril.
- Se procedió a la siembra, tres semillas por frasco.

El medio de establecimiento para la generación de plántulas a partir de semillas fue el propuesto por las sales de Murashige & Skoog a concentración normal con el implemento de vitaminas como Tiamina 0,1 mg L⁻¹, mioinositol 100 mg L⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg L⁻¹, piridoxina 0,5 mg L⁻¹ y glicina 2 mg L⁻¹. Se utilizó como agente solidificante 7 g L⁻¹ de Bacto® agar y 20 g L⁻¹ de azúcar blanca; el pH se mantuvo en 5,8 ± 1.

Partiendo de este medio de cultivo base se evaluó diferentes concentraciones de brasinoesteroides, para determinar la mejor respuesta de los explantes a este regulador. Los tratamientos utilizados se detallan en la tabla 2.5.

Tabla 2.5 Diferentes concentraciones de brasinoesteroides utilizados en la germinación *in vitro* de semillas de tomate de árbol

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE BRASINOLIDA (mg L ⁻¹)
1	0
2	0,04
3	0,4
4	1
5	4

Repeticiones: 24

Unidad experimental: una semilla en un frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Germinación: se evaluó si la semilla generó alguna clase de desarrollo, ya sea como brote o radicular, denominando como uno (1) a germinación, y cero (0) a no germinación (Figura 2.3)



Figura 2.3 Fotos que representan germinación o no de las semillas desarrolladas en cultivo *in vitro*

Grosor del tallo (GT): se evaluó cualitativamente en tres niveles de grosor: uno (1) a tallo delgado; dos (2) a tallo de grosura mediana, tres (3) a tallo grueso y cuatro (4) a semillas que no fueron viables (Figura 2.4).

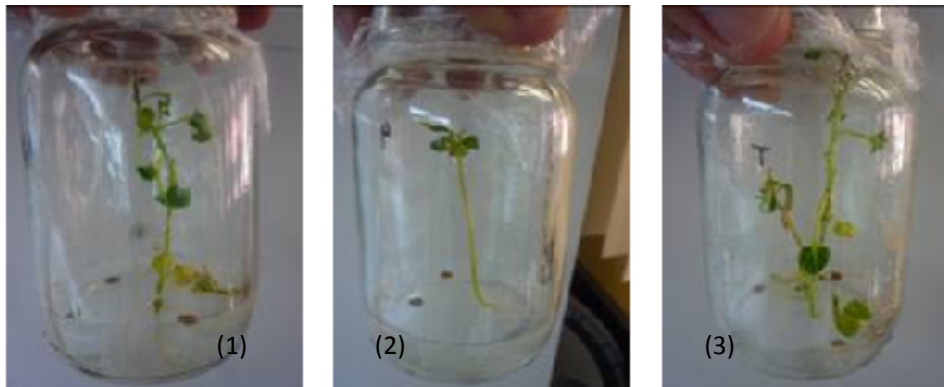


Figura2.4 Clasificación de niveles de grosor de tallo. (1)Delgado, (2) Medio y (3) Grueso

Altura de la Planta (AT): se evaluó la altura de la plántula partiendo desde la superficie del agar con el uso de una regla milimetrada, el valor obtenido se dio en milímetros

Número de brotes (NB): se evaluó cuantitativamente el número de brotes que generaron las semillas desarrolladas *in vitro* (Figura 2.5).



Figura 2.5 Numero de brotes determinado por las yemas axilares y la yema apical generadas a partir del desarrollo de la semilla *in vitro*.

Densidad de la raíz (DR): las raíces que se formaron presentaron diámetros muy reducidos, por lo cual no se realizó una evaluación cuantitativa, sino cualitativa; en la cual se separó tres niveles distintos de densidad de raíz; los cuales fueron uno (1) poco, entre 1 a 15 raíces; dos (2) medio, entre 15 y 30 raíces y, tres (3) abundante, mayor a 30 raíces presentes en el medio de cultivo, se tomo en cuenta raíces profundas como superficiales (Figura 2.6).

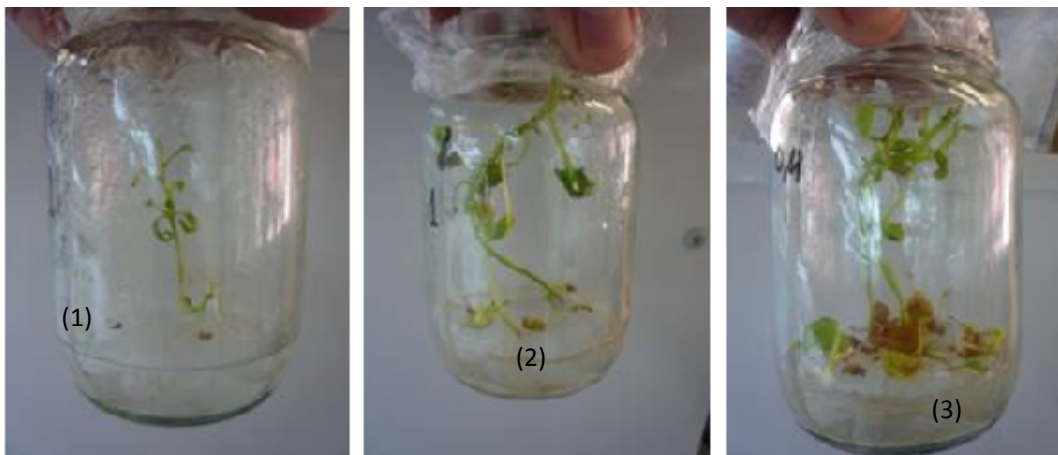


Figura 2.6 Densidad de raíz dividida en tres niveles, (1) poco, (2) medio, (3) abundante.

Transcurridos 45 días después de la siembra se aplicó una evaluación estadística en base a pruebas de Chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas, y una prueba de varianza (ADEVA) para los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

2.4 Etapa de Multiplicación

Ya establecida la mejor desinfección se procedió a la siguiente fase, en la cual se trabajó con las sales de Murashige y Skoog (MS) a las tres cuartas partes de su concentración suplementado con 0,1 g.-L⁻¹ de Mioinositol, 0,5 mg.-L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg.-L⁻¹ de glicina, 1 mg.-L⁻¹ de Tiamina, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina; medio de cultivo tomado de anteriores apartados, y ya estandarizado para todos los procesos de multiplicación. En esta etapa se incluye en las vitaminas a la glutamina en concentración de 2,5 mg L⁻¹; pues otorga mayor contenido de nitrógeno, lo que generó mayor crecimiento y desarrollo del explante (Moré *et al.*, 2001).

Se disminuyó la cantidad azúcar a 10 gramos por litro en el medio nutritivo, pues con menor cantidad de carbono la planta genera energía suficiente para crecer y desarrollarse, más no para autodefenderse, con lo cual se logró evitar la generación de polifenoles precursores de la oxidación de los explantes sembrados como lo menciona Pierik (1990).

El diseño experimental (Tabla 2.6) se basó en un arreglo factorial evaluando tres biorreguladores de crecimiento a tres concentraciones diferentes cada uno; en esta etapa se utilizó mayor concentración de citoquininas que auxinas para obtener un buen desempeño sinérgico hormonal (Roca, 1991), y se utilizó las mejores concentraciones de brasinólida obtenidas del apartado 2.3. Los biorreguladores de crecimiento o llamadas también hormonas utilizadas en este ensayo fueron brasinólida (Brs) como un brasinoesteroide específico, ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) (Tabla 2.6). Se determinó las mejores interacciones de las brasinólidas con los otros biorreguladores de crecimiento para su aplicación en producción masiva de la especie. Se estableció un arreglo factorial 3x3x3 en un DCA con diez repeticiones, por tanto se obtuvieron 27 tratamientos en total (Tabla 2.7).

Tabla 2.6 Concentraciones de reguladores de crecimiento para la aplicación del arreglo factorial en el cultivo *in vitro* de *Solanum betaceum*

	Biorreguladores		
	Auxina	Citoquinina	Brasinólida
Concentración	0 mg L ⁻¹	0 mg L ⁻¹	0 mg L ⁻¹
	0,5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹

	1 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹
--	----------------------	----------------------	----------------------

Tabla 2.7 Diferentes tratamientos aplicados en la multiplicación de brotes de tomate de árbol

Tratamiento	AIA mg L ⁻¹	BAP mg L ⁻¹	Brasinolida mg L ⁻¹
1	0	0	0
2	0	0	1
3	0	0	4
4	0	1	0
5	0	1	1
6	0	1	4
7	0	2	0
8	0	2	1
9	0	2	4
10	0,5	0	0
11	0,5	0	1
12	0,5	0	4
13	0,5	1	0
14	0,5	1	1
15	0,5	1	4
16	0,5	2	0
17	0,5	2	1
18	0,5	2	4
19	1	0	0
20	1	0	1
21	1	0	4
22	1	1	0
23	1	1	1
24	1	1	4
25	1	2	0
26	1	2	1
27	1	2	4

Cabe mencionar que se realizó el ensayo por duplicado, ya que se lo aplicó con explantes que provinieron de organogénesis somática (plantas obtenidas de campo a partir de yemas axilares o apicales) y con explantes obtenidos de embriogénesis cigótica (plantas obtenidas *in vitro* a partir de semilla); obteniendo un aproximado de 540 muestras a evaluar.

Unidad experimental: una yema inducida *in vitro* o una yema introducida al sistema *in vitro* desde campo; trasplantada en un frasco con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Viabilidad o sobrevivencia: Se determinará el necrosamiento de la planta de manera cualitativa. Se evalúa vivo cero (0) y uno (1) muerto. (Figura 2.7)



(1) Muerto



(0) Vivo

Figura 2.7 Representación gráfica de explantes que presentaron o no sobrevivencia al sistema de cultivo *in vitro*.

Nivel de Oxidación: Se observará el nivel de oscurecimiento del medio de cultivo de manera cualitativa en distintos porcentajes tomando como referencia Jaramillo, 2008. Se evalúa seis niveles de oxidación (15, 30, 45, 60, 75 y 90%) (Cuadro 2.3; Figura 2.2)

Número de Brotes: Número de brotes por yema o explante determinado cuantitativamente por observación. (Figura 2.8)



Figura 2.8 Representación gráfica de brotes originados en el cultivo *in vitro* de *Solanum betaceum* en la fase de multiplicación

Número de raíces: Número de raíces en cada vitroplanta determinado cuantitativamente por observación. (Figura 2.6)

Formación de callo: Cantidad de células determinado por cantidad de masa ocupacional de éstas en el medio de cultivo de forma cualitativa. Se estableció tres niveles, formación baja, uno (1); formación media, dos (2) y alta formación, tres (3). Cuando el explante no germinó se coloca cero (0). (Figura 2.9)

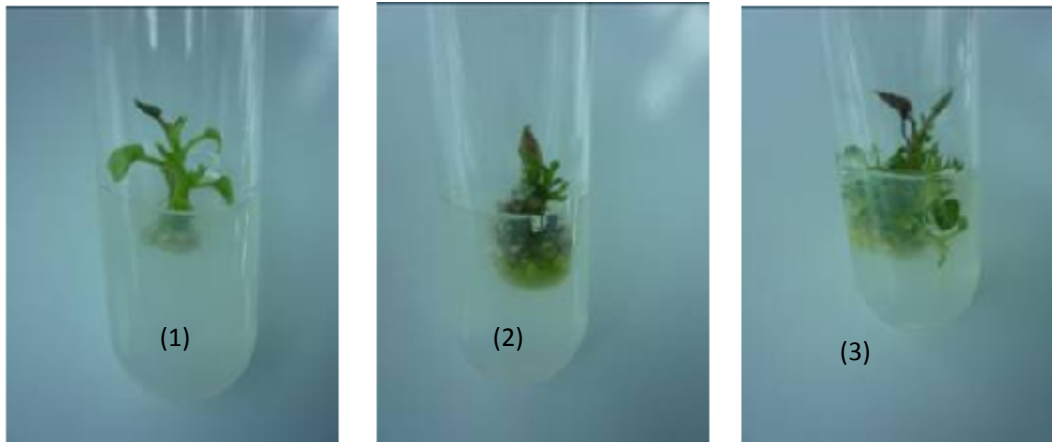


Figura 2.9. Niveles de grosor de callo. (1) bajo (2) medio y (3) alto

Altura de la planta: Altura de la planta medida en milímetros desde la superficie del agar hasta el alto de su ápice u hoja, con el uso de una regla milimetrada, tomada a los 34 días transcurridos desde su siembra. (Figura 2.10)



Figura 2.10 Altura de la planta tomada en milímetros a partir de la superficie del agar

Grosor del tallo: Ancho del tallo aéreo medido cualitativamente en tres niveles, tomado a los 34 días de su siembra. Los niveles se detallan como delgado, uno(1); medio, dos (2) y grueso, tres (3) (Figura 2.11).

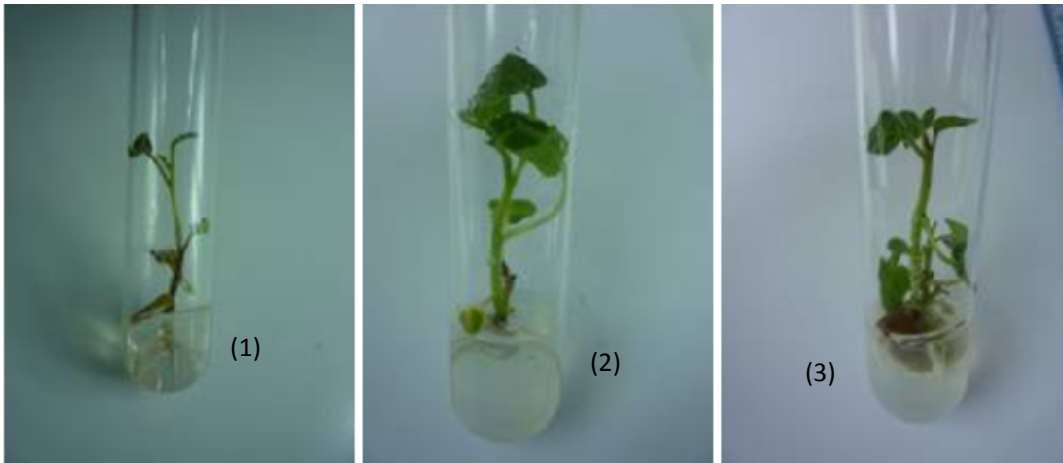


Figura 2.11 Clasificación visual de tallos según su grosor. 1. Delgado. 2. Grosura mediana (presenta ramificaciones axilares y hojas). 3. Grueso (presenta ramificaciones axilares, hojas y genera des diferenciación de células, aumentando su grosor)

Vigorosidad: se determina cualitativamente en tres niveles acorde a la vitalidad que presente el explante, pues existen plántulas que no estén contaminadas u oxidadas pero su introducción en el sistema de cultivo *in vitro* no produce buenos resultados, entonces su vigorosidad será baja, ya que ese explante tiende a morir; o por el contrario un explante que presente oxidación pero buena vitalidad se lo califica con una vigorosidad alta. Los niveles son vigorosidad baja uno (1); medio, dos (2) y alta, tres (3). (Figura 2.12)

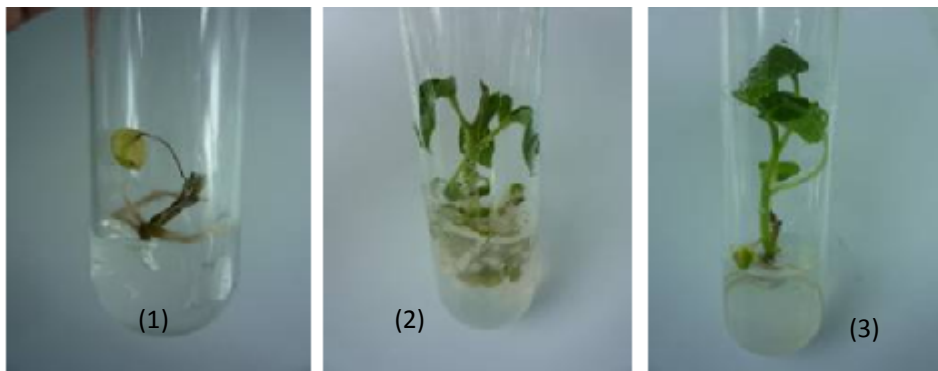


Figura 2.12 Representación gráfica de los niveles de vigorosidad (1) bajo, (2) medio y (3) alto

Evaluación: 37 días después de la siembra.

Análisis estadístico: para las variables dicotómicas se aplicó pruebas no paramétricas como el empleo de una prueba de Chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas; para el factorial con variables cuantitativas se aplicó un análisis de varianza (ADEVA) con la comparación entre tratamientos mediante una prueba de Tukey al 5%.

2.5 Etapa de Aclimatación

Con plantas desarrolladas *in vitro* por alrededor de dos meses, y después de haber evaluado todos los tratamientos se procedió a esta última fase, la cual es la culminación de la investigación, pues se determina si al final las plantas son viables para una comercialización. Se analizó la sobrevivencia de las nuevas plántulas *ex vitro*, teniendo en cuenta los tratamientos con reguladores de crecimiento de la etapa de multiplicación previa, de los cuales provienen. En esta etapa se trabajó con tierra preparada por el INIAP, la cual está constituida de 30 % pomina, 30 % humus y 40 % tierra negra de páramo, este sustrato se autoclavó por una hora, y se colocó en vasos descartables con huecos para circulación del agua de riego, se lavó las raíces de las plantas extraídas de *in vitro* y se procedió a la siembra.

VARIABLES EVALUADAS:

Sobrevivencia: evaluado con cero (0) si no sobrevivió a la etapa de aclimatación y uno (1) si sobrevivió (Figura 2.13).



Figura 2.13 Representación de plantas sobrevivientes a la etapa de aclimatación

Grosor del tallo: evaluado en tres niveles; delgado, medio y grueso. (Figura 2.11)

Altura de la planta: Medida en milímetros desde la superficie del sustrato hasta el alto de su ápice u hoja, con el uso de una regla milimetrada.

Coloración: determinado cualitativamente en tres niveles; parduzco o cloróticas uno (1); mediadamente verde, dos (2) y verde como tres (3). (Figura 2.14)

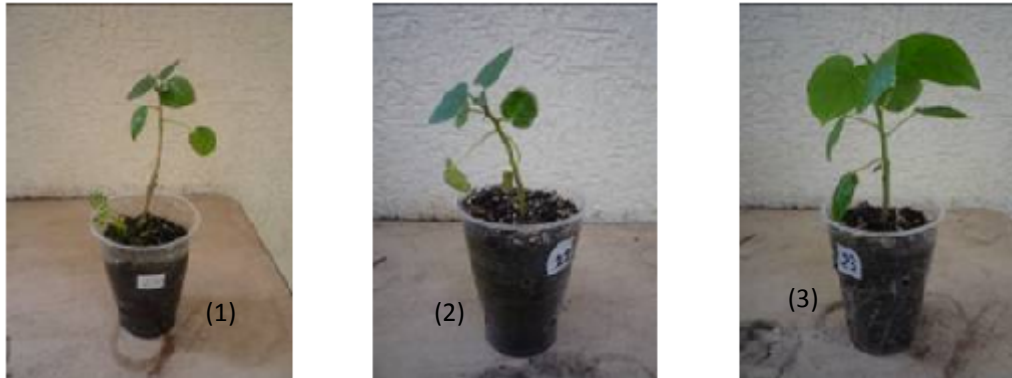


Figura 2.14 Representación gráfica de la coloración que presentaron las plantas en la etapa de aclimatación

Evaluación: 45 días después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleó una prueba de Chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas, además se realizó un análisis de varianza (ADEVA) de los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

Programa estadístico

Se empleó el programa estadístico SPSS 15.0 para el análisis de todos los datos.

