

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* A
PARTIR DE LA SEMILLA DE *Solanum caripense* Dunal, PARA LA
OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE BACTERIAS Y HONGOS**

AUTOR:

JUAN MARCELO MORALES SEGOVIA

TUTORA:

IVONNE DE LOS ÁNGELES VACA SUQUILLO

Quito, febrero del 2016

Cesión de derechos de autor

Yo, Juan Marcelo Morales Segovia, con documento de identificación N° 0502703796, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo intitulado: "ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* A PARTIR DE LA SEMILLA DE *Solanum caripense* Dunal, PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE BACTERIAS Y HONGOS", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

(f)



Juan Marcelo Morales Segovia

C.I.: 0502703796

Quito, febrero de 2016

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *in vitro* A PARTIR DE LA SEMILLA DE *Solanum caripense* Dunal, PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE BACTERIAS Y HONGOS” realizado por Juan Marcelo Morales Segovia, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero de 2016

(f) 

Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo
C.I.: 1714726906

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	4
Marco teórico	4
1.1 <i>Solanum caripense</i>	4
1.1.1 Descripción general.	4
1.1.2 Taxonomía.	5
1.1.3 Descripción morfológica.....	5
1.1.4 Distribución en Ecuador.	6
1.1.5 Usos.	7
1.1.5.1 Agronómicos.	7
1.1.5.2 Alimenticios y medicinales.	7
1.1.5.3 Ancestrales.	7
1.1.6 Propagación sexual y asexual.	8
1.1.6.1 Propagación sexual por semilla.....	8
1.1.6.2 Propagación asexual por esquejes.	8
1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de organismos vegetales	8
1.2.1 Medio de cultivo.	9
1.2.1.1 Fuente de carbono.	10
1.2.1.2 Nutrientes minerales.....	10
1.2.1.3 Vitaminas.	11
1.2.1.4 Reguladores del crecimiento.	11
1.2.1.4.1 Auxinas.	12

1.2.1.4.2 Citocininas.	14
1.2.1.4.3 Giberelinas.	15
1.2.1.4.4 Ácido abscísico.	15
1.2.1.4.5 Etileno.	16
1.2.1.5 Agente gelificante.	16
1.2.1.6 Otros compuestos.	16
1.2.1.7 pH del medio.	17
1.2.2 Agentes contaminantes.	17
1.2.2.1 El recipiente de cultivo.	17
1.2.2.2 El medio.	18
1.2.2.3 El explanto.	18
1.2.2.4 El ambiente del área de cultivo.	19
1.2.2.5 El instrumental utilizado.	19
1.2.2.6 El operador.	19
1.2.3 Agentes desinfectantes.	19
Capítulo 2	23
Metodología	23
2.1 Establecimiento de un cultivo axénico (Fase 1)	24
2.1.1 Manejo específico del experimento.	25
2.2 Multiplicación de brotes (Fase 2)	28
2.2.1 Manejo específico del experimento.	30
2.3 Enraizamiento <i>ex vitro</i> (Fase 3)	33
2.3.1 Manejo específico del experimento.	34

Capítulo 3.....	37
Resultados y Discusión	37
3.1 Recolección del material vegetal.....	37
3.2 Establecimiento de un cultivo axénico (Fase 1).....	37
3.2.1 Porcentaje de contaminación.	38
3.2.2 Porcentaje de germinación.....	40
3.2.3 Índice de germinación.....	42
3.3 Multiplicación de brotes (Fase 2).....	43
3.3.1 Porcentaje de contaminación.	43
3.3.2 Número total de brotes.....	46
3.3.3 Número de nudos.....	50
3.3.4 Formación de raíces.....	53
3.4 Enraizamiento <i>ex vitro</i> (Fase 3).....	56
3.4.1 Porcentaje de prendimiento de raíces.	56
3.4.2 Longitud de la vitroplanta.....	59
3.4.3 Porcentaje de mortalidad.	62
Conclusiones	64
Referencias	65

Índice de tablas

Tabla 1. Posición taxonómica de <i>Solanum caripense</i>	5
Tabla 2. Principales agentes desinfectantes de explantos.	20
Tabla 3. Tratamientos de desinfección aplicados a semillas de <i>Solanum caripense</i> para el establecimiento de un cultivo axénico	24
Tabla 4. Tratamientos aplicados a explantos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación.....	29
Tabla 5. Esquema ANOVA para la multiplicación de brotes de <i>Solanum caripense</i>	29
Tabla 6. Tratamientos aplicados en el enraizamiento en sustrato de plántulas de <i>Solanum caripense</i>	33
Tabla 7. Esquema ANOVA para la fase de enraizamiento en sustrato de <i>Solanum caripense</i>	34
Tabla 8. Porcentajes para la variable porcentaje de contaminación en el establecimiento de un cultivo axénico de <i>Solanum caripense</i> a los 42 días de la siembra.....	38
Tabla 9. Porcentajes para la variable porcentaje de contaminación en el establecimiento de un cultivo axénico de <i>Solanum caripense</i> a los 42 días de la siembra.....	40
Tabla 10. Índice de germinación semanal para las semillas de <i>Solanum caripense</i> durante el establecimiento de un cultivo axénico	43
Tabla 11. Porcentajes de contaminación de explantos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra	44
Tabla 12. ANOVA ($p < 0.05$) para la variable número total de brotes de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra.....	46

Tabla 13. Promedios \pm E.E. para la variable número total de brotes de <i>Solanum caripense</i> por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra	47
Tabla 14. ANOVA ($p < 0.05$) para la variable número de nudos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra	50
Tabla 15. Promedios \pm E.E. para la variable número de nudos de <i>Solanum caripense</i> por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra ..	51
Tabla 16. ANOVA ($p < 0.05$) para la variable formación de raíces de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra	53
Tabla 17. Promedios \pm E.E. para la formación de raíces de <i>Solanum caripense</i> por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra.....	54
Tabla 18. Porcentajes de mortalidad de explantos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra	55
Tabla 19. Porcentajes para la variable prendimiento de raíces de <i>Solanum caripense</i> por tratamiento aplicado en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra...	57
Tabla 20. ANOVA ($p < 0.05$) para la variable longitud de la vitroplanta de <i>Solanum caripense</i> en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra	60
Tabla 21. Promedios \pm E.E. para la variable longitud de la vitroplanta de <i>Solanum caripense</i> por tratamiento aplicado en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra	60
Tabla 22. Porcentajes de mortalidad de plántulas de <i>Solanum caripense</i> en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Frutos de <i>Solanum caripense</i> seleccionados para el establecimiento de un cultivo axénico	26
Figura 2. Introducción <i>in vitro</i> de semillas desinfectadas de <i>Solanum caripense</i>	26
Figura 3. Envases y medios para la multiplicación de brotes de <i>Solanum caripense</i>	30
Figura 4. Explantos utilizados en la multiplicación de <i>Solanum caripense</i>	31
Figura 5. Bandejas y plántulas de <i>Solanum caripense</i> utilizadas para el enraizamiento en sustrato	35
Figura 6. Paso de plántulas de <i>Solanum caripense</i> al sustrato de enraizamiento	35
Figura 7. Contaminación en el establecimiento de un cultivo axénico de <i>Solanum caripense</i>	39
Figura 8. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Solanum caripense</i>	42
Figura 9. Contaminación de explantos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación ..	45
Figura 10. Regeneración de brotes de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación	49
Figura 11. Nudos de <i>Solanum caripense</i> formados en fase de multiplicación	53
Figura 12. Raíces de <i>Solanum caripense</i> regeneradas en fase de multiplicación	55
Figura 13. Mortalidad de explantos de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación	56
Figura 14. Prendimiento de raíces de las vitroplantas de <i>Solanum caripense</i> al sustrato...	59
Figura 15. Vitroplantas de <i>Solanum caripense</i> en fase de enraizamiento en sustrato	61
Figura 16. Vitroplantas de <i>Solanum caripense</i> al inicio de la fase de enraizamiento en sustrato	63

Índice de anexos

Anexo 1. Certificado de correspondencia para la especie <i>Solanum caripense</i> Dunal	79
Anexo 2. Muestra herbaria de la especie <i>Solanum caripense</i> Dunal	80
Anexo 3. Morfología de <i>Solanum caripense</i>	81
Anexo 4. Constituyentes generales de varios medios de cultivo	82
Anexo 5. Constituyentes iónicos de varios medios de cultivo.....	83
Anexo 6. Rol de los diferentes elementos químicos importantes en fisiología vegetal...84	
Anexo 7. Resumen de las fases que componen la propagación <i>in vitro</i> de organismos vegetales.....	85
Anexo 8. Diversidad morfológica en frutos silvestres de <i>Solanum caripense</i> recolectados en Latacunga, Cotopaxi.....	86
Anexo 9. Mapa del lugar de recolección de los frutos silvestres de <i>Solanum caripense</i> .87	
Anexo 10. Longitud de raíz y tallo de las plántulas de <i>Solanum caripense</i> antes de ingresar a fase de enraizamiento en sustrato.....	88
Anexo 11. Resultados semanales para las variables evaluadas durante el establecimiento de un cultivo axénico de <i>Solanum caripense</i>	90
Anexo 12. ANOVA ($p < 0.05$) y promedios para la variable número de hojas de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra.....	91
Anexo 13. Hojas de <i>Solanum caripense</i> formadas en fase de multiplicación	91
Anexo 14. ANOVA ($p < 0.05$) y promedios para la longitud del explanto de <i>Solanum caripense</i> en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra.....	92
Anexo 15. Plántulas de <i>Solanum caripense</i> formadas en fase de multiplicación	92

Glosario de términos

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4,5-T	ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
4-Cl-AIA	ácido 4-cloroindolacético
4-CPA	ácido 4-clorofenoxiacético
2iP	2-isopentenil-adenina
ABA	ácido abscísico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
AIP	ácido indol propiónico
ANA	ácido naftilacético
BAP	bencilamino purina
cm	centímetro
Ca(ClO)₂	hipoclorito de calcio
DCA	Diseño Completamente al Azar
g	gramo
GA₃	ácido giberélico
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
HgCl₂	cloruro mercúrico
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
KIN	kinetina
l	litro

lx	lux
m	metro
M	Molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
msnm	metros sobre el nivel del mar
M&S	medio Murashige & Skoog
N	Normal
NaClO	hipoclorito de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
ANO	ácido naftoxiacético
pH	potencial hidrógeno
TDZ	thidiazurón, 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea
μ	micro
UV	ultravioleta
ZEA	zeatina
°C	grados centígrados
%	porcentaje
% (p/v)	porcentaje masa-volumen
% (v/v)	porcentaje volumen-volumen

Resumen

Se estableció un protocolo de propagación *in vitro* para *Solanum caripense* Dunal, planta silvestre de alentador interés biotecnológico debido principalmente a sus frutos comestibles, que poseen cantidades considerables de vitamina C y sacarosa, compuestos de gran importancia en la industria alimenticia. En Fase 1, las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante la aplicación de cuatro tratamientos de desinfección (TD) y sembradas durante 42 días en medio M&S, suplementado con sacarosa y carbón activado; se obtuvo los mejores resultados con el tratamiento TD1 (Alcohol 30% + NaClO 30% + H₂O₂ 7%), el cual no registró contaminación y alcanzó 92% de germinación. En Fase 2, segmentos de tallo de las semillas germinadas *in vitro* fueron subcultivados y expuestos a nueve tratamientos de multiplicación (TM) por 35 días, utilizando medio M&S suplementado con sacarosa, carbón activado y diferentes concentraciones de AIA y BAP como fitorreguladores; se obtuvo el mejor resultado de proliferación con el tratamiento TM4 (AIA 0.5 mg/l + BAP 0.5 mg/l) que produjo 8.50 brotes/explanto; mientras que, el tratamiento TM1 (AIA 0.0 mg/l + BAP 0.5 mg/l) alcanzó 13.88 nudos/explanto. En Fase 3, las plántulas formadas en la etapa de multiplicación fueron subcultivadas durante 42 días en turba conteniendo diferentes concentraciones de AIB como tratamientos de enraizamiento *ex vitro* (TE); finalmente, se observó resultados óptimos de enraizamiento, pues todos los tratamientos, T0, TE1, TE2, TE3 y TE4 (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l AIB, respectivamente), alcanzaron 100% de prendimiento radicular al sustrato.

Palabras clave: *Solanum caripense*, semillas, desinfección, multiplicación, enraizamiento *ex vitro*

Abstract

An efficient micropropagation protocol was developed for *Solanum caripense* Dunal, a native wild species with an encouraging biotechnological interest due to their edible fruits, which contain appreciable quantities of vitamin C and sucrose that represent important compounds in nutritious industry. In Stage 1, seeds were surface sterilized applying four disinfection treatments (TD), and sowed for 42 days on M&S medium supplemented with sucrose and activated charcoal; the best results were obtained from TD1 (Alcohol 30% + NaClO 30% + H₂O₂ 7%), which did not register any contamination and reached 92% of germination. During Stage 2, stem segments of *in vitro* germinated seeds were subcultured and exposed to nine multiplication treatments (TM) for 35 days, using M&S medium supplemented with sucrose, activated charcoal and different concentrations of AIA and BAP as phytohormones; the best results were induced by TM4 (AIA 0.5 mg/l + BAP 0.5 mg/l) that produced 8.50 shoots/explant, and TM1 (AIA 0.0 mg/l + BAP 0.5 mg/l) with 13.88 nodes/explant. In Stage 3, the formed plantlets from multiplication phase were subcultured for 42 days on peat containing IBA in different concentrations as *ex vitro* rooting treatments (TE); finally, there were optimal results for rooted plants because all treatments, TE0, TE1, TE2, TE3 and TE4 (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg/l IBA, respectively), achieved 100% of rooted plants.

Key words: *Solanum caripense*, seeds, disinfection, multiplication, *ex vitro* rooting

Introducción

Solanum caripense Dunal (Anexo 1), es una planta mayoritariamente silvestre, compleja y ampliamente distribuida en el Ecuador; su forma es compacta y con tendencia a producir ramas verticales, similar a la morfología del pepino dulce (*Solanum muricatum*) (Heiser, 1969), del cual parece ser su ancestro (Murray, Hammett, & Grigg, 1992), principalmente debido a las similitudes de cariotipo y la posibilidad de obtener híbridos interespecíficos fértiles (Anderson, 1979), (Heiser, 1964); se propaga naturalmente por la semilla, usualmente un fruto de *S. caripense* puede contener hasta más de 100 semillas (Anderson, 1979).

En la familia SOLANACEAE, dentro del género *Solanum* y en adición a los cultivos locales de tomate de árbol (*S. betaceum*), pepino dulce (*S. muricatum*) y naranjilla (*S. quitoense*), se reportan 28 especies con frutos comestibles; siendo *S. caripense* una de las plantas ocasionalmente manejada por sus frutos (de la Torre & otros, 2008, pág. 64). Además, Gerique afirma que los Saraguros consumen frutos de 15 especies silvestres, que crecen principalmente en pastizales y áreas afectadas consideradas como marginales (Belote, 1998); destacándose *S. caripense* por sus frutos que además son utilizados para proveer suplemento nutricional particularmente a niños (2010, p. 124).

El interés en la especie se debe a que sus frutos poseen varias características de particular importancia; así lo demuestra Nuez (2005), al determinar las cantidades de azúcares solubles y ácidos orgánicos presentes en los frutos de *S. caripense*, pues reporta que 100 g de fruto contienen 1.71 g de sacarosa. Con respecto a los ácidos orgánicos, encuentra diferencias

relevantes en el contenido de ácido ascórbico (vitamina C), registrando concentraciones de 31.1 mg para *S. caripense*. Las concentraciones reportadas por Nuez (2005), le permitieron precisar que el uso de *S. caripense* para hibridaciones con pepino dulce, favorece el mejoramiento genético y la calidad de los frutos.

Cabe recalcar que los reportes referentes a la forma de cultivo y propagación de *S. caripense* son muy escasos; es así que, en un estudio realizado sobre remanentes de vegetación en la ciudad de Quito, se percibe la disminución poblacional de ésta especie al estar presente en tan solo 2 de 10 localidades estudiadas (Delgado, 2013).

Las especies de la familia SOLANACEAE responden morfológica y genéticamente a ser cultivadas *in vitro*, cuando diferentes explantos, vegetativos o reproductivos, jóvenes, adultos o en etapa embrionaria, son micropropagados usando fitorreguladores en el medio de cultivo (Contreras & Almeida, 2003b); la importancia en la investigación de los cultivos *in vitro* de especies silvestres se centra en la obtención de plantas libres de plagas y enfermedades, destinadas al mejoramiento de los cultivos comerciales de importancia económica, pues representan una fuente deseable de variabilidad genética (Andrade Díaz & otros, 2013).

De esta manera y mediante la presente investigación, surge la posibilidad de reconocer a la propagación *in vitro* de *S. caripense*, como una de las técnicas biotecnológicas destinada a conservar, manejar y aprovechar la biodiversidad del Ecuador. Para lo cual, fueron evaluados cuatro protocolos de desinfección de semillas, con la finalidad de obtener un menor porcentaje de contaminación, así como un alto porcentaje de germinación; además,

se estimó la óptima interacción citocinina – auxina en la fase de multiplicación para originar un mayor número de brotes, y se determinó la dosis óptima de ácido indol butírico (AIB) para proporcionar un alto porcentaje de enraizamiento de plántulas utilizando turba, como sustrato de adaptación. El principal objetivo de la presente investigación pretende, mediante el establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de la semilla de *S. caripense*, obtener plantas libres de bacterias y hongos; todo esto, con propósitos de convertir a la especie en una novedosa alternativa frutícola, capaz de cubrir necesidades alimenticias no tradicionales de la población nacional e internacional.

Capítulo 1

Marco teórico

1.1 *Solanum caripense*

Solanum caripense Dunal (The Plant List, 2013), es una especie vegetal de la cual se posee pocos registros acerca de su número poblacional y requerimientos nutricionales necesarios para su preservación, manejo y aprovechamiento. Su distribución es muy amplia al igual que su variabilidad morfológica (Zuriaga, 2009), siendo catalogada como una planta de gran complejidad (Correll, 1962).

1.1.1 Descripción general.

Comúnmente denominada “tzímbalo” o “samboshuyo” según INIAP (2003, pág. 20), también posee otros nombres comunes tales como “simbailo” o “chinpalu”, sugeridos por Van den Eynden, Cueva, & Cabrera (1998, pág. 124), y por de la Torre & otros (2008, pág. 590), respectivamente. Es una hierba terrestre o bejuco nativa de Los Andes que se adapta bien a lugares húmedos de las áreas de temperatura fresca pertenecientes a zonas altas que van desde los 2200 a los 3000 msnm (de la Torre & otros, 2008, pág. 590), (Van den Eynden, Cueva, & Cabrera, 1998, pág. 124). Además, crece cerca de asentamientos humanos (Anexo 2); de modo que no puede considerarse como una planta adventicia en sentido estricto (Heiser, 1964).

1.1.2 Taxonomía.

El tzímbalo es miembro de la familia SOLANACEAE y del género *Solanum*, pertenece a la sección *Basarthrum* y se ubica en la serie *Caripensia* (Anderson & otros, 2006). La posición taxonómica de *S. caripense* se describe en la tabla 1.

Tabla 1.

Posición taxonómica de *Solanum caripense*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>caripense</i>
Nombre Científico	<i>Solanum caripense</i>

Nota: ITIS (2015).

1.1.3 Descripción morfológica. (Anexo 3)

Son pocos los reportes para la raíz de *S. caripense* (Gallardo, 2011); sin embargo, se manifiesta que podría generar un tubérculo alucinógeno (de la Torre & otros, 2008, pág. 590); principalmente, debido a que el tzímbalo es considerado como una de las especies más ampliamente distribuidas relacionada a las plantas tuberosas del género *Solanum* (Anderson, 1975).

El tzímbalo es una hierba escandente (trepadora) o erecta densamente vellosa (Van den Eynden, Cueva, & Cabrera, 1998, pág. 124), de tallos fuertes y alargados de color verde pálido con tricomas blancos (Reinoso, 2009, pág. 74); además, posee tamaño arbustivo, pudiendo ésta alcanzar hasta los 5 m de longitud y es catalogada como una planta perenne que permanece activa (Quilo, 2012, pág. 58).

Se trata de una especie con hojas alternas y pinnatinervias (Gallardo, 2011, pág. 18); de forma ovado-elípticas y pecioladas, enteras o 3-lobuladas, de hasta 12 cm de longitud, de vez en cuando con un par de folíolos minúsculos (Van den Eynden, Cueva, & Cabrera, 1998, pág. 124), ápice agudo y tricomas blancos en el envés (Reinoso, 2009, p. 74).

Posee inflorescencia axilar, flores blanco-azuladas agrupadas (Van den Eynden, Cueva, & Cabrera, 1998, pág. 124); cáliz acampanado de color verde con lóbulos lanceolados terminados en 5 dientes triangulares; corola rotada de 5 pétalos parecida a una estrella, color violáceo; y estambres con anteras amarillas (Quilo, 2012, pág. 58), (Reinoso, 2009, pág. 74), cuya producción de polen tiende a ser elevada (Herraiz & otros, 2015).

Los frutos maduros son bayas jugosas verde-amarillas con rayas longitudinales de color violáceo (Reinoso, 2009, pág. 74), forma ovoide, alcanzan hasta los 4 cm de longitud y contienen un elevado número de semillas en su interior (Van den Eynden, Cueva, & Cabrera, 1998, pág. 124). Tal descripción de los frutos de *S. caripense* también es corroborada por Herraiz & otros (2015).

1.1.4 Distribución en Ecuador.

El tzímalo es una planta que puede ser localizada dentro del territorio ecuatoriano en provincias como Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Pichincha, Sucumbíos, Tungurahua y Zamora Chinchipe (Jørgensen & León Yáñez, 1999, pág. 911).

1.1.5 Usos.

La especie *S. caripense* y sus distintas partes pueden ser usadas de varias formas y para diferentes fines, a continuación se mencionan los principales.

1.1.5.1 Agronómicos.

Es la planta que globalmente presenta menos diferencias de cariotipo con *S. muricatum*, por lo que se cruzan dando híbridos con meiosis regular y fértiles, destinados a la mejora de la calidad de los frutos (Anderson, 1979).

1.1.5.2 Alimenticios y medicinales.

Los frutos son comestibles, calman la sed (de la Torre & otros, 2008, pág. 590), también son usados como cuajo en la elaboración de queso (INIAP, 2003, pág. 27), para quitar manchas y pecas de la piel (Peñañiel, 2003, pág. 44), y para tratar dolores de garganta, gripe y diarrea en niños (Quilo, 2012, pág. 58). Además, la planta es útil para el resfrío, después de hervirla con agua e ingerirla, expulsa el frío del cuerpo de igual forma que lo hace la canela (Gallardo, 2011, p. 18).

1.1.5.3 Ancestrales.

De acuerdo a de la Torre & otros (2008, pág. 590), la planta de tzímbalo puede ser usada con diferentes propósitos sociales, los cuales se han manifestado a lo largo de distintas etnias de ciertas provincias del Ecuador tales como Pichincha, Cotopaxi, Bolívar y Chimborazo. Los frutos se usan en ceremonias curativas, con éstos se elaboran collares que los indígenas colocan en sus hijos tiernos para curarlos del “espanto”; se dice que, el tubérculo tiene efecto alucinógeno; la planta junto con otras, se usan para realizar limpiezas;

además, la infusión de hojas se usa en baños de buena suerte y las semillas trituradas se colocan en la cara para curar el “mal de aire” proveniente de las carreteras.

1.1.6 Propagación sexual y asexual.

Para la propagación de *S. caripense* se consideran dos formas, una sexual a través de la semilla y otra asexual mediante esquejes.

1.1.6.1 Propagación sexual por semilla.

Como se mencionó anteriormente, el tzímbalo se propaga naturalmente por la semilla, que junto a otras semillas más, usualmente llegan a superar las 100 unidades por fruto (Anderson, 1979); de modo que, una disminución en el porcentaje de germinación, no es tan crítica como lo fuese en especies cultivadas (Prohens, Soler, & Nuez, 1999).

1.1.6.2 Propagación asexual por esquejes.

Gallardo (2011), menciona el uso de esquejes leñosos y semileñosos de tzímbalo con 2 o más nudos y de 8 a 15 cm de longitud, obtenidos de ramas lignificadas del tercio bajo o basal de plantas madre con características de vigorosidad, o de ramas no lignificadas del tercio medio o alto, respectivamente; los cuales son plantados bajo invernadero en tres sustratos previamente desinfectados por solarización, cada uno compuesto por la mezcla de arena, pomina y tierra negra en diferentes porcentajes.

1.2 Cultivo *in vitro* de organismos vegetales

También conocido como cultivo de tejidos, se basa en la totipotencialidad celular, entendida como “la capacidad que tiene una célula para regenerar a partir de ella, todos

los diferentes tipos de células que componen un organismo multicelular” (Pérez J. F., 2006, pág. 12). Experimentalmente, consiste en el aislamiento de explantos (protoplastos, células, tejidos u órganos), su posterior desinfección y siembra en un medio nutritivo, y el suministro artificial de condiciones ambientales en cámaras de crecimiento acondicionadas para proporcionar temperaturas comprendidas entre 20 y 28 °C, iluminación ajustada de 1000 a 5000 lux y humedad relativa entre 70 y 80% (Roca & Mroginski, 1992a, pág. 5). Es decir, abarca un conjunto de técnicas que requieren desarrollarse en laboratorio bajo condiciones estrictas de asepsia (Roca & Mroginski, 1992a, pág. 20).

El cultivo de tejidos es una herramienta, que permite propagar grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Los cultivos *in vitro* también son utilizados en la obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma y estudios relacionados con ingeniería genética (Seguí, 2010, pág. 294); representado así, la posibilidad de hacer viable el “uso de técnicas de ADN recombinante en la mejora vegetal” (Casal & otros (Eds.), 2010, pág. 49).

Los términos propagación *in vitro* y micropropagación, son usados para referirse al establecimiento, multiplicación y subsiguiente enraizamiento de brotes (Capuana & Giannini, 1997).

1.2.1 Medio de cultivo.

El material vegetal puede ser cultivado en medios semisólidos que contienen agentes gelificantes o en medios líquidos. La selección del tipo medio dependerá del tipo de

cultivo y su objetivo (Sathyanarayana, 2007, pág. 30). La mayoría de los medios son de composición conocida (Anexo 4), estando constituidos básicamente por una fuente de carbono, nutrientes minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, agente gelificante y, en algunos casos, otros compuestos asociados (Seabrook, 1980).

1.2.1.1 Fuente de carbono.

Generalmente las células iniciales de un cultivo no son activas fotosintéticamente y requieren de una o más fuentes de carbono. Sacarosa y glucosa en concentraciones de 2 a 5% (p/v) son los carbohidratos más usados en el cultivo *in vitro* de organismos vegetales (Smith, 2000, pág. 50). También pueden ser usados otros compuestos como lactosa, galactosa, maltosa, fructosa y almidón (Saad & Elshahed, 2012).

1.2.1.2 Nutrientes minerales.

La concentración total de sales minerales en un medio de cultivo se conoce como su fuerza iónica total (McCown & Sellmer, 1987). Las sales son disueltas en agua y experimentan disociación e ionización (Anexo 5); de manera que, “los factores activos dentro del medio de cultivo son los diferentes tipos de iones que se generan, más no lo son sus constituyentes” (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 42).

Nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), calcio (Ca), potasio (K) y magnesio (Mg) son elementos que el medio requiere en cantidades superiores a $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, estos son los denominados macroelementos; mientras que, los microelementos hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), boro (B) y molibdeno (Mo), son aquellos necesarios en pequeñas proporciones, menores a $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (de Fossard, 1976). La significancia

fisiológica de los nutrientes (Anexo 6) se basa en la capacidad, que tienen los elementos minerales para influenciar cambios en la turgencia celular y la permeabilidad de las membranas biológicas, así como la de participar en diferentes reacciones catalíticas, entre otras (Duca, 2015, págs. 152,153). La óptima concentración, así como el tipo de cada nutriente para alcanzar los niveles máximos en el crecimiento de los explantos, varían según la especie (Saad & Elshahed, 2012).

1.2.1.3 Vitaminas.

La tiamina (B1) es considerada importante para las células vegetales; otras vitaminas como el ácido nicotínico o niacina (B3) y la piridoxina (B6), también son añadidas al medio, ya que pueden mejorar la respuesta celular (Smith, 2000, pág. 49). La tiamina es añadida al medio en concentraciones de 0.1 a 10.0 mg/l, además es necesaria y requerida por todas las células durante su crecimiento (Ohira, Makoto, & Ojima, 1976). El ácido nicotínico es usado en concentraciones de 0.1 a 5.0 mg/l, mientras que la piridoxina es utilizada en cantidades de 0.1 a 10.0 mg/l (Saad & Elshahed, 2012).

La vitamina E es usada como antioxidante; por su parte, la vitamina C previene el ennegrecimiento de los explantos; la vitamina D es aplicada por su efecto regulador sobre el crecimiento; y la riboflavina inhibe la formación de callos y mejora tanto el crecimiento como la calidad de los brotes (Drew & Smith, 1986).

1.2.1.4 Reguladores del crecimiento.

También conocidos como fitohormonas o fitorreguladores, son sustancias naturales o sintéticas que regulan la respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y

humedad, ayudando así a coordinar procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Doemer, 2000), (Wain, 1980); son frecuentemente utilizados en cultivos *in vitro*, pues asumen labores de vital importancia en procesos de elongación, tropismos y dominancia apical (Skoog & Miller, 1957); es necesario agregar al medio una o más fitohormonas para sustentar el desarrollo de tejidos y órganos, generalmente auxinas, citocininas y giberelinas son las más añadidas (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48).

A continuación se detallan las principales fitohormonas:

1.2.1.4.1 Auxinas.

“Las auxinas a menudo son utilizadas en cultivos *in vitro* para promover división celular y proliferación de raíces”, principalmente debido a que están involucradas en la formación de meristemas (George, Hall, & De Klerk, 2008, pág. 175). Además, junto a citocininas, son capaces de inducir el crecimiento de callo, suspensiones celulares y órganos (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48).

Las auxinas naturales más comunes son el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), el ácido fenilacético (AFA) y el ácido indol propiónico (AIP) (Saad & Elshahed, 2012), (Ludwig-Müller & Cohen, 2002). El AIA es la principal auxina de las plantas superiores, la más abundante a pesar de presentarse comúnmente en concentraciones nanomolares, y fisiológicamente la más relevante; el AIB fue clasificado inicialmente como auxina sintética, pero es un compuesto endógeno de la planta, más eficiente que el AIA en promover formación de raíces laterales y es usado comercialmente con dicho propósito (Jordán & Casaretto, 2006); “el AIA y el

AIB son extensamente utilizados para enraizamiento, y en interacción con una citocinina, para proliferación de brotes” (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48).

Existen otras sustancias con actividad auxínica, pero de origen sintético, que generalmente son utilizadas como herbicidas, pues poseen capacidad para funcionar como inhibidores cuando se hallan en altas concentraciones (Duca, 2015, pág. 206); entre éstas se encuentran el ácido naftoxi acético (ANO), el ácido naftalen acético (ANA), el ácido 2-4-diclorofenoxi acético (2,4-D), el ácido 3-6-dicloro-2-metoxi benzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3-5-6-tricloro picolínico (picloram) (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48); también existen otras como el ácido triclorofenoxi acético (2,4,5-T) y el ácido para-clorofenoxi acético o 4-clorofenoxi acético (p-CPA, 4-CPA) (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010, pág. 22). Además, algunas son usadas en procesos de enraizamiento, obtención de partenocarpia, cambio de sexo, entre otros (Duca, 2015, pág. 206).

Las auxinas son compuestos con actividades biológicamente similares a las del AIA; entre las cuales se encuentran la capacidad de promover elongación celular en coleóptilo y secciones de tallo, división celular de callos en presencia de citocininas, formación de raíces adventicias en hojas y tallos, y otras (Taiz & Zeiger, 2006, pág. 812); circulan principalmente a través del floema y parénquima de forma polar y en dirección basípeta, a una velocidad de 10 a 20 mm/h; el transporte requiere de energía y puede ser bloqueado por presencia de alcaloides o falta de oxígeno (Duca, 2015, pág. 204).

Las auxinas son usualmente diluidas en etanol o hidróxido de sodio (NaOH) (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48); por lo general, el AIA y el 2-4-D son disueltos en un pequeño

volumen de alcohol etílico al 95% (v/v); el ANA, el 2-4-D y el AIA pueden ser diluidos en una pequeña cantidad de NaOH 1.0 N. Además, es recomendado preparar soluciones frescas de AIA para el medio, pues tan solo pueden ser almacenadas en contenedores ámbar a 4 °C, por no más de una semana (Saad & Elshahed, 2012).

1.2.1.4.2 Citocininas.

En cultivos *in vitro* son incorporadas al medio con propósitos de generar división celular y diferenciación de brotes adventicios a partir de callos y órganos (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 48). También han sido probadas retardando la formación de raíces (Saad & Elshahed, 2012). Entre las citocininas comúnmente utilizadas se encuentran la 6-bencil aminopurina (BAP), la 6-dimetil aminopurina (2iP), la N-2-furanilmetil-1-H-purina-6-amina (KIN), la 6-4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenil aminopurina (ZEA, zeatina) y la 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea (TDZ, thidiazuron). ZEA y 2iP son naturales, siendo la zeatina más efectiva (Saad & Elshahed, 2012).

Las citocininas son compuestos derivados de la base adenina, que en su posición N6 muestra algunas sustituciones (Jordán & Casaretto, 2006); la actividad funcional de éstos reguladores del crecimiento ocurre en presencia de auxinas (Duca, 2015, pág. 210). Semillas verdes y tejidos meristemáticos, principalmente los meristemos apicales de la raíz, son ricos en síntesis de citocininas; desde allí, el transporte es pasivo y ascendente, con flujo en dirección acrópeta (Duca, 2015, pág. 211).

La disolución de las citocininas se facilita con la adición de unas cuantas gotas de HCl o NaOH 1.0 N; para TDZ, el solvente utilizado puede ser el dimetilsulfóxido (DMSO), ya que no daña el tejido vegetal y actúa como agente esterilizante (Saad & Elshahed, 2012).

1.2.1.4.3 Giberelinas.

Las giberelinas son un amplio grupo de compuestos relacionados que, “a diferencia de las auxinas, se definen más por su estructura química que por su actividad biológica”; con frecuencia son asociadas a la promoción del crecimiento del tallo (Taiz & Zeiger, 2006, pág. 881); deben su nombre al hongo *Gibberella fujikuroi*, del cual fueron identificadas por primera vez (Jordán & Casaretto, 2006). Químicamente son moléculas diterpenoides tetracíclicas, de entre las cuales el ácido giberélico (GA₃) es considerado como la giberelina más activa (Duca, 2015, pág. 207).

Las giberelinas recorren los flujos floemático y xilemático a una velocidad de 5 a 20 mm/h, se mueven de forma similar a metabolitos orgánicos y se acumulan en áreas de crecimiento (Duca, 2015, pág. 207). El GA₃ es fácilmente soluble en agua fría (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 49).

1.2.1.4.4 Ácido abscísico.

Hormona que fue primeramente designada como responsable de la abscisión en hojas; posteriormente, se demostró que el ácido abscísico (ABA) interviene de forma esencial controlando el desarrollo del embrión, induciendo su reposo e inhibiendo el crecimiento vegetativo (Barceló Coll & otros, 2001, pág. 370).

El ABA es frecuentemente requerido para un normal crecimiento y desarrollo de embriones somáticos, y solo en su presencia éstos pueden asemejarse a embriones zigóticos (Ammirato, 1988); además, puede producir la “inhibición del crecimiento de los cultivos de callo y de tallo” (Pérez J. F., 2006, pág. 82).

1.2.1.4.5 Etileno.

Es una hormona en estado gaseoso que estimula la germinación de semillas, inhibe el crecimiento de tallos y raíces, controla procesos de maduración y senescencia, y es producida en respuesta a situaciones de estrés (Barceló Coll & otros, 2001, pág. 363); también se produce en el medio cuando sus constituyentes orgánicos son expuestos a calor, oxidación, luz solar o radiación ionizante (Matthys, Gielis, & Debergh, 1995). El etileno puede promover o inhibir un mismo proceso cuando se trata con especies diferentes (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 49).

1.2.1.5 Agente gelificante.

La propiedad principal en un agente gelificante es la resistencia a la esterilización por autoclavado; los agentes comúnmente utilizados en el cultivo *in vitro* de organismos vegetales son agar, agarosa, Gelrite y Phytigel (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 49).

1.2.1.6 Otros compuestos.

Para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por oxidación de polifenoles presentes en los explantos, en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes como la L-cisteína, el ácido ascórbico y la polivinilpirrolidona. El carbón activado (0.1 - 5.0%)

suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010, pág. 22).

1.2.1.7 pH del medio.

El pH es un factor que interviene en aspectos importantes como la solubilidad de las sales, la disponibilidad de nutrientes y la gelificación adecuada del medio (Sathyanarayana, 2007, pág. 41). El pH del medio es generalmente ajustado, antes de ser autoclavado, a valores comprendidos entre 5.5 y 6.0; el cambio en el valor de pH se logra añadiendo pequeñas cantidades de diluciones preparadas, principalmente de NaOH o HCl, a concentraciones 0.1 o 1.0 N (Smith, 2000, pág. 54). Un medio de cultivo con pH inferior a 5.5 no gelifica apropiadamente, uno con pH superior a 6.0 es demasiado firme (Murashige, 1973).

1.2.2 Agentes contaminantes.

La contaminación de los cultivos puede ocurrir en cualquier instante durante el proceso de introducción, principalmente es generada por transferencia de esporas a través del aire o contacto con superficies esterilizadas de forma incorrecta (Sathyanarayana, 2007, pág. 62); los microorganismos patógenos generalmente aparecen de 3 a 5 días después de la introducción (Torres, 2012, pág. 54). Los principales agentes que intervienen en la contaminación se nombran a continuación.

1.2.2.1 El recipiente de cultivo.

El aire en los recipientes de cultivo debe estar libre de gérmenes, para lo cual son esterilizados mediante autoclavado; además, son “sellados mediante tapas especiales que

impiden la contaminación del interior y permiten un adecuado intercambio gaseoso” (Pérez J. F., 2006, pág. 53).

1.2.2.2 El medio.

Entre el 2 y 5% de los medios de cultivo se contaminan durante la manipulación manual después del autoclavado (Leifert, Morris, & Waites, 1994). Más aún, ciertas especies del género *Bacillus* han mostrado sobrevivir al autoclavado del medio, después de ser expuestas a presión y temperaturas comprendidas entre 110 y 120 °C, durante 20 minutos; por tales motivos, es recomendable almacenar los medios preparados por varios días antes de ocuparlos (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 27).

Antes de esterilizar el medio es fundamental tener en cuenta su composición; algunos contienen sustancias termolábiles que requieren procedimientos especiales de esterilización como la filtración por membrana (Bhojwani & Razdan, 1996, págs. 27,28). Tal aseveración también es apoyada por Pérez J. F. (2006, pág. 54).

1.2.2.3 El explanto.

Los contaminantes que lleva el explanto sobre su superficie se pueden eliminar mediante agentes desinfectantes; aquellos que se encuentran dentro de los tejidos son difíciles de eliminar y son neutralizados con la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio. Tratamientos con temperaturas de 35 a 40 °C para las plantas donantes, también son utilizados para la obtención de explantos libres de bacterias y hongos sistémicos (Roca & Mroginski, 1992a, pág. 9).

1.2.2.4 El ambiente del área de cultivo.

El aire, donde se realiza la siembra también tiene que ser estéril; las manipulaciones del material vegetal se realizan dentro de cámaras de flujo laminar, las cuales permiten mantener en su interior estrictas condiciones de asepsia (Pérez J. F., 2006, pág. 53), y permiten además utilizar luz ultravioleta (UV) para una mejor esterilización de las superficies, la cual interviene en la replicación del ADN de los agentes contaminantes causando su muerte (Sathyanarayana, 2007, pág. 60).

1.2.2.5 El instrumental utilizado.

Es aconsejable trabajar con varios juegos, previamente esterilizados, de los mismos instrumentos (pinzas, bisturís, cucharillas, entre otros) y mantener su respectiva asepsia colocándolos en alcohol etílico al 70% de 2 a 3 minutos y flameándolos luego cuidadosamente (Roca & Mroginski, 1992b, pág. 11).

1.2.2.6 El operador.

Al ser el operador una fuente primaria de contaminación, es necesario que se lave las manos con abundante agua y jabón, y enjaguárselas con alcohol al 70% antes de iniciar el cultivo; además, el uso de batas de laboratorio, máscaras, protectores de cabello y guantes limpios, reducen la contaminación (Roca & Mroginski, 1992b, pág. 11).

1.2.3 Agentes desinfectantes.

Varios agentes desinfectantes son usados para esterilizar las superficies de los explantos (Tabla 2), las cuales representan un amplio hábitat para contaminantes microbiológicos;

por lo tanto, los tejidos deben ser esterilizados entera y superficialmente antes de ser plantados en el medio nutritivo (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 30).

Tabla 2.

Principales agentes desinfectantes de explantos

Agente desinfectante	Concentración (%)	Duración (min)	Efectividad
Hipoclorito de calcio	9-10	5-30	Muy bueno
Hipoclorito de sodio	20	5-30	Muy bueno
Peróxido de hidrógeno	10-12	5-15	Bueno
Agua bromada	1-2	2-10	Muy bueno
Nitrato de plata	1	5-30	Bueno
Cloruro de mercurio	0.1-1	2-10	Satisfactorio
Antibióticos	4-50 mg/l	30-60	Bastante bueno

Nota: Yeoman & Macleod, citado en Bhojwani & Razdan (1996).

Dependiendo de la naturaleza de los explantos, se puede iniciar la esterilización superficial a través de la inmersión en alcohol etílico (etanol) al 70% (v/v) de 20 a 60 segundos, seguido de las demás sustancias desinfectantes (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010, pág. 19); el uso de alcohol isopropílico también es mencionado por Bhojwani & Razdan (1996, pág. 31).

El hipoclorito cálcico también es usado durante 5 a 30 minutos (Smith, 2000, pág. 71), utilizando concentraciones comprendidas entre 1 y 6% (p/v), dependiendo de la naturaleza del material a desinfectar; además el $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ penetra más lentamente los tejidos y es menos tóxico que el hipoclorito sódico (Pérez J. F., 2006, pág. 59).

El hipoclorito sódico es la lejía comercial, generalmente diluida hasta una concentración entre 5 y 25% (v/v); el tratamiento con NaOCl se aplica durante 5 a 30 minutos, seguido de

varios enjuagues con agua destilada estéril (Smith, 2000, pág. 71), ya que existen plantas muy sensibles a este agente (Pérez J. F., 2006, pág. 59).

El peróxido de hidrógeno es un antioxidante usado de 1 a 30 minutos en concentraciones de 3 a 10% (v/v); la interacción entre H_2O_2 y NaOCl es tóxica para los tejidos, por ello es importante enjuagar minuciosamente los explantos, después de cada procedimiento (Smith, 2000, pág. 72). El H_2O_2 ejerce su actividad antimicrobiana al oxidar los componentes celulares de los microbios, de modo que es considerado como un desinfectante eficaz (Tortora, Funke, & Case, 2007, pág. 205).

El cloruro de mercurio generalmente se aplica en concentraciones de 0.1 a 1.0% (p/v) durante 2 a 10 minutos (Pérez J. F., 2006, pág. 59). Es altamente efectivo para la esterilización superficial, pero es tremendamente tóxico; hojas y células de plantas herbáceas son desinfectadas con $HgCl_2$ al 0.1% (p/v) durante 1 a 3 minutos, segmentos nodales y apicales de plantas madereras por 8 a 10 minutos, y semillas durante 10 a 20 minutos (Iliev & otros, 2010).

Los antibióticos frecuentemente usados para la eliminación de microorganismos son la gentamicina y la ampicilina en soluciones comprendidas entre 50 y 100 mg/l durante 30 minutos; además, pueden ser aún más benéficos después de la desinfección con alcohol o cloro (Smith, 2000, pág. 72).

La adición del detergente sorbitán polioxietileno monolaurato (Tween-20) (0.01 – 0.1%) a las sustancias desinfectantes o el uso de unas gotas de Triton (Mroginski, Sansberro, &

Flaschland, 2010, pág. 20), puede mejorar la efectividad de esterilización rompiendo la tensión superficial entre el agua y el explanto (Torres, 2012, pág. 54).

1.2.4 Propagación *in vitro*.

La propagación *in vitro* es la herramienta comercial, para la regeneración de plantas a partir de órganos, tejidos, células o protoplastos. Además, sirve como un prerrequisito en programas de mejoramiento vegetal; pues, antes de obtener una planta completa a partir de un explanto modificado genéticamente y capaz de generar otras nuevas, es necesario establecer un protocolo viable de propagación *in vitro* para la especie de interés (Sathyanarayana, 2007, pág. 79).

Las fases que componen la propagación *in vitro* pueden resumirse en (Anexo 7): establecimiento o inicio de un cultivo axénico (Iliev & otros, 2010), multiplicación de brotes, su subsecuente enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas generadas al ambiente externo (Castillo, 2004).

Capítulo 2

Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en la Universidad Politécnica Salesiana, Campus El Girón, Quito, Ecuador.

Primero se recolectaron varios frutos silvestres de *S. caripense* (Anexo 8) en el barrio Taniloma, perteneciente a la parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, a una altitud de 2717 msnm, latitud 0° 58' 19'' S y longitud 78° 36' 52'' O (Anexo 9); temperatura media anual de 14.5 °C, precipitación media de 488 mm/año (Herrera, 2011, pág. 92); y humedad relativa de 70% (Chimba, 2012, pág. 34).

El material vegetal inicial consistió en un total de 1200 semillas, considerando los buenos porcentajes de germinación reportados por Prohens, Soler, & Nuez (1999), junto a los obtenidos en ensayos de germinación realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en la Universidad Politécnica Salesiana.

El desarrollo del trabajo experimental dentro del laboratorio abarcó las siguientes fases:

- Establecimiento de un cultivo axénico (Fase 1)

- Multiplicación de brotes (Fase 2)

- Enraizamiento *ex vitro* (Fase 3)

2.1 Establecimiento de un cultivo axénico (Fase 1)

En Fase 1 se seleccionaron frutos de tzímalo, que presentaron color verde-amarillo intenso, tamaño promedio de 2 cm, sin abolladuras y con características de vigorosidad; además, fueron lavados con agua y jabón para eliminar posibles contaminantes, como tierra y restos vegetales, y almacenados en un recipiente de vidrio, dentro de una nevera, hasta dar inicio a los tratamientos de desinfección de sus semillas, como se mira a continuación.

Tabla 3

Tratamientos de desinfección aplicados a semillas de *Solanum caripense* para el establecimiento de un cultivo axénico

Tratamiento Desinfección (TD)	Descripción	Referencia Bibliográfica
TD1	Alcohol 30% → 10 min Hipoclorito de sodio (NaClO) 30% → 10 min Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) 7% → 8 min Lavados con agua destilada estéril	(Cavusoglu & Sulusoglu, 2013).
TD2	Alcohol 70% con Tween-20 0.1% → 30 s Hipoclorito de sodio (NaClO) 20% → 10 min Lavados con agua destilada estéril	(Santana & Angarita, 1997).
TD3	Alcohol 70% → 3 min Hipoclorito de sodio (NaClO) 2.5% con Tween-20 0.1% → 15 min Lavados con agua destilada estéril	(Borrero, 2007).
TD4	Alcohol 30% → 5 min Hipoclorito de sodio (NaClO) 0.8% → 10 min Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) 4% → 5 min Lavados con agua destilada estéril	(Cavusoglu & Sulusoglu, 2013). (Prohens, Soler, & Nuez, 1999).

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Posteriormente, las semillas fueron sembradas en medio M&S (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 3.0% (p/v) y carbón activado 0.05% (p/v), pH ajustado a 5.8 y previamente autoclavado a 121 °C durante 20 minutos; seguidamente, fueron trasladadas al cuarto de incubación de ambiente controlado, con luz blanca fría

proveniente de dos lámparas fluorescentes, fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura media de 24 ± 2 °C; en esta fase los explantos permanecieron durante 42 días.

La unidad experimental para la Fase 1 consistió en un tubo de ensayo de 15 cm de longitud y 1.6 cm de diámetro, conteniendo 13 ml de medio y una semilla de *S. caripense*. Los tratamientos se dispusieron bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 50 repeticiones.

Las variables fueron registradas cada 7 días, durante 6 semanas. Para los porcentajes de contaminación y germinación se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia y, se estimó una relación porcentual frente al número total de semillas evaluadas por tratamiento de desinfección. También, se calculó el índice de germinación mediante la siguiente fórmula, para cada tratamiento (Nerson & Paris, 1988): $IG = (S_1T_1 + S_2T_2 + \dots S_nT_n) / (S_1 + S_2 + \dots S_n)$; donde: S es el número de semillas germinadas y T es el tiempo de incubación en días (Loy & Evensen, 1979).

2.1.1 Manejo específico del experimento.

En la cámara de flujo laminar se extrajeron las semillas de los frutos seleccionados (Figura 1a) y fueron sometidas a un pretratamiento, que consistió en la inmersión en una solución de agua destilada estéril con Tween-20 al 1%, durante 35 minutos con repetidas agitaciones, con el propósito de retirar los residuos de pulpa de la superficie. A continuación, las semillas fueron esterilizadas (Figura 1b) utilizando los cuatro tratamientos de desinfección propuestos en la tabla 3.

Frutos de *Solanum caripense* seleccionados para el establecimiento de un cultivo axénico

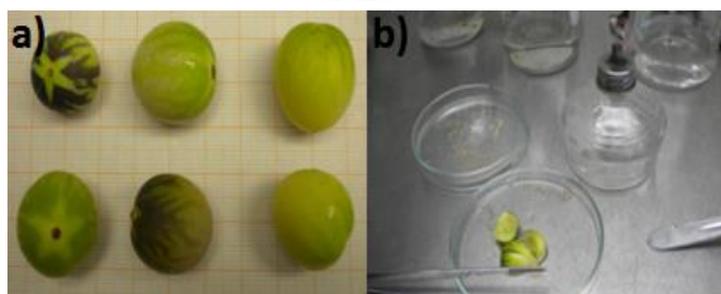


Figura 1. a) Frutos maduros, b) Esterilización de las semillas en cámara de flujo
Elaborado por: J. Morales, 2015

El mecanismo establecido para la desinfección consistió en sumergir las semillas en los diferentes agentes desinfectantes, los cuales fueron dispensados en cajas Petri; además, las semillas fueron agitadas repetidamente durante la aplicación de cada agente desinfectante para lograr una esterilidad superficial homogénea, lavadas varias veces con agua destilada estéril, cultivadas al azar y ubicadas en el cuarto de incubación de ambiente controlado (Figura 2).

Introducción *in vitro* de semillas desinfectadas de *Solanum caripense*

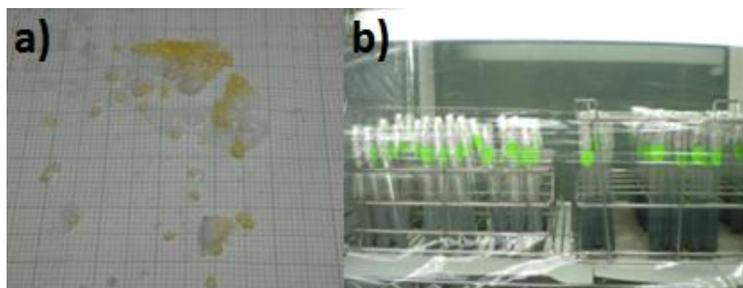


Figura 2. a) Semillas secas y desinfectadas, b) Incubación bajo condiciones ambientales controladas
Elaborado por: J. Morales, 2015

Cada tratamiento de desinfección fue ejecutado de la siguiente manera:

a) Tratamiento de Desinfección 1 (TD1). Se inició colocando las semillas en alcohol al 30% (v/v) durante 10 minutos, para después continuar en NaClO al 30% (v/v) durante 10

minutos y culminar en H₂O₂ al 7% (v/v) durante 8 minutos; además, tres enjuagues con agua destilada estéril fueron realizados después de la aplicación de cada agente desinfectante. Para sustentar el TD1 de este trabajo experimental, se tomó como referencia a Cavusoglu y Sulusoglu (2013), quienes utilizaron como explantos hojas jóvenes en crecimiento y brotes laterales de pepino dulce (*S. muricatum*); la concentración y el tiempo de aplicación de los agentes desinfectantes en el tratamiento TD1 fueron elegidos por la ausencia de contaminación y el buen porcentaje de sobrevivencia en la propagación *in vitro* de *S. muricatum*.

b) Tratamiento de Desinfección 2 (TD2). Se tomó como referencia a Santana y Angarita (1997), quienes utilizaron como material inicial las semillas provenientes de frutos maduros tipo exportación de uvilla (*Physalis peruviana*), las cuales fueron desinfectadas superficialmente con una solución de etanol al 70% (v/v) con 0.1% de Tween-20 por 30 segundos, NaOCl 20% (v/v) durante 10 minutos y varios lavados con agua destilada estéril; el procedimiento de esterilización para el tratamiento TD2 fue el mismo que en la regeneración adventicia de somaclones de *P. peruviana*, debido al uso del mismo material vegetal inicial (la semilla).

c) Tratamiento de Desinfección 3 (TD3). Se usó como referencia el trabajo desarrollado por Borrero (2007), en dónde se desinfectaron semillas de cinco variedades de tomate de árbol (*S. betaceum*) con alcohol al 70% (v/v) durante 3 minutos, para después lavarlas con agua destilada estéril. Posteriormente se transfirieron a NaClO 2.5% (v/v) con 4 gotas de Tween-20, durante 15 minutos. Para finalizar, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. La concentración y el tiempo de aplicación de los agentes desinfectantes en el

tratamiento TD3, así como los lavados con agua destilada estéril, fueron iguales a los recomendados para la desinfección de semillas de *S. betaceum* debido a los altos porcentajes de germinación reportados.

d) Tratamiento de Desinfección 4 (TD4). Es un protocolo modificado y conjugado de Cavusoglu & Sulusoglu (2013), y Prohens, Soler, & Nuez (1999); en el cual se combinó el uso de alcohol al 30% (v/v) durante 5 minutos, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril; después se utilizó NaClO 0.8% (v/v) durante 10 minutos más 3 lavados con agua destilada estéril; y finalmente se aplicó H₂O₂ al 4% (v/v) durante 5 minutos y 3 últimos lavados con agua destilada estéril.

2.2 Multiplicación de brotes (Fase 2)

Como explantos para la Fase 2 fueron escogidos segmentos de tallo provenientes de las semillas germinadas *in vitro* de *S. caripense* en la Fase 1, y subcultivados en medio M&S suplementado con sacarosa 3.0% (p/v), carbón activado al 0.05% (p/v) y diferentes concentraciones de BAP y AIA correspondientes a los tratamientos de multiplicación (Tabla 4), pH ajustado a 5.8 y autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, los explantos fueron trasladados al cuarto de incubación de ambiente controlado; en esta fase los explantos permanecieron durante 35 días.

Tabla 4

Tratamientos aplicados a explantos de *Solanum caripense* en fase de multiplicación

Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Referencia Bibliográfica
TM0	0.0	0.0	
TM1	0.5	0.0	(Rahman & otros, 2011).
TM2	1.0	0.0	(Cavusoglu & Sulusoglu, 2013).
TM3	0.0	0.5	(Karadag, Yildirim, & Tekdal, 2013).
TM4	0.5	0.5	(Contreras & Almeida, 2003b).
TM5	1.0	0.5	(Cavusoglu & Sulusoglu, 2013) (Sheeba, Palanivel, & Parvathi, 2015).
TM6	0.0	2.0	(Contreras & Almeida, 2003b) (Karadag, Yildirim, & Tekdal, 2013).
TM7	0.5	2.0	(Contreras & Almeida, 2003b) (Ramar, 2014).
TM8	1.0	2.0	(Contreras & Almeida, 2003b) (Rahman & otros, 2011).

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

La unidad experimental para la Fase 2 consistió en un vaso plástico con volumen de 1 litro, conteniendo 75 ml de medio de cultivo y dos explantos de *S. caripense*. Los tratamientos de multiplicación corresponden a un Diseño factorial 3 x 3, con 14 repeticiones por tratamiento. Los datos fueron analizados por ANOVA ($p < 0.05$) (Tabla 5) y las medias fueron comparadas usando la prueba de Duncan.

Tabla 5

Esquema ANOVA para la multiplicación de brotes de *Solanum caripense*

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (GL)
Total	105
Tratamientos Multiplicación (TM)	8
BAP	2
AIA	2
Error experimental	97

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Las variables fueron registradas cada 7 días, durante 5 semanas. Para los porcentajes de contaminación y mortalidad se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia, y se estimó una relación porcentual frente al número total de explantos evaluados por tratamiento de

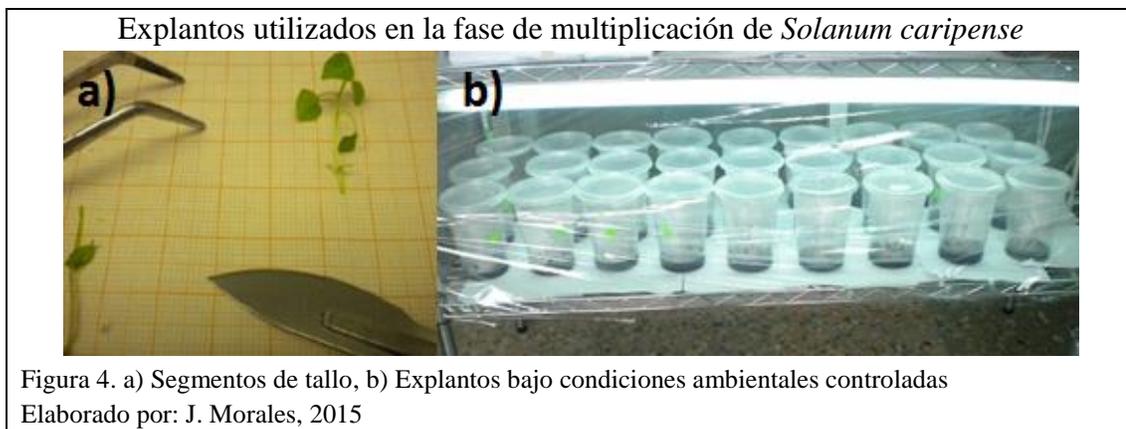
multiplicación. El número total de brotes y el número de nudos fueron contabilizados mediante observación visual. Finalmente, para la formación de raíces se calificó con 0 la ausencia total de raíces, con 1 la presencia de las mismas y con 2 la presencia de raíces adventicias en la parte aérea de los tallos.

2.2.1 Manejo específico del experimento.

Los vasos plásticos fueron esterilizados en autoclave (Figura 3a), inmediatamente después en cámara de flujo, se dispensaron los medios de cultivo según los tratamientos de multiplicación (Figura 3b).



En el laboratorio, todos los tratamientos de multiplicación fueron ejecutados sobre segmentos de tallo de semillas germinadas *in vitro* de *S. caripense* (Figura 4a); se eligió al azar explantos sin contaminación, de 2 cm de longitud con 2 a 4 hojas, los cuales fueron escindidos con bisturí estéril, subcultivados con la ayuda de pinzas estériles en el medio de cultivo correspondiente y colocados en el cuarto de incubación de ambiente controlado (Figura 4b).



A continuación se detallan los tratamientos empleados en la multiplicación de brotes:

a) Tratamiento de Multiplicación 0 (TM0). Correspondiente al tratamiento testigo, BAP 0.0 mg/l y AIA 0.0 mg/l.

b) Tratamiento de Multiplicación 1 (TM1). Empleó la combinación fitohormonal de BAP 0.5 mg/l y AIA 0.0 mg/l; se utilizó como referencia la micropropagación masiva de *Solanum surattense* realizada por Rahman & otros (2011), utilizando medio M&S suplementado con sacarosa al 3 % (p/v), BAP 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l, y kinetina 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l sola o en combinación con ANA 0.1 y 0.2 mg/l.

c) Tratamiento de Multiplicación 2 (TM2). Empleó la combinación fitohormonal de BAP 1.0 mg/l y AIA 0.0 mg/l. Se tomó como referencia a Cavusoglu & Sulusoglu (2013), quienes proponen el medio M&S suplementado con BAP 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg/l para la regeneración de brotes de pepino dulce (*S. muricatum*).

d) Tratamiento de Multiplicación 3 (TM3). Utilizó la combinación fitohormonal de BAP 0.0 mg/l y AIA 0.5 mg/l; fueron tomados como referencia Karadag, Yildirim, & Tekdal (2013), en su estudio sobre regeneración de plantas a partir de segmentos nodales de papa (*Solanum tuberosum*), se hace uso de tratamientos combinados en medio M&S suplementado con diferentes concentraciones de ANA (0.2 y 0.5 mg/l), BAP (0.2 y 0.5 mg/l), kinetina (0.2 y 0.5 mg/l) y AIA (0.2 y 0.5 mg/l).

e) Tratamiento de Multiplicación 4 (TM4). Utilizó la combinación fitohormonal de BAP 0.5 mg/l y AIA 0.5 mg/l; como referencia fue tomado el estudio sobre la propagación *in vitro* del tomatillo (*Physalis ixocarpa*) realizado por Contreras y Almeida (2003), en el cual utilizaron medio M&S con vitaminas como inositol 100 mg/l, ácido nicotínico 0.5 mg/l, glicina 2.0 mg/l, entre otras, y fitohormonas como zeatina sola 0.0 a 2.0 mg/l y la combinación de AIA con BAP en concentraciones de 0.0 a 0.5 mg/l y 0.0 a 2.0 mg/l, respectivamente.

f) Tratamiento de Multiplicación 5 (TM5). Empleó la combinación fitohormonal de BAP 1.0 mg/l y AIA 0.5 mg/l; como referencias se utilizaron los estudios de Cavusoglu & Sulusoglu (2013), y el realizado en *Physalis minima* utilizando un medio suplementado con BAP y AIA en varias concentraciones (Sheeba, Palanivel, & Parvathi, 2015).

g) Tratamiento de Multiplicación 6 (TM6). Empleó la combinación fitohormonal de BAP 0.0 mg/l y AIA 2.0 mg/l; la referencia usada fue el estudio de Contreras & Almeida (2003); también se tomó en cuenta a Karadag, Yildirim, & Tekdal (2013).

h) Tratamiento de Multiplicación 7 (TM7). Utilizó la combinación fitohormonal de BAP 0.5 mg/l y AIA 2.0 mg/l; las referencias fueron tomadas de Contreras & Almeida (2003b); también de la micropropagación de *P. peruviana* utilizando BAP en concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/l (Ramar, 2014).

i) Tratamiento de Multiplicación 8 (TM8). Utilizó la combinación fitohormonal de BAP 1.0 mg/l y AIA 2.0 mg/l; las referencias fueron tomadas de Contreras & Almeida (2003b); también de Rahman & otros (2011).

2.3 Enraizamiento *ex vitro* (Fase 3)

Las plántulas de *S. caripense* obtenidas *in vitro* en la Fase 2, fueron adaptadas a sustrato. El trasplante se realizó lo más rápido posible para evitar la deshidratación de las vitroplantas, desde los contenedores con medio de cultivo hasta los alveolos de las bandejas plásticas, que contenían turba autoclavada PRO MIX PGX y diferentes concentraciones de la auxina AIB, correspondientes a los tratamientos de enraizamiento en sustrato (Tabla 6). Posteriormente, las plántulas fueron trasladadas al cuarto de incubación de ambiente controlado, ahí permanecieron durante 42 días.

Tabla 6

Tratamientos aplicados en el enraizamiento en sustrato de plántulas de *Solanum caripense*

Tratamiento Enraizamiento (TE)	AIB (mg/l)	Referencia Bibliográfica
TE0	0.0	
TE1	0.5	(Cavusoglu & Sulusoglu, 2013). (Jordán & Casaretto, 2006).
TE2	1.0	
TE3	2.0	
TE4	3.0	

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

La unidad experimental para la Fase 3 consistió en un alveolo de bandeja plástica, conteniendo aproximadamente 25 g de turba PRO MIX PGX, auxina AIB a distintas concentraciones y una plántula de *S. caripense*. Los tratamientos de enraizamiento corresponden a un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 5 tratamientos y 16 repeticiones para cada uno de ellos. Los datos fueron analizados por ANOVA ($p < 0.05$) (Tabla 7) y las medias fueron comparadas usando la prueba de Duncan.

Tabla 7

Esquema ANOVA para la fase de enraizamiento en sustrato de *Solanum caripense*

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (GL)
Total	77
Tratamientos de Enraizamiento (TE)	4
Error experimental	73

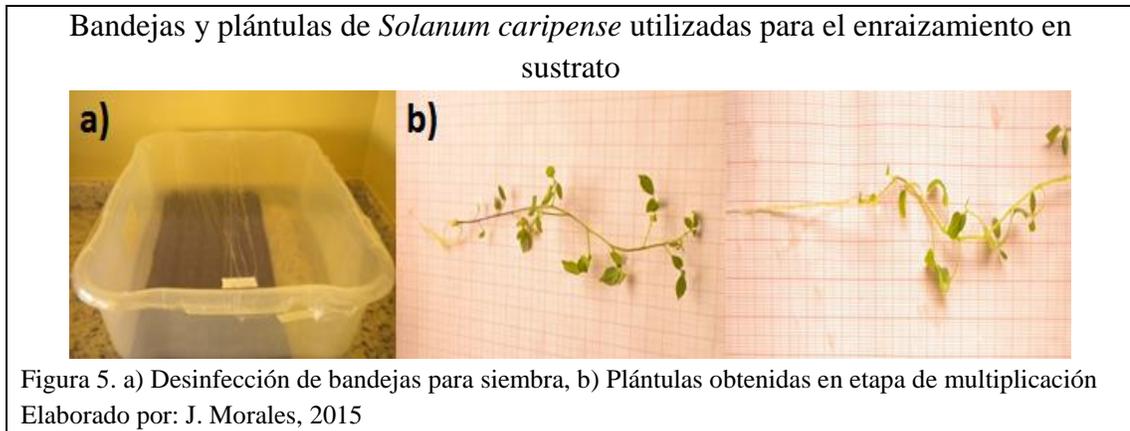
Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Las variables fueron registradas cada 7 días, durante 6 semanas. Para los porcentajes de prendimiento de raíz y mortalidad se calificó con 0 la ausencia y con 1 la presencia, y se estimó una relación porcentual frente al número total de plántulas evaluadas por tratamiento de enraizamiento. La longitud de la vitroplanta fue determinada desde la base del tallo hasta el ápice más alto con la ayuda de una regla milimetrada.

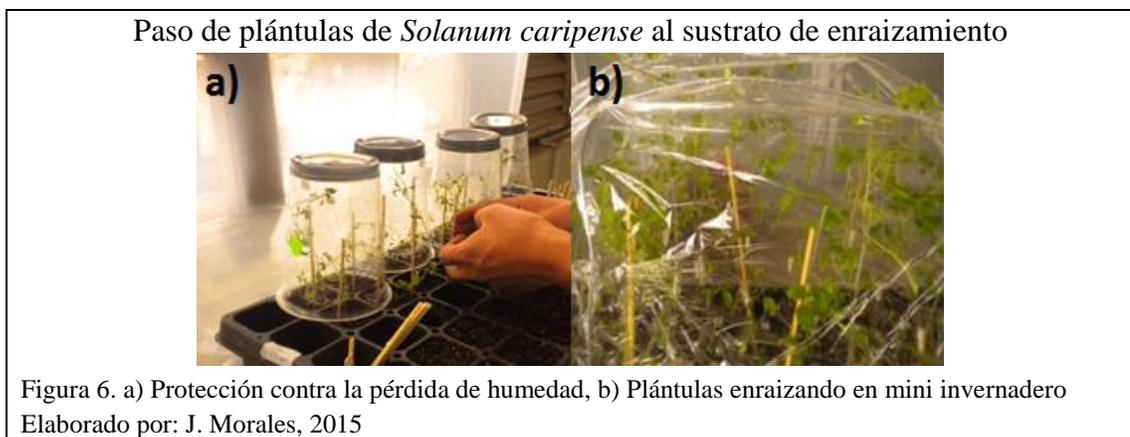
2.3.1 Manejo específico del experimento.

Las bandejas para el subcultivo de plántulas de *S. caripense* fueron previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 días antes de ser utilizadas (Figura 5a). Todos los tratamientos de enraizamiento en sustrato fueron ejecutados sobre plántulas de *S. caripense* libres de patógenos, provenientes de la Fase 2 (Figura 5b), cuya longitud de tallo varió entre 16.36 y 20.63 cm, y la longitud de raíces

entre 7.86 y 11.16 cm (Anexo 10), las cuales fueron distribuidas al azar para los tratamientos y colocadas en el cuarto de incubación de ambiente controlado.



Durante la adaptación y enraizamiento en sustrato de las plántulas de *S. caripense*, fue necesario cubrirlas con plástico para evitar la pérdida de humedad y posterior muerte de los organismos vegetales por desecación (Figura 6) (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010). También se aplicaron riegos con agua destilada estéril y, a partir de la cuarta semana, se empezó a realizar pequeñas perforaciones en los plásticos de las estructuras formadas con el propósito de bajar gradualmente la humedad relativa y aclimatar las vitroplantas al ambiente exterior (Loc & Kiet, 2011).



En total fueron cinco tratamientos de enraizamiento en sustrato, los cuales se muestran en la tabla 6. El tratamiento TM0 fue el testigo; mientras que TM1, TM2, TM3 y TM4 fueron planteados tomando como referencia el trabajo de Cavusoglu & Sulusoglu (2013), quienes utilizaron AIB 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l en medio M&S para enraizar explantos de *S. muricatum*, obteniendo buenos porcentajes de enraizamiento. Además, se menciona que el AIB es más eficiente que el AIA en promover la formación de raíces laterales y es usado comercialmente con dicho propósito (Jordán & Casaretto, 2006).

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1 Recolección del material vegetal

Los frutos silvestres de *S. caripense* fueron recolectados en el barrio Taniloma, perteneciente a la parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, debido a la mayor accesibilidad de la especie, lejos de áreas altamente intervenidas por el hombre. Además, un estudio realizado en remanentes de vegetación alrededor de las parroquias de la ciudad de Quito, asegura que la especie está presente en tan solo 2 de 10 localidades estudiadas, Casitahua y Sigsipamba, ubicadas a 3282 y 2813 msnm, ambas parroquias cercanas a la zona seca al noreste de Quito y relativamente retiradas de la ciudad, dónde la actividad antropogénica es menor (Delgado, 2013). De tal modo, se confirma que los reportes referentes a la forma de cultivo y propagación de tzímalo son muy escasos; la expansión y evolución humana a través del tiempo, junto a la disminución de las tierras cultivables, han provocado una reducción en el número de las especies a nivel nacional, por consiguiente, se impide una revelación de datos acertados sobre el número poblacional (Vaca, 2014).

3.2 Establecimiento de un cultivo axénico (Fase 1)

Casi cualquier tejido u órgano de la planta puede ser usado como explanto; sin embargo, el éxito depende del sistema elegido, la especie y la remoción de contaminantes superficiales de los explantos. El principal objetivo de esta fase es obtener un alto porcentaje de explantos libres de patógenos, para lo cual generalmente se hace uso de sustancias desinfectantes (Torres, 2012, pág. 53). No obstante, el ambiente generado en el interior de los recipientes contenedores resulta propicio para la proliferación de

microorganismos, los cuales pueden provocar la pérdida de los cultivos, que en laboratorios dedicados a la propagación *in vitro* de organismos vegetales se encuentra en alrededor del 10% (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010, pág. 19).

3.2.1 Porcentaje de contaminación.

Los resultados del porcentaje de contaminación para los tratamientos empleados en la esterilización superficial de las semillas de *S. caripense* de la presente investigación, se presentan a continuación.

Tabla 8

Porcentaje de contaminación en el establecimiento de un cultivo axénico de *Solanum caripense* a los 42 días de la siembra

Contaminación (%)		
Tratamiento Desinfección (TD)	Bacterias	Hongos
TD1 Alcohol 30% → 10 min + NaClO 30% → 10 min + H ₂ O ₂ 7% → 8 min	0.00	0.00
TD2 Alcohol 70% con Tween-20 0.1% → 30 s + NaClO 20% → 10 min	2.00	0.00
TD3 Alcohol 70% → 3 min + NaClO 2.5% con Tween-20 0.1% → 15 min	2.00	2.00
TD4 Alcohol 30% → 5 min + NaClO 0.8% → 10 min + H ₂ O ₂ 4% → 5 min	0.00	0.00

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Los porcentajes de contaminación de todos los tratamientos de desinfección en la Fase 1 (TD1, TD2, TD3 y TD4), no alcanzaron el 10% planteado como aceptable por Mroginski, Sansberro, & Flaschland (2010, pág. 19); así se demuestra que los tratamientos aplicados a las semillas de *S. caripense*, junto a una buena esterilización de los medios y los recipientes escogidos, y la correcta operatividad durante el proceso, optimizaron la esterilidad superficial de los explantos.

En los tratamientos TD1 y TD4 se utilizó como uno de los agentes desinfectantes al peróxido de hidrógeno, el cual resulta eficaz para la esterilización superficial de los explantos al oxidar los componentes celulares de los microorganismos (Tortora, Funke, & Case, 2007, pág. 205).

Los porcentajes de infección microbiana y sobrevivencia reportados por Cavusoglu y Sulusoglu (2013), para hojas jóvenes y brotes laterales de *S. muricatum* al utilizar alcohol entre 5 y 70% (v/v) durante 5 a 30 minutos, NaOCl entre 20 y 70% (v/v) durante 1 a 45 minutos y H₂O₂ entre 4 y 8% (v/v) durante 5 a 10 minutos, fueron similares a los obtenidos en la presente investigación para todos los tratamientos y las concentraciones escogidas; pues los porcentajes de contaminación, tanto bacteriana como fúngica, de las semillas de *S. caripense* no superaron el 2% (Figura 7). Incluso, concentraciones más bajas de NaOCl (2.5 y 0.8%) como las reportadas por Borrero (2007), y Prohens, Soler, & Nuez (1999), para las especies *S. betaceum* y *S. caripense*, también resultaron ser aptas para una desinfección satisfactoria.



3.2.2 Porcentaje de germinación

Los resultados del porcentaje de germinación para los tratamientos empleados en la esterilización superficial de las semillas de *S. caripense*, se presentan la tabla 9.

Tabla 9

Porcentaje de germinación en el establecimiento de un cultivo axénico de *Solanum caripense* a los 42 días de la siembra

Tratamiento Desinfección (TD)	Germinación (%)
TD1 Alcohol 30% → 10 min + NaClO 30% → 10 min + H ₂ O ₂ 7% → 8 min	92.00
TD2 Alcohol 70% con Tween-20 0.1% → 30 s + NaClO 20% → 10 min	64.00
TD3 Alcohol 70% → 3 min + NaClO 2.5% con Tween-20 0.1% → 15 min	56.00
TD4 Alcohol 30% → 5 min + NaClO 0.8% → 10 min + H ₂ O ₂ 4% → 5 min	54.00

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

En la presente investigación, se registró el 92% de germinación para semillas de *S. caripense* en el tratamiento TD1 a los 42 días después de la siembra, el cual utilizó la concentración más alta de hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, así como el mayor tiempo de protocolo (total 28 min) durante el proceso de esterilización. La germinación se pudo ver favorecida porque el hipoclorito de sodio actúa en la permeabilidad y otras propiedades de la cubierta seminal de las semillas facilitando la germinación, probablemente a causa de una mejora en el proceso de absorción de agua (Hsiao & Quick, 1984). Mientras que, el peróxido de hidrógeno es capaz de ablandar la cubierta de algunas semillas (especialmente forestales) y aumentar la permeabilidad del agua y oxígeno (Barnett, 1998), facilitando la conversión de grasas a carbohidratos, los cuales promueven la activación de reacciones enzimáticas para la movilización de componentes celulares que están involucrados en el desarrollo de la radícula (Willan,

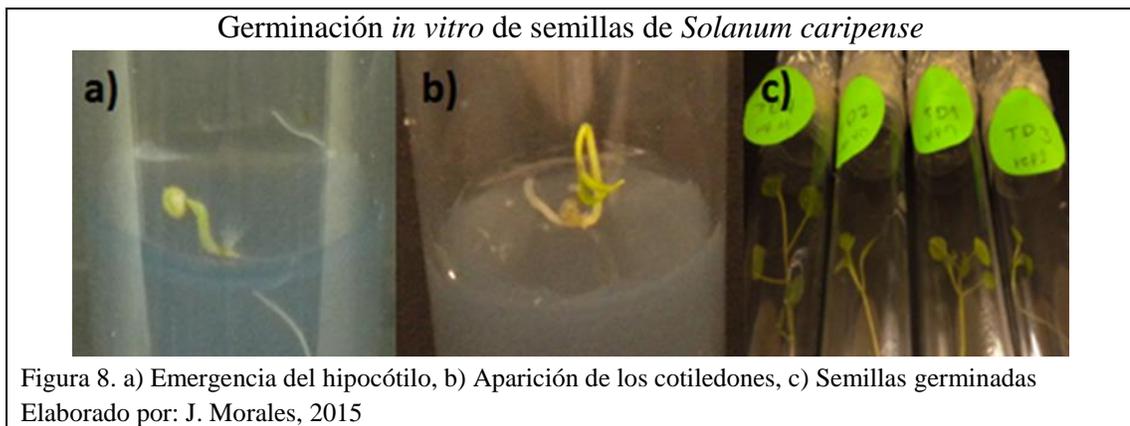
1991). Además se encontró que el periodo para dar paso a la germinación de las semillas de *S. caripense* se ajustó a lo mencionado por Ibrahim & otros (2001), que es de 6 semanas para varias especies silvestres del género *Solanum*.

Para el resto de tratamientos TD2, TD3 y TD4, los porcentajes de germinación de las semillas de *S. caripense* rodearon el 50% a los 30 días (Anexo 11), periodo similar a lo obtenido por Ibrahim & otros en las especies *S. surattense*, *S. integrifolium* y *S. sanitwongsei* (2001), y Joshua en *S. incanum* (1978). De hecho, en la toma de datos de la segunda semana los tratamientos TD1, TD2 y TD4, ya habían alcanzado porcentajes de germinación entre 40 y 54% (Anexo 11); tal condición puede usarse para descartar la presencia de dormancia primaria en las semillas de *S. caripense* de la presente investigación (Bithell & otros, 2002), así como los porcentajes de germinación reportados por Prohens, Soler, & Nuez (1999).

Para la presente investigación no fue necesario un proceso de escarificación química para ablandar el tegumento seminal y facilitar la emergencia de la radícula, contrario a lo mencionado por Black, Bewley, & Halmer (2006, pág. 284); corroborado por Cabrera, Dottori, & Cosa (2010). De modo que, las semillas de *S. caripense* permanecen aparentemente alejadas de presentar letargo físico y bajos porcentajes de germinación (Figura 8), distinto a lo mencionado por Ibrahim & otros para las especies *S. khasianum*, *S. torvum* y *S. indicum* (2001), y Taab para *S. nigrum* (2009). Además, en caso de haberse prolongado el periodo de evaluación a 10 semanas, tal como lo reporta (Borrero, 2007), los porcentajes de germinación para semillas de *S. caripense* pudieron haberse

incrementado en cada tratamiento, pues se observó la germinación (no registrada) de varias repeticiones después de la sexta semana.

Cárdenas, Zuluaga, & Lobo (2004), señalan la ausencia de letargo físico en semillas de *S. quitoense* y *S. betaceum*, lo que concuerda con el presente estudio. Así, también lo demuestra un estudio de micropropagación de plántulas a partir de semillas de 5 variedades de tomate de árbol (*S. betaceum*), las cuales fueron desinfectadas con alcohol al 70% (v/v) durante 3 minutos y NaClO al 2.5% (v/v) con 4 gotas de Tween-20 durante 15 minutos, para después de 10 semanas obtener los mejores porcentajes de germinación en las variedades Puntón y Redondo con 92 y 83%, respectivamente (Borrero, 2007).



3.2.3 Índice de germinación.

El índice de germinación está entendido como el número medio de días requeridos para la emergencia de la radícula (Cabrera, Dottori, & Cosa, 2010); una semilla puede considerarse germinada cuando la radícula supera 1 mm de longitud fuera de su cubierta (Prohens, Soler, & Nuez, 1999). El índice de germinación calculado para la presente investigación (Tabla 10) demuestra que son necesarios cerca de 30 días para que ocurra

la emergencia radicular de las semillas de *S. caripense* en los tratamientos TD1, TD2, TD3 y TD4 (Anexo 11) con un índice de germinación promedio de 27.95 días (semana 6); similar a lo reportado por Ibrahim & otros (2001), y Joshua (1978), dónde se menciona que semillas de *S. surattense*, *S.integrifolium*, *S. sanitwongsei* y *S. incanum* germinan lentamente y rodean un 50% de germinación en un promedio de 30 días.

Tabla 10

Índice de germinación semanal para las semillas de *Solanum caripense* durante el establecimiento de un cultivo axénico

Índice de germinación (días)						
Tratamiento de desinfección (TD)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
TD1	7	12.11	16.23	20.34	24.28	28.55
TD2	0	14	17.89	21.5	25.26	29.41
TD3	7	10.61	14.29	18.03	22.83	27.30
TD4	7	11.6	15.42	19.06	22.64	26.54
Promedio	5.25	12.08	15.96	19.73	23.75	27.95

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

3.3 Multiplicación de brotes (Fase 2)

Es importante que las semillas germinadas *in vitro* hayan sido esterilizadas adecuadamente, pues el tejido regenerado debe mantener las mismas condiciones de esterilidad al momento de ingresar a la etapa de multiplicación (Borrero, 2007).

3.3.1 Porcentaje de contaminación.

Segmentos estériles de tallo provenientes de las semillas germinadas *in vitro* de *S. caripense*, fueron subcultivados bajo similares condiciones de asepsia que en la etapa anterior y ubicados en el cuarto de incubación de ambiente controlado durante 35 días; sin

embargo, el porcentaje promedio del total de los tratamientos contaminados incrementó a 12.70% para bacterias y 6.35% para hongos, como se puede ver a continuación.

Tabla 11

Porcentajes de contaminación de explantos de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

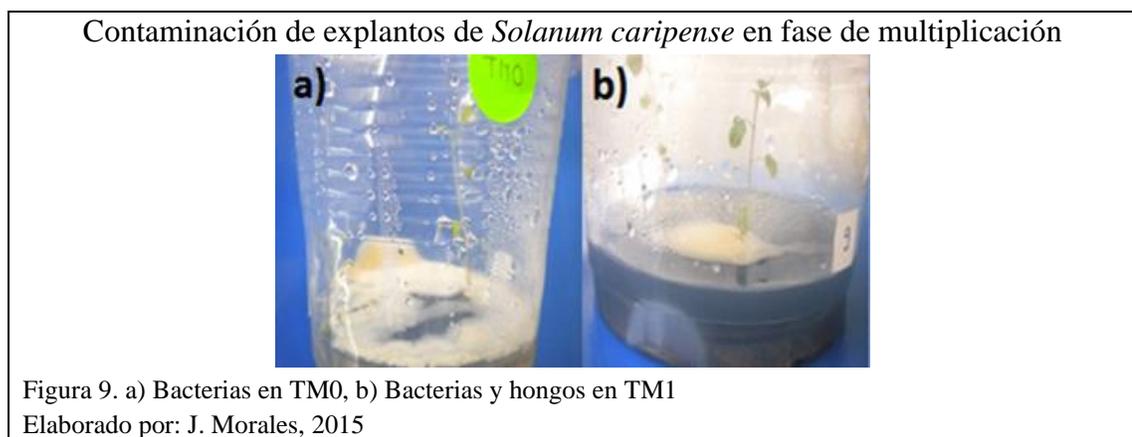
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Explantos contaminados	Contaminación bacteriana (%)	Contaminación fúngica (%)
TM0	0.0	0.0	6/14	42.86	0.00
TM1	0.5	0.0	6/14	28.57	28.57
TM2	1.0	0.0	0/14	0.00	0.00
TM3	0.0	0.5	0/14	0.00	0.00
TM4	0.5	0.5	0/14	0.00	0.00
TM5	1.0	0.5	2/14	0.00	14.29
TM6	0.0	2.0	2/14	14.29	14.29
TM7	0.5	2.0	0/14	0.00	0.00
TM8	1.0	2.0	4/14	28.57	0.00
Contaminación			Total = 20/126	$\bar{x} = 12.70$	$\bar{x} = 6.35$

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

La contaminación bacteriana en la Fase 2 sobrepasa el 10% aceptable mencionado por Mroginski, Sansberro, & Flaschland (2010, pág. 19). Se presume que la contaminación en los tratamientos TM0, TM1, TM6 y TM8 (Figura 9a), fue ocasionada por bacterias endógenas (latentes) asociadas al explanto, las cuales aparecen por lo general en las fases de multiplicación y enraizamiento (Alvarado, 2000), después de permanecer largos periodos de tiempo sin expresarse (Cassells, 1991); algunas pertenecen a los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, entre otros (Leifert, Waites, & Nicholas, 1989); similar a lo mencionado por Madoff (1981).

Con respecto a la contaminación fúngica en los tratamientos TM1, TM5 y TM6 (Figura 9b), se puede manifestar que ciertos hongos del suelo y pertenecientes a los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium* pueden contaminar los explantos dentro del cuarto de incubación donde ocurre el intercambio gaseoso entre los frascos y el medio externo, principalmente debido a la presencia de ácaros, trips u hormigas que actúan como vectores de esparcimiento de la contaminación (George E. F., 1993), (Pérez J. N., 1998). Por tanto, se puede suponer que la contaminación en la Fase 2 de la presente investigación, también pudo haberse originado por especies fúngicas introducidas al cuarto de incubación; por tanto, resulta siempre necesaria la limpieza continua de las instalaciones para reducir la carga microbiana del ambiente.

Además, Alvarado menciona que la contaminación de los cultivos se presenta como un problema multicausal (2000). De este modo, también se presume que la contaminación en la Fase 2 no fue provocada por falta de asepsia en los explantos de *S. caripense*, sino que pudo deberse a una inadecuada esterilización de los medios según Sathyanarayana (2007, pág. 51), o a una técnica desordenada por parte del operador al subcultivar los explantos (Torres, 2012, pág. 54).



3.3.2 Número total de brotes.

El análisis de la varianza para la variable número total de brotes de *S. caripense* en la Fase 2 de la presente investigación transcurridos 35 días (Tabla 12), no detectó significancia estadística para los tratamientos de multiplicación ($p = 0.0535$), tampoco para la concentración de BAP ($p = 0.3623$); sí lo hizo para la concentración de AIA ($p = 0.0356$); el coeficiente de variación fue 30.88 para esta variable.

Tabla 12

ANOVA ($p < 0.05$) para la variable número total de brotes de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Número total de brotes			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	p-valor
Total	105		
Tratamiento Multiplicación (TM)	8	9.48	0.0535
BAP	2	4.85	0.3623
AIA	2	16.30	0.0356
Error experimental	97	4.72	CV = 30.88

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Las concentraciones de AIA reportaron diferencias significativas, por lo que se presenta además las comparaciones de los promedios usando la prueba Duncan, como se puede apreciar a continuación:

Tabla 13

Promedios \pm E.E. para la variable número total de brotes de *Solanum caripense* por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Número total de brotes			
Fitohormona	Concentración		Media \pm E.E.
BAP (mg/l)	0.0		6.84 \pm 0.38
	0.5		7.46 \pm 0.37
	1.0		6.78 \pm 0.37
AIA (mg/l)	0.0		7.55 \pm 0.41 b
	0.5		7.29 \pm 0.34 b
	2.0		6.24 \pm 0.37 a
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Media \pm E.E.
TM0	0.0	0.0	7.13 \pm 0.77
TM1	0.5	0.0	7.75 \pm 0.77
TM2	1.0	0.0	7.79 \pm 0.58
TM3	0.0	0.5	7.21 \pm 0.58
TM4	0.5	0.5	8.50 \pm 0.58
TM5	1.0	0.5	6.17 \pm 0.63
TM6	0.0	2.0	6.17 \pm 0.63
TM7	0.5	2.0	6.14 \pm 0.58
TM8	1.0	2.0	6.40 \pm 0.69

Nota: Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0.05). Elaborado por J. Morales, 2015

En la presente investigación la auxina AIA presentó diferencias significativas, se obtuvo el mayor número de brotes de *S. caripense* sin la fitohormona y con dosis de 0.5 mg/l, con promedios de 7.55 y 7.29 brotes/explanto, respectivamente. Y el menor número de brotes con los tratamientos TM6 (2.0 mg/l AIA), TM7 (0.5 mg/l BAP y 2.0 mg/l AIA) y TM8 (1.0 mg/l BAP y 2.0 mg/l AIA), los cuales generaron 6.17, 6.14 y 6.40 brotes/explanto al emplear la concentración más alta AIA, incluso al estar acompañados de una citocinina (Tabla 13). Estos resultados se relacionan a los obtenidos en la multiplicación de brotes de *S. tuberosum* por Karadag, Yildirim, & Tekdal (2013), al utilizar 0.2 mg/l AIA se alcanza 44% de brotación, porcentaje que se reduce a 33% al incrementar la concentración de AIA a 0.5 mg/l y al combinar los tratamientos con dosis altas de una citocinina. De esta

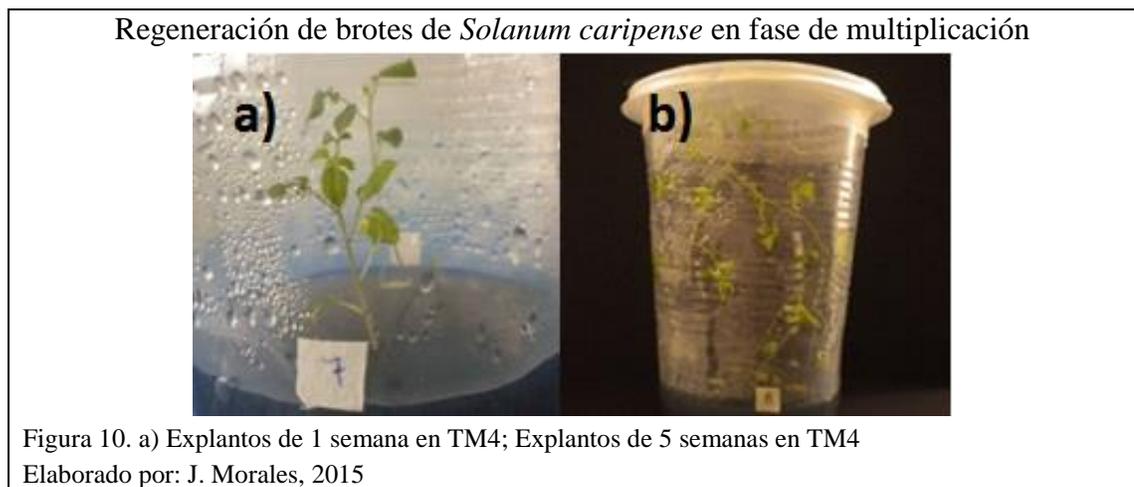
manera, se puede manifestar que las concentraciones de AIA mayores a 0.5 mg/l tienden a disminuir la multiplicación de brotes de *S. caripense* (TM 6), en ocasiones incluso si van acompañadas de dosis altas de BAP (TM5 y TM8).

Por otra parte, en la presente investigación se obtuvo el mayor valor numérico de brotes de *S. caripense* con el tratamiento TM4, correspondiente a la interacción fitohormonal de 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA, con 8.50 brotes/explanto (Figura 10); dicho tratamiento produjo un efecto sinérgico que permitió alcanzar el mayor número de brotes. Diferentes especies de la familia SOLANACEAE han sido propagadas *in vitro*, obteniéndose resultados variados en la etapa de multiplicación, la cual oscila entre 4 semanas; se puede comparar el efecto sinérgico resultante de la combinación entre BAP (0.5 - 3.0 mg/l) y AIA (1.5 y 2.0 mg/l) en la proliferación de brotes de *Withania somnifera* reportado por Tata & otros (2011), el obtenido en la multiplicación de *Solanum nigrum* utilizando concentraciones de BAP (3.0 – 8.0 mg/l) y AIA (0.5 mg/l) (Pandhure, 2010), o el alcanzado en *P. minima* cuando segmentos nodales fueron cultivados en medio suplementado con BAP (1.0 – 5.0 mg/l) y AIA (0.25 mg/l) (Sheeba, Palanivel, & Parvathi, 2015), y por último el efecto sinérgico que produjo *P. ixocarpa* a partir de hipocótilos en presencia de BAP 2.0 mg/l y AIA 0.5 mg/l (Contreras & Almeida, 2003b), los cuales provocaron las mejores respuestas en la etapa de proliferación; similar a la sinergia ocurrida en la multiplicación de brotes de *S. caripense* de la presente investigación.

El tratamiento TM1 (0.5 mg/l BAP) obtuvo 7.75 brotes/explanto y el TM2 (1.0 mg/l BAP) obtuvo 7.79 brotes/explanto. Los resultados de ambos tratamientos sobrepasan a los reportados en la multiplicación de brotes de *S. muricatum* por Cavusoglu & Sulusoglu

(2013), al utilizar explantos de 0.5 a 1.0 cm de longitud y BAP como única fitohormona, pues produjeron un máximo de 3.33 y 4.58 brotes/explanto usando concentraciones de 1.0 y 2.0 mg/l BAP, respectivamente. Sin embargo, a partir de segmentos nodales de *P. peruviana* se puede desarrollar hasta 11.8 y 12.0 brotes/explanto mediante la aplicación de 0.5 y 1.0 mg/l BAP como único fitorregulador (Ramar, 2014). Otro estudio sobre *S. surattense* indica que se logra producir 58.2 y 7.5 brotes/explanto a partir de segmentos nodales en medio nutritivo únicamente con BAP a concentraciones de 0.5 y 2.0 mg/l, respectivamente (Rahman & otros, 2011). De esta forma, se puede sugerir que la aplicación en solitario de BAP a una concentración de 0.5 a 1.0 mg/l en la multiplicación de brotes de *S. caripense* también logró generar una cantidad considerable de brotes.

Además, cabe mencionar que el tratamiento testigo (TM0) alcanzó 7.13 brotes/explanto; dicho de ese modo, se nota nuevamente la importancia de la interacción fitohormonal del tratamiento TM4 (0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA) para producir el mayor número de brotes/explanto (8.50) a través de su efecto sinérgico.



3.3.3 Número de nudos.

El análisis de la varianza para la variable número de nudos de *S. caripense* en Fase 2 de la presente investigación transcurridos 35 días (Tabla 14), detectó significancia estadística para los tratamientos de multiplicación ($p = 0.0392$), también para la concentración de BAP ($p = 0.0285$); no lo hizo para la concentración de AIA ($p = 0.2852$); además, el coeficiente de variación fue 36.22 para esta variable.

Tabla 14

ANOVA ($p < 0.05$) para la variable número de nudos de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Número de nudos			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	p-valor
Total	105		
Tratamiento Multiplicación (TM)	8	32.45	0.0392
BAP	2	56.00	0.0285
AIA	2	19.29	0.2852
Error experimental	97	15.18	CV = 36.22

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Los tratamientos y las concentraciones de BAP para la variable número de nudos de *S. caripense* reportaron diferencias significativas, por lo que se presenta además las comparaciones de los promedios usando la prueba Duncan, en la siguiente tabla.

Tabla 15

Promedios \pm E.E. para la variable número de nudos de *Solanum caripense* por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Número de nudos			
Fitohormona	Concentración		Media \pm E.E.
BAP (mg/l)	0.0		9.89 \pm 0.69 a
	0.5		12.20 \pm 0.67 b
	1.0		10.03 \pm 0.66 a
AIA (mg/l)	0.0		11.51 \pm 0.74
	0.5		10.68 \pm 0.62
	2.0		9.94 \pm 0.66
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Media \pm E.E.
TM0	0.0	0.0	8.50 \pm 1.38 a
TM1	0.5	0.0	13.88 \pm 1.38 c
TM2	1.0	0.0	12.14 \pm 1.04 abc
TM3	0.0	0.5	10.93 \pm 1.04 abc
TM4	0.5	0.5	12.36 \pm 1.04 bc
TM5	1.0	0.5	8.75 \pm 1.12 ab
TM6	0.0	2.0	10.25 \pm 1.12 abc
TM7	0.5	2.0	10.36 \pm 1.04 abc
TM8	1.0	2.0	9.20 \pm 1.23 ab

Nota: Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0.05). Elaborado por J. Morales, 2015

En la presente investigación se obtuvo el mayor número de nudos/explanto de *S. caripense* con el tratamiento TM1, correspondiente a una concentración de 0.5 mg/l BAP, la cual produjo 13.88 nudos/explanto (Figura 11). Los resultados obtenidos son de importancia en labores de control y constituyen el índice de multiplicación (Pérez J. F., 2006, pág. 153), es decir, el promedio generado del número de nudos/explanto de cada tratamiento de multiplicación (Cárdenas A. M., 2015).

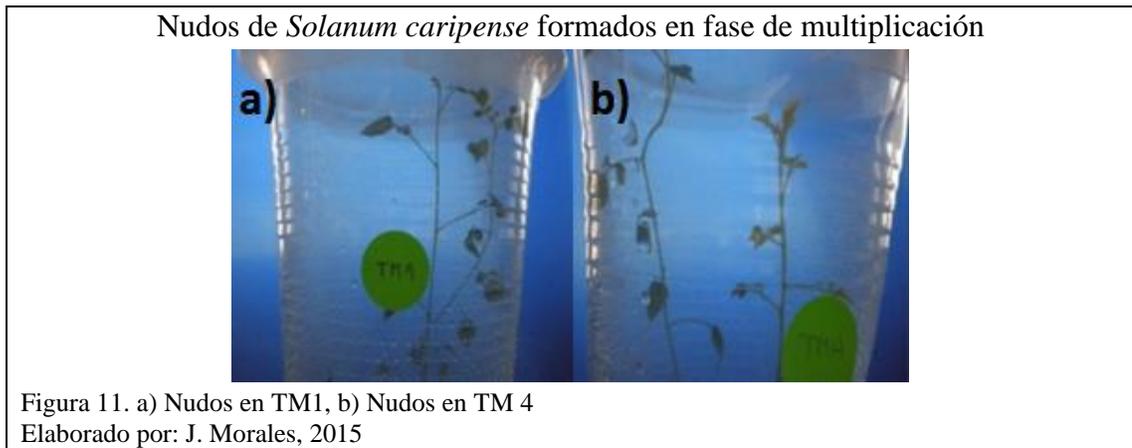
Mediante la aplicación de 1.5 mg/l BAP en un medio mínimo, plántulas de *S. tuberosum* de los cultivares Kennebec y Patrones pueden ser conservadas *in vitro* y producir 7.8 y 7.6 nudos/explanto a los 5 meses de su introducción (Páez & González, 2001). Distinto a

lo ocurrido en la especie *S. caripense* de la presente investigación, que fue capaz de generar un máximo de 13.88 nudos/explanto con el uso de tan solo 0.5 mg/l BAP a los 35 días de la siembra.

En la presente investigación el mayor número de nudos/explanto (13.88) fue similar al mayor número de hojas/explanto (16.13) de *S. caripense* (Anexo 12); ambos resultados obtenidos mediante la aplicación de 0.5 mg/l BAP en el medio de cultivo. Dicho de ese modo, se puede manifestar que la cantidad de hojas de *S. caripense* generadas en la Fase 2 fue mayor a las reportadas para varias especies silvestres del género *Solanum*, principalmente debido a la presencia del fitorregulador BAP; pues se menciona que mediante propagación *in vitro* de las especies *S. hirtum* y *S. marginatum* en diferentes medios sin hormonas, se puede generar un máximo de 7 y 6 hojas/explanto a los 60 días de la siembra, respectivamente (Andrade Díaz & otros, 2013).

Además, Nathiya & otros mencionan que las citocininas son las fitohormonas más aplicadas e importantes para la elongación de brotes, con más frecuencia BAP y KIN; es por eso que, reportan el uso de 0.1 mg/l BAP y la obtención de amplios espacios internodales en plántulas de *W. somnifera* que alcanzaron hasta 4 cm de longitud a los 30 días del subcultivo, y la combinación de 0.05 mg/l BAP con 1.0 mg/l KIN para obtener la máxima elongación de espacios internodales en plántulas de hasta 5.0 cm de longitud (2013). A diferencia de lo sucedido en *W. somnifera*, en la presente investigación las plántulas de *S. caripense* obtenidas en la Fase 2 alcanzaron mayor longitud mediante la aplicación de 0.5 mg/l BAP (Anexo 13), lo que sugiere que también presentaron mayor elongación entre espacios internodales. Finalmente, la importancia de la concentración de

BAP en el tratamiento TM1 para alcanzar el máximo número de nudos/explanto (13.88), puede respaldarse al compararse con el tratamiento testigo (TM0), que sin adición de la fitohormona tan solo generó 8.50 nudos/explanto.



3.3.4 Formación de raíces.

El análisis de la varianza para la variable formación de raíces de *S. caripense* en Fase 2 de la presente investigación transcurridos 35 días (Tabla 16), no detectó significancia estadística para los tratamientos de multiplicación ($p = 0.4855$), concentración de BAP ($p = 0.2970$), ni para la concentración de AIA ($p = 0.2933$); además, el coeficiente de variación fue 18.49 para esta variable.

Tabla 16

ANOVA ($p < 0.05$) para la variable formación de raíces de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Formación de raíces			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	<i>p</i>-valor
Total	105		
Tratamiento Multiplicación (TM)	8	0.03	0.4855
BAP	2	0.05	0.2970
AIA	2	0.05	0.2933
Error experimental	97	0.04	CV = 18.49

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

El valor máximo de formación de raíces, se encontró en el tratamiento TM4 con un promedio de 1.14 (Tabla 17). Los tratamientos con un valor mínimo de 1.00 indican que hubo formación de raíces en la parte basal de los tallos donde se realizó el corte. Mientras que, en los tratamientos con valores superiores a 1.00, también se revela la formación de raíces adventicias en la parte aérea de los tallos.

Tabla 17

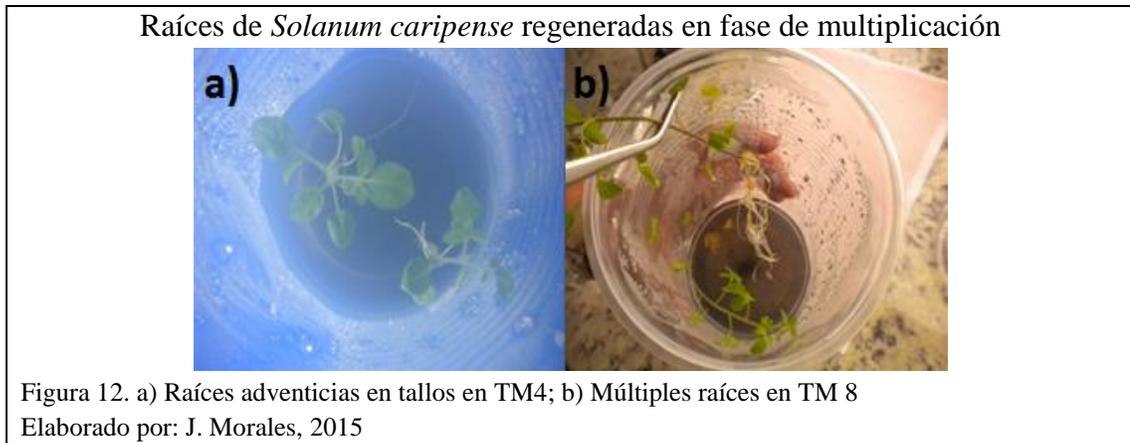
Promedios \pm E.E. para la formación de raíces de *Solanum caripense* por fitorregulador y tratamiento aplicados en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Formación de raíces			
Fitohormona	Concentración		Media \pm E.E.
BAP (mg/l)	0.0		1.02 \pm 0.03
	0.5		1.07 \pm 0.03
	1.0		1.00 \pm 0.03
AIA (mg/l)	0.0		1.00 \pm 0.04
	0.5		1.07 \pm 0.03
	2.0		1.02 \pm 0.03
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Media \pm E.E.
TM0	0.0	0.0	1.00 \pm 0.07
TM1	0.5	0.0	1.00 \pm 0.07
TM2	1.0	0.0	1.00 \pm 0.05
TM3	0.0	0.5	1.07 \pm 0.05
TM4	0.5	0.5	1.14 \pm 0.05
TM5	1.0	0.5	1.00 \pm 0.06
TM6	0.0	2.0	1.00 \pm 0.06
TM7	0.5	2.0	1.07 \pm 0.05
TM8	1.0	2.0	1.00 \pm 0.06

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

En la presente investigación, la multiplicación de brotes y la formación de raíces de *S. caripense*, resultaron ser procesos simultáneos (Figura 12). Pese a que la formación de raíces representa una fase distinta a la de multiplicación, existen especies como por ejemplo *S. tuberosum* (Pérez J. F., 2006), en las cuales la rizogénesis ocurre de forma espontánea durante la multiplicación, en el mismo medio de cultivo donde se desarrollan yemas nuevas (Castillo, 2004); similar a lo sucedido en la presente investigación.

Además, la dosis de auxina que permitió alcanzar el mayor efecto sobre la formación de raíces de *S. caripense* fue 0.5 mg/l; similares reportes en la obtención del mayor porcentaje de enraizamiento y número de raíces utilizando 0.5 y 1.00 mg/l de auxina, son mencionados para la especie *Vasconcellea x heilbornii* (Vaca , 2008).



3.3.5 Porcentaje de mortalidad.

En la presente investigación se obtuvo en total 8 explantos muertos en la Fase 2 y un 6.35% de mortalidad total de los tratamientos, como se expone en la tabla a continuación.

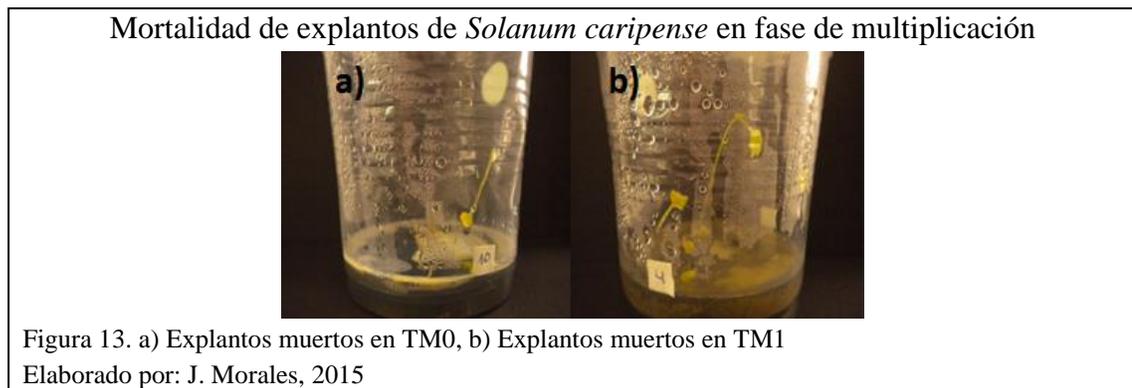
Tabla 18

Porcentajes de mortalidad de explantos de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Explantos muertos	Mortalidad (%)
TM0	0.0	0.0	6/14	42.86
TM1	0.5	0.0	2/14	14.29
TM2	1.0	0.0	0/14	0,00
TM3	0.0	0.5	0/14	0,00
TM4	0.5	0.5	0/14	0,00
TM5	1.0	0.5	0/14	0,00
TM6	0.0	2.0	0/14	0,00
TM7	0.5	2.0	0/14	0,00
TM8	1.0	2.0	0/14	0,00
Total			8/126	$\bar{x} = 6.35$

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

La mortalidad registrada en la Fase 2 de la presente investigación en los tratamientos TM0 y TM1 (Figura 13), fue causada por la presencia de contaminación en las primeras semanas de la etapa; principalmente, debido a que los agentes contaminantes pueden crecer con mayor rapidez que los explantos o arrojar desechos metabólicos tóxicos, procesos que culminan con la muerte de los tejidos vegetales (Bhojwani & Razdan, 1996, pág. 27). Para la mortalidad registrada en el TM0 (42.86%), se puede decir que la ausencia de fitohormonas puede reducir el porcentaje de sobrevivencia de los explantos (Saucedo, Ramos, & Reyes, 2008).



3.4 Enraizamiento *ex vitro* (Fase 3)

Un enraizamiento exitoso de brotes regenerados en etapa de multiplicación, es un requisito importante en la propagación *in vitro* de organismos vegetales (Loc & Kiet, 2011).

3.4.1 Porcentaje de prendimiento de raíces.

En esta investigación los resultados del porcentaje de prendimiento de raíces para los tratamientos empleados en el enraizamiento en sustrato de *S. caripense*, se presentan a continuación.

Tabla 19

Porcentajes para la variable prendimiento de raíces de *Solanum caripense* por tratamiento aplicado en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra

Prendimiento de raíces		
Tratamiento Enraizamiento (TM)	AIB (mg/l)	Porcentaje (%) ± E.E
TE0	0.0	100 ± 0.00
TE1	0.5	100 ± 0.00
TE2	1.0	100 ± 0.00
TE3	2.0	100 ± 0.00
TE4	3.0	100 ± 0.00

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

Teniendo en cuenta que la rizogénesis en los explantos de *S. caripense* comenzó en la Fase 2 de la presente investigación, las vitroplantas adaptadas en fase de enraizamiento alcanzaron un prendimiento a la turba del 100%, en todos los tratamientos, transcurridos 42 días; de modo que, para evitar la pérdida de plantas, las raíces no fueron contabilizadas ni medidas al final de la etapa debido a su abundancia y total prendimiento al sustrato (Figura 14). Además, para minimizar problemas tales como la necrosis de brotes, abscisión de hojas y formación de callo, presentes en procesos de enraizamiento *in vitro* y que afectan la formación de raíces (Parveen & Shahzad, 2011), en la presente investigación se decidió optar por el enraizamiento *ex vitro* de plántulas de *S. caripense*, que también reduce el costo y tiempo de la micropropagación, antes de pasar del laboratorio a condiciones de campo y con óptimos resultados de enraizamiento en el sustrato.

Además, cabe destacar que en la Fase 3 de la presente investigación el material vegetal utilizado corresponde a explantos jóvenes de *S. caripense*. Distinto a lo encontrado en el estudio de Gallardo (2011), donde esquejes semileñosos de *S. caripense* lograron obtener como promedio un 80% de adaptación a un sustrato conformado por arena 20%, pomina

10% y tierra negra 70% a los 90 días de ser plantados; sin embargo, sugiere una rápida adaptación de los esquejes semileñosos de *S. caripense* a la mencionada mezcla de sustratos. En el mismo estudio se encontró que el porcentaje de mortalidad para esquejes leñosos de *S. caripense* equivale a 100%; la principal causa de muerte es atribuida a la lignificación de los tejidos meristemáticos, la cual impide el brote de raíces en el tipo de esqueje seleccionado (Gallardo, 2011). Así, se puede proponer que los explantos jóvenes de *S. caripense* utilizados en la fase de enraizamiento de la presente investigación proporcionan un mejor resultado.

En el estudio de Cavusoglu & Sulusoglu (2013), así como en el de Loc & Kiet (2011), vitroplantas de *S. muricatum* y *S. hainanense* enraizadas *in vitro* con varias concentraciones de AIB y que alcanzan una longitud de raíces comprendida entre 3 y 4 cm, altura de 6 a 8 cm y con 6 a 8 hojas son trasplantadas en recipientes plásticos conteniendo una mezcla autoclavada de turba y perlita (3:1) o vermiculita y tierra (3:1) para su adaptación a sustrato, y además son cubiertas con plástico transparente para mantener la humedad relativa y prevenir su desecación. En la presente investigación, mediante el enraizamiento *ex vitro* de las plántulas de *S. caripense* se omitió la fase de enraizamiento *in vitro* de los procesos mencionados por Cavusoglu & Sulusoglu (2013), y por Loc & Kiet (2011); es decir, las plántulas obtenidas en etapa de multiplicación fueron directamente adaptadas en la turba conteniendo diferentes concentraciones de AIB, obteniéndose óptimos resultados en el prendimiento de las raíces de *S. caripense*. Similares resultados de adaptación a sustrato y enraizamiento *ex vitro* al utilizar AIB como fitorregulador, también han sido reportados en *S. betaceum* (Contreras & Almeida,

2003a), *Capsicum annuum* (Siddique & Anis, 2006), y *Cassia angustifolia* (Parveen & Shahzad, 2011).

Finalmente, y ahora similar a lo mencionado por Gallardo (2011), *S. caripense* tuvo la posibilidad de adaptarse fácilmente al sustrato debido a la agresividad misma de la especie. Por lo tanto, se puede confirmar que las plántulas de *S. caripense* obtenidas en Fase 2 de la presente investigación, resultaron ser el material vegetal propicio para la Fase 3, debido principalmente al ahorro de espacio y tiempo, y a la posibilidad de obtener un alto número de vitroplantas con raíces totalmente prendidas a la turba y un patrón de desarrollo saludable, según lo observado.



3.4.2 Longitud de la vitroplanta.

El análisis de la varianza para la variable longitud de la vitroplanta de *S. caripense* en Fase 3 de la presente investigación transcurridos 42 días (Tabla 20), detectó significancia estadística para los tratamientos de enraizamiento ($p = 0.0025$); el coeficiente de variación fue 24.43 para esta variable.

Tabla 20

ANOVA ($p < 0.05$) para la variable longitud de la vitroplanta de *Solanum caripense* en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra

Longitud de la vitroplanta			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	p-valor
Total	77		
Tratamiento Enraizamiento (TE)	4	248.33	0.0025
Error experimental	73	54.83	CV = 24.43

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

A continuación se presentan las comparaciones de Duncan, de los tratamientos de enraizamiento para la variable longitud de la vitroplanta de *S. caripense*.

Tabla 21

Promedios \pm E.E. para la variable longitud de la vitroplanta de *Solanum caripense* por tratamiento aplicado en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra

Longitud de la vitroplanta		
Tratamiento Enraizamiento (TM)	AIB (mg/l)	Media (cm) \pm E.E
TE0	0.0	24.38 \pm 1.98 a
TE1	0.5	27.71 \pm 1.85 ab
TE2	1.0	31.26 \pm 1.85 bc
TE3	2.0	34.17 \pm 1.85 c
TE4	3.0	33.27 \pm 1.85 bc

Nota: Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0.05). Elaborado por J. Morales, 2015

Las longitudes alcanzadas por las vitroplantas de *S. caripense* en Fase 3 de la presente investigación (Figura 15), en particular la máxima alcanzada por el tratamiento TE3 (2.0 mg/l AIB) con un promedio de 34.17 cm longitud/vitroplanta seguida por TE4 (3.0 mg/l AIB) con 33.27 cm longitud/vitroplanta, pueden ser sustentadas por la presencia de auxina en el sustrato, principalmente debido a que el AIB induce la formación de raíces con mayor rapidez, favoreciendo la absorción de nutrientes, y por consiguiente un mayor desarrollo en la longitud de los tallos; una aseveración parecida es mencionada por

Trocones & otros (2004), al obtener el mayor crecimiento de tallo, 3.75 cm seguido por 3.67 cm, en vitroplantas de *Hibiscus elatus* aplicando 3.0 y 2.0 mg/l AIB al inicio del enraizamiento *ex vitro*.

Tal efecto del AIB sobre el crecimiento caulinar de las vitroplantas de *S. caripense* de la presente investigación, puede corroborarse teniendo en cuenta que sin la adición de la fitohormona se obtuvo la menor longitud de tallo en el tratamiento TE0, con 24.38 cm longitud/vitroplanta. No obstante, en la presente investigación una concentración de 2.0 mg/l AIB permitió alcanzar el promedio máximo de longitud/vitroplanta de *S. caripense*; mientras que, al aumentar la concentración a 3.0 mg/l AIB la longitud disminuyó ligeramente; similares resultados han sido reportados en babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) al experimentar con varias concentraciones de auxinas (Vaca , 2008), donde la tasa de crecimiento disminuyó al superar la concentración óptima de auxina, la cual puede actuar como inhibidor del crecimiento en concentraciones superiores, tal como lo menciona Galston citado en Salisbury & Ross (2002).



3.4.3 Porcentaje de mortalidad.

Se obtuvo un total de 2 plántulas muertas de *S. caripense* en la Fase 3 de la presente investigación, las cuales se registraron en TE0, corresponden al 12.5% de mortalidad en el tratamiento y al 2.5% de mortalidad total de los tratamientos (Tabla 22).

Tabla 22

Porcentajes de mortalidad de plántulas de *Solanum caripense* en fase de enraizamiento en sustrato a los 42 días de la siembra

Tratamiento Enraizamiento (TE)	AIB (mg/l)	Plántulas Muertas	Mortalidad (%)
TE0	0.0	2/16	12.5
TE1	0.5	0/16	0.00
TE2	1.0	0/16	0.00
TE3	2.0	0/16	0.00
TE4	3.0	0/16	0.00
Total		2/80	$\bar{x} = 2.5$

Nota: Elaborado por J. Morales, 2015

El principal motivo para las muertes registradas en la Fase 3 de la presente investigación, se puede centrar en la pérdida de humedad durante el paso de las plántulas de *S. caripense* del medio de cultivo al sustrato, lo que finalmente conllevó a la muerte de 2 plántulas (12.5%) por desecación en el tratamiento TE0 (Figura 16) (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010).

En el estudio realizado por Cavusoglu & Sulusoglu (2013), así como en el de Loc & Kiet (2011), plántulas de *S. muricatum* y *S. hainanense* lograron pre aclimatarse a una mezcla de sustratos en un 100% previo a ser colocadas en condiciones de campo e invernadero, donde los porcentajes de aclimatación variaron entre 80 y 100%. Similares resultados fueron obtenidos en la presente investigación, con un total de 97.5 % de plántulas de *S. caripense* aclimatadas a la turba en el cuarto de incubación de ambiente controlado.

Vitroplantas de *Solanum caripense* al inicio de la fase de enraizamiento en sustrato

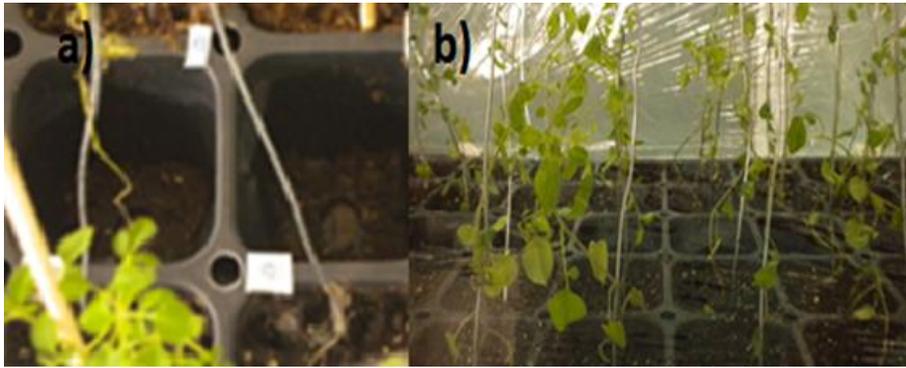


Figura 16. a) Muertas, b) Vivas
Elaborado por: J. Morales, 2015

Conclusiones

Se acepta la hipótesis alternativa que afirma la posibilidad de propagar *Solanum caripense*, vía cultivo *in vitro* a partir de la semilla.

El tratamiento de desinfección (TD) óptimo para el establecimiento de un cultivo axénico de *Solanum caripense* utilizando la semilla, como explanto inicial, fue el TD1 (Alcohol 30% → 10 min; hipoclorito de sodio 30% → 10 min; peróxido de hidrógeno 7% → 8 min; y lavados con agua destilada estéril), pues no obtuvo contaminación alguna y alcanzó un porcentaje de germinación de 92% transcurridos 42 días.

El tratamiento de multiplicación (TM) que generó un mayor número de brotes por explanto de *Solanum caripense* fue el TM4 con 0.5 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA, el cual mostró el mejor resultado debido a la sinergia entre citocinina y auxina, generando 8.50 brotes/explanto transcurridos 35 días.

Todos los tratamientos de enraizamiento *ex vitro* (TE), incluso el tratamiento testigo (TE0), permitieron un 100% de prendimiento de raíces de las vitroplantas de *Solanum caripense* a la turba elegida como sustrato transcurridos 42 días (incluso menos), mediante el empleo de la auxina AIB en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l como fitoregulator promotor de la formación de raíces laterales. Sin embargo, el TE3 (2.0 mg/l AIB) permitió alcanzar la mayor longitud de vitroplanta, con una altura promedio de 34.17 cm.

Referencias

- Alvarado, Y. (2000). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 87-91.
- Ammirato, P. V. (1988). Role of ABA in regulation of somatic embryogenesis. *HortScience*, 23, 520.
- Anderson, G. J. (1975). The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum*. *Brittonia*, 27(3), 209-222.
- Anderson, G. J. (1979). Systematic and evolutionary consideration of *Solanum* section *Basarthurum*. En J. G. Hawkes, R. N. Lester, & A. D. Skelding (Eds.), *The biology and taxonomy of the Solanaceae* (págs. 549-562). Londres, Reino Unido: Linnean Society Symposium Series.
- Anderson, G. J., & otros. (2006). *Solanum perlongistylum* and *S. catilliflorum*, new endemic peruvian species of *Solanum*, section *Basarthurum*, are close relatives of the domesticated pepino, *S. muricatum*. *Novon*, 16(2), 161-167.
- Andrade Díaz, D., & otros. (2013). Evaluación de medios de cultivo para propagación *in vitro* de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*. *Acta Agronómica*, 62(1), 27-36.
- Barceló Coll, J., & otros. (2001). *Fisiología Vegetal*. Madrid, España: Pirámide.
- Barnett, J. P. (1998). *Scielo México*. Recuperado el 3 de noviembre de 2015, de Links: <http://www.sfws.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>

- Belote, J. (1998). *Los Saraguros del Sur del Ecuador*. Quito, Ecuador: Abya-Yala, UPS.
- Bhojwani, S. S., & Razdan, M. K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice (Ed. rev.)*. Delhi, India: ELSEVIER.
- Bithell, S. L., & otros. (2002). Germination requirements of laboratory stored seeds of *Solanum nigrum* and *Solanum physalifolium*. *New Zealand Plant Protection*, 55, 222-227.
- Black, M., Bewley, J. D., & Halmer, P. (2006). *The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses*. Wallingford, UK: CABI publishing.
- Borrero, E. (2007). *Protocolo para la regeneración de plántulas a partir de explantes de hojas de cinco variedades ecuatorianas de tomate de árbol (Solanum betaceum) (Tesis de grado)*. Quito, Ecuador: USFQ.
- Cabrera, V. A., Dottori, N., & Cosa, M. T. (2010). Germinación, éxito reproductivo y fenología reproductiva de *Solanum Chenopodioides* (SOLANACEAE). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 45(1-2), 73-80.
- Capuana, M., & Giannini, R. (1997). Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *The Journal of horticultural science*, 72(3), 453-460.
- Cárdenas, A. M. (2015). *Validación y desarrollo de una tecnología para la multiplicación in vitro de Paulownia elongata, Paulownia fortunei y un híbrido (P. fortunei x P. elongata) bajo sistemas de propagación convencional e inmersión temporal (Tesis de grado)*. Quito, Ecuador: UPS.

- Cárdenas, W., Zuluaga, M., & Lobo, M. (2004). Latencia en semillas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (*Solanum betaceum*) Cav.) como aspecto básico para la conservación y el monitoreo de viabilidad de las colecciones. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 139, 31-41.
- Casal, I., & otros (Eds.). (2010). *La biotecnología aplicada a la agricultura*. Madrid, España: SEBIOT.
- Cassells, A. C. (1991). Problem in tissue culture: culture contamination. En P. Debergh, & R. H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagación* (págs. 31-45). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *INIA*, 382, 1-8.
- Cavusoglu, A., & Sulusoglu, M. (2013). *In vitro* propagation and acclimatization of pepino (*Solanum muricatum*). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1), 410-415.
- Chimba, L. (2012). *Evaluación de 3 tipos de microsilos a base de cebada, alfalfa, maíz con dulce de agave, en cuyes en la etapa de crecimiento y engorde en la provincia de Cotopaxi, sector Salache Taniloma (Tesis de grado)*. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. UTC: Latacunga, Ecuador.
- Contreras, I., & Almeida, J. (2003a). Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forestal Venezolana*, 47(2), 9-13.

- Contreras, I., & Almeida, J. (2003b). Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). *Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes*, 45(1), 61-64.
- Correll, D. S. (1962). The potato and its wild relatives. *American Potato Journal*, 39(12), 471-471.
- de Fossard, R. (1976). *Tissue culture for plant propagation*. Armidale: University of New England.
- de la Torre, L., & otros. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- Delgado, L. (2013). *Evaluación de la presencia de especies nativas, endémicas e introducidas en remanentes alrededor de la ciudad de Quito (Tesis de grado)*. PUCE: Quito, Ecuador.
- Doemer, P. (2000). Cell division regulation. En B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (págs. 528-567). USA: American Society of Plant Physiologists.
- Drew, R. A., & Smith, N. G. (octubre de 1986). Growth of apical and lateral buds of pawpaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors. *Journal of Horticultural Science*, 61(4), 535-543.
- Duca, M. (2015). *Plant Physiology*. Switzerland: Springer International Publishing.

- Eriksson, T. (1965). Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiologia Plantarum*, 18(4), 976-993.
- Gallardo, S. N. (2011). *Evaluación de tres tipos de sustratos en la multiplicación de plantas endémicas con fines medicinales y el procesamiento en sobres de infusión. Obtenidas del sector de Buga Bajo comunidad Paquiestancia de la parroquia de Ayora (Tesis de grado)*. UPS: Cayambe, Ecuador.
- Galston, A. (1964). *The life of the green plant*. Englewood Cliffs. N.J.: Prentice-Hall.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151-158.
- George, E. F. (1993). *Plant propagation by tissue culture (2da ed.)*. Exergetics Ltd. 130-143p.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture (3ra ed., Vol. 1)*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science & Business Media.
- Gerique, A. (2010). *Biodiversity as a resource: Plant use and land use among the Shuar, Saraguros, and Mestizos in tropical rainforest areas of southern Ecuador. Dissertation (Tesis doctoral)*. Geographic Institute of Erlangen-Nuremberg University: Nuremberg, Alemania.
- Heiser, C. B. (1964). Origin and variability of the pepino (*Solanum muricatum*): A preliminary report. *Baileya*, 12, 151-158.
- Heiser, C. B. (1969). *Solanum caripense y el origen de Solanum muricatum*. *Revista politécnica*, 1(3), 5-11.

- Herraiz, F. J., & otros. (2015). Morphological and molecular characterization of local varieties, modern cultivars and wild relatives of an emerging vegetable crop, the pepino (*Solanum muricatum*), provides insight into its diversity, relationships and breeding history. *Euphytica*.
- Herrera, D. (2011). *Las aguas servidas y su incidencia en la calidad de vida de los habitantes del sector de Taniloma en la ciudad de Latacunga Provincia de Cotopaxi (Tesis de grado)*. Facultad de Ingeniería Civil y Mecánica. UTA: Latacunga.
- Hsiao, A. I., & Quick, W. A. (1984). Actions of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide on seed dormancy and germination of wild oats, *Avena fatua* L. *Weed Research*, 24(6), 411-419.
- Ibrahim, M., & otros. (2001). Seed germination and graft compatibility of wild *Solanum* as rootstock of tomato. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 1(8), 701-703.
- Iliev, I., & otros. (2010). Plant micropropagation. En R. H. Zimmeman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, & R. H. Lawson (Eds.), *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops* (págs. 333-342). Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.
- INIAP. (2003). *Diversidad de frutales nativos comestibles Caricaceae - Solanaceae, fenología, usos y recolección de germoplasma en el Sur del Ecuador*. Estación Experimental Chuquipata, Granja Experimental Bullcay.

ITIS. (2015). *Integrated Taxonomic Information System*. Recuperado el 30 de noviembre de 2015, de ITIS Report: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=821418

Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En F. A. Squeo, & L. Cardemil (Eds.), *Fisiología Vegetal* (págs. 3-10). La Serena, Chile: Ediciones Universidad de La Serena.

Jørgensen, P. M., & León Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Saint Louis: Missouri botanical Garden Press.

Joshua, A. (1978). Seed germination of *Solanum incanum*: an example of germination problems of tropical vegetable crops. *Acta Horticulturae*, 83, 155-162.

Karadag, B. N., Yildirim, E. C., & Tekdal, D. (2013). The comparison of plant regeneration between Jerusalem artichoke and purple potato cultured on MS media with different concentrations and combinations of plant growth regulators. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(2), 120-124.

Leifert, C., Morris, C. E., & Waites, W. M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 139-183.

Leifert, C., Waites, W. M., & Nicholas, J. R. (1989). Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(4), 353-361.

- Loc, N. H., & Kiet, H. V. (2011). Micropropagation of *Solanum hainanense* Hance. *Annals of Biological Research*, 2(2), 394-398.
- Loy, J. B., & Evensen, K. B. (1979). Phytochrome regulation of seed germination in a dwarf strain of watermelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104, 496-499.
- Ludwig-Müller, J., & Cohen, J. D. (2002). Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, 115(2), 320-329.
- Madoff, S. (1981). The L-forms of bacteria. En M. Starr, H. Stolp, H. Traper, A. Balows, & H. Schlegel (Eds.), *The prokaryotes* (Vol. 2, págs. 2225-2237). Berlin: Springer-Verlag.
- Matthys, D., Gielis, J., & Debergh, P. (1995). Ethylene. En J. Aitken-Christie, & otros (Eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. (págs. 473-491). Dordrecht: Kluwer.
- McCown, B. H., & Sellmer, J. C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. En J. F. Pérez (Ed.), *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la Agricultura*. San Cristóbal de La Laguna, España: Arte Comunicación Visual S.L.
- Mroginski, L. A., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L.

- Mroginski (Eds.), *Bioteconología y mejoramiento vegetal II* (págs. 17-24). Argentina: ArgenBio.
- Murashige, T. (1973). Sample preparations of media. En P. F. Kruse, & M. K. Patterson (Eds.), *Tissue culture methods and applications* (págs. 698-703). New York, USA: Academic Press.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murray, B. C., Hammett, K. R., & Grigg, F. D. (1992). Seed set and breeding system in the pepino *Solanum muricatum*, Ait., Solanaceae. *Scientia Horticulturae*, 49(1-2), 83-92.
- Nagata, T., & Takebe, I. (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99(1), 12-20.
- Nathiya, S., & otros. (2013). Studies on the effect of sucrose, light and hormones on micropropagation and *in vitro* flowering of *Withania somnifera* Var. Jawahar-20. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(5), 1391-1397.
- Nerson, H., & Paris, H. (1988). Effects of fruit age, fermentation and storage on germination of cucurbit seeds. *Scientia Horticulturae*, 35(1-2), 15-26.
- Nitsch, J. P. (1969). Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology*, 19, 389-404.
- Nuez, F. (2005). Morphological and physico-chemical characteristics of fruits of pepino (*Solanum muricatum*), wild relatives (*S. caripense* and *S. tabanoense*) and

- interspecific hybrids: Implications in pepino breeding. *European Journal of Horticultural Science*, 70(5), 224-230.
- Ohira, K., Makoto, I., & Ojima, K. (1976). Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture. *Plant and Cell Physiology*, 17(3), 583-590.
- Páez, J., & González, R. (2001). Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) bajo condiciones de crecimiento mínimo. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 12, 121-129.
- Pandhure, N. (2010). *In vitro* multiplication of important medicinal plant *Solanum nigrum* L. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7), 33-35.
- Parveen, S., & Shahzad, A. (2011). A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. from root explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 789-796.
- Peñañiel, M. (2003). *Flora y vegetación de Cuicocha*. Abya-Yala, UPS: Quito, Ecuador.
- Pérez, J. F. (2006). *Cultivo in vitro de plantas y sus aplicaciones en la Agricultura*. San Cristóbal de La Laguna, España: Arte Comunicación Visual S.L.
- Pérez, J. N. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Editorial GEO.
- Prohens, J., Soler, S., & Nuez, F. (1999). The effects of thermotherapy and sodium hypochlorite treatments on pepino seed germination, a crucial step in breeding programmes. *Annals of Applied Biology*, 134(3), 299-305.

- Quilo, M. C. (2012). *Estudio de plantas medicinales en los sectores Rumiñahui y Atahualpa e implementación de un huerto demostrativo, Pijal-Imbabura (Tesis de grado)*. UPS: Quito, Ecuador.
- Rahman, M., & otros. (2011). Mass propagation of *Solanum surattense* Bum. using direct adventitious shoot organogenesis from internode. *Acta Agriculturae Slovenica*, 97(1), 11-17.
- Ramar, K. (2014). *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration of *Physalis peruviana* L. An important medicinal plant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 456-464.
- Reinoso, L. (2009). *Especies botánicas de Latacunga: Descripción y usos*. Quito, Ecuador: Herbario Alfredo Paredes (QAP), Escuela de Biología de la Universidad Central.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1992a). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1992b). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. En W. M. Roca, & L. A. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (págs. 9-11). Cali, Colombia: CIAT.
- Saad, A. I., & Elshahed, A. M. (2012). Plant Tissue Culture Media. En A. Leva, & L. Rinaldi (Eds.), *Recent Advances in Plant in vitro Culture* (págs. 29-34). InTech.

- Salisbury, F., & Ross, C. (2002). *Fisiología de las plantas*. Madrid: Ed. Paraninfo S.A. 529-636, 649p.
- Santana, G., & Angarita, A. (1997). Regeneración adventicia de somaclones de uchuva (*Physalis peruviana*). *Agronomía Colombiana*, XIV(1), 59-65.
- Sathyanarayana, B. N. (2007). *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. I. K. International Pvt. Ltd.
- Saucedo, S., Ramos, L., & Reyes, T. (2008). Efecto de los rguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) schott). *Ciencia y Tcnología*, 1, 17-21.
- Seabrook, J. E. (1980). Laboratory culture. En E. J. Staba (Ed.), *Plant tissue culture as a source of biochemicals* (págs. 1-20). Florida, USA: C.R.C. Press.
- Seguí, J. M. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Sheeba, E., Palanivel, S., & Parvathi, S. (2015). *In vitro* flowering and rapid propagation of *Physalis minima* Linn. - A medicinal plant. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(1), 18763-18768.
- Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induced high frequency shoot bud formation and plant regeneration from cotyledonary node explants of *Capsicum annuum* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 303-308.

- Skoog, F., & Miller, R. A. (1957). Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.
- Smith, R. H. (2000). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. College Station, Texas, USA: Department of Soil and Crop Sciences, Texas A&M University.
- Taab, A. (2009). *Seed Dormancy and Germination in Solanum nigrum and S. physalifolium as Influenced by Temperature Conditions (Tesis doctoral)*. Swedish University of Agricultural Sciences: Upsala, Suecia.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal (Vol. 2)*. Los Ángeles, California, USA: Universitat Jaume I.
- Tata, S. S., & otros. (2011). *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Withania somnifera* (L) Dunal (Ashwaganda) - an important medicinal plant. *Research in Biotechnology*, 2(5), 34-39.
- The Plant List. (2013). *The Plant List. Version 1.1. Published on the Internet*. Recuperado el 15 de septiembre de 2015, de A working list of all plant species: <http://www.theplantlist.org>
- Torres, K. C. (2012). *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

- Trocones, A. G., & otros. (2004). Enraizamiento *ex vitro* de brotes de *Hibiscus elatus* SW. multiplicados *in vitro*. *Revista Forestal Baracoa*, 23(2), 27-31.
- 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 (Tesis de grado)*. ESPE: El Prado, Ecuador.
- Vaca, I. (2014). Consideraciones sobre reportes referentes a la propagación de tzímbalo y su número poblacional. *Comunicación personal, 14 de agosto, 2014*.
- Van den Eynden, V., Cueva, E., & Cabrera, O. (1998). *Plantas silvestres comestibles del sur del Ecuador*. Quito, Ecuador: Abya-Yala, UPS.
- Wain, R. L. (1980). El control químico del crecimiento de las plantas. En N. R. Ondarza (Ed.), *Los reguladores de las plantas y los insectos* (págs. 13-27). México: CONACYT.
- White, P. R. (1963). *The Cultivation of Animal and Plant Cells (2da ed.)*. New York, USA: The Ronald Press.
- Willan, R. L. (1991). *Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos*. Roma, Italia: FAO, DANIDA.
- Yeoman, M. M., & Macleod, A. J. (1977). Tissue (callus) cultures - techniques. En H. E. Street (Ed.), *Plant Tissue and Cell Culture* (págs. 31-59). Oxford, USA: Blackwell.
- Zuriaga, E. (2009). *Análisis de la variabilidad en poblaciones naturales de Solanum, secciones Lycopersicon y Basarthurum (Tesis doctoral)*. UPV: Valencia, España.

Anexos

Anexo 1. Certificado de correspondencia para la especie *Solanum caripense* Dunal



15 septiembre del 2015

CERTIFICACIÓN

Mediante la presente certifico que la muestra N° 001, colectada por el señor Juan Morales Segovia, colectada en Cotopaxi, Latacunga, Barrio Taniloma a 2717 msnm, corresponde a la especie:

***Solanum caripense* Dunal**

SOLANACEAE

Es todo cuanto puedo certificar y autorizo a l Sr. Juan Morales hacer uso de este certificado.

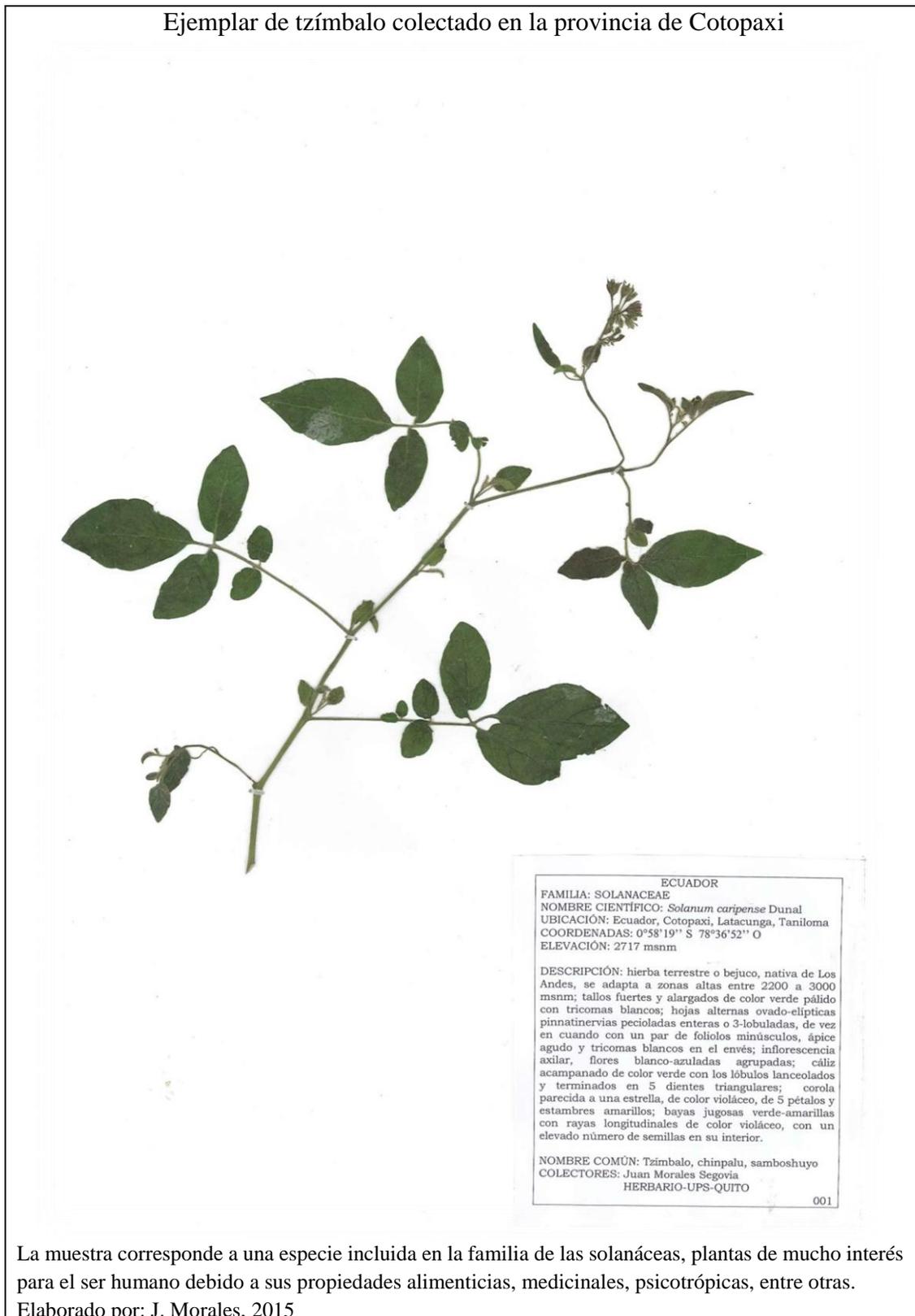
Atentamente,



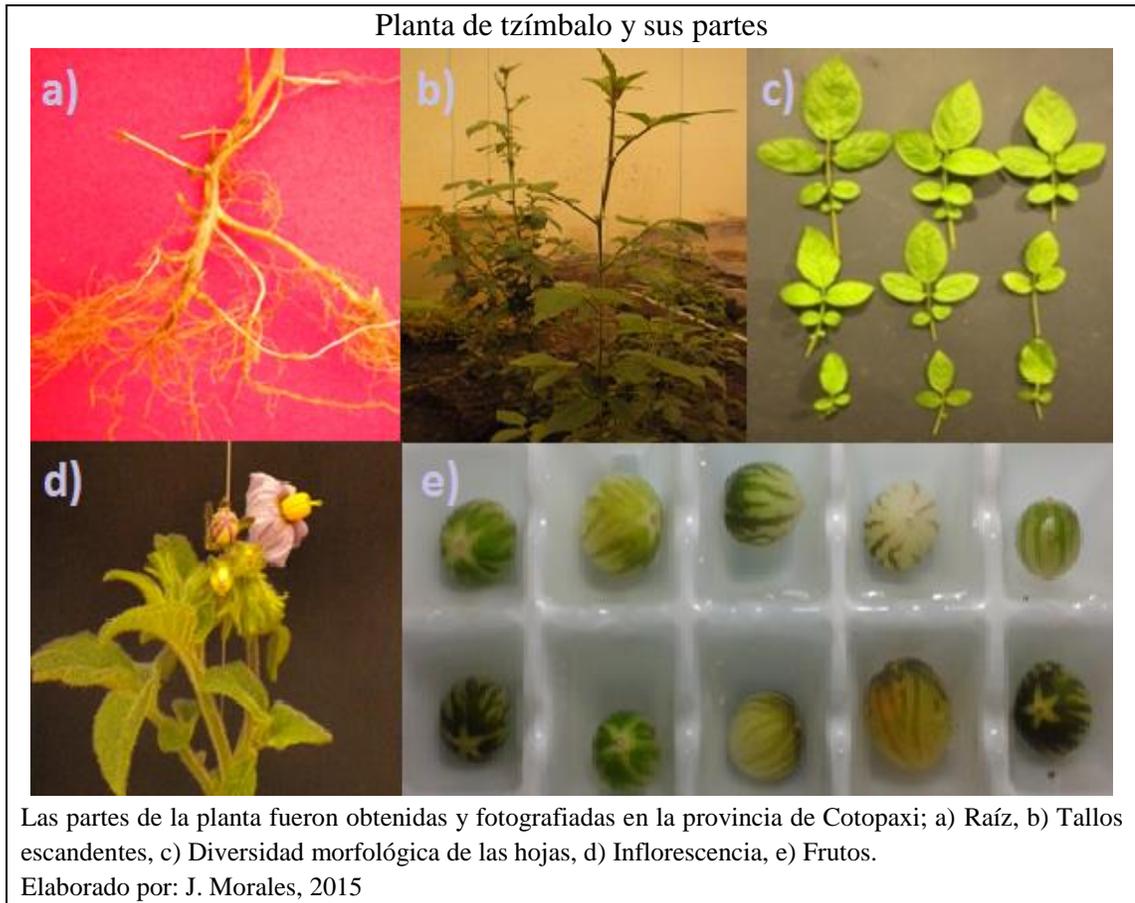
Dr. Marco Cerna
BIOLOGO – BOTANICO
DOCENTE INVESTIGADOR
UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA



Anexo 2. Muestra herbaria de la especie *Solanum caripense* Dunal



Anexo 3. Morfología de *Solanum caripense*



Anexo 4. Constituyentes generales de varios medios de cultivo

Constituyentes	Medios (cantidades en mg/l)					
	White ^a	MS ^b	ER ^c	B ₅ ^d	Nitsch ^e	NT ^f
Inorgánicos						
NH ₄ NO ₃	-	1650	1200	-	720	825
KNO ₃	80	1900	1900	2527.5	950	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	440	440	150	-	220
CaCl ₂	-	-	-	-	166	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	370	370	246.5	185	1233
KH ₂ PO ₄	-	170	340	-	68	680
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300	-	-	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	200	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	19	-	-	150	-	-
KCl	65	-	-	-	-	-
KI	0.75	0.83	-	0.75	-	0.83
H ₃ BO ₃	1.5	6.2	0.63	3	10	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5	22.3	2.23	-	25	22.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	10	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	8.6	-	2	10	-
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	-	-	-	-	-	8.6
ZnNa ₂ ·EDTA	-	-	15	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO ₃	0.001	-	-	-	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.025	0.0025	0.025	-	-
CoSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-	-	0.03
AlCl ₃	-	-	-	-	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	-	-	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	27.8	27.8	-	27.8	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	37.3	37.3	-	37.3	37.3
Orgánicos						
Inositol	-	100	-	100	100	100
Ácido nicotínico	0.05	0.5	0.5	1	5	-
Piridoxina·HCl	0.01	0.5	0.5	1	0.5	-
Tiamina·HCl	0.01	0.1	0.5	10	0.5	1
Glicina	3	2	2	-	2	-
Ácido fólico	-	-	-	-	0.5	-
Biotina	-	-	-	-	0.05	-

Nota: modificado de Bhojwani & Razdan (1996)

^a White (1963), ^b Murashige and Skoog (1962), ^c Eriksson (1965), ^d Gamborg, Miller, & Ojima (1968),

^e Nitsch (1969), ^f Nagata y Takebe (1971)

Anexo 5. Constituyentes iónicos de varios medios de cultivo

Iones	Unidades	Medios					
		White	MS	ER	B ₅	Nitsch	NT
NO ₃	mM	3.33	39.41	33.79	25.00	18.40	19.69
NH ₄		-	20.62	15.00	2.00	9.00	10.30
Total N		3.33	60.03	48.79	27.03	27.40	29.99
P		0.14	1.25	2.50	1.08	0.50	5.00
K		1.66	20.05	21.29	25.00	9.90	14.39
Ca		1.27	2.99	2.99	1.02	1.49	1.50
Mg		3.04	1.50	1.50	1.00	0.75	5.00
Cl		0.87	5.98	5.98	2.04	2.99	3.00
Fe	μM	12.50	100.00	100.00	50.10	100.00	100.00
S		4502.00	1730.00	1610.00	2079.90	996.80	5236.50
Na		2958.00	202.00	37.20	1089.00	202.00	202.00
B		24.20	100.00	10.00	48.50	161.80	100.00
Mn		22.40	100.00	10.00	59.20	112.00	100.00
Zn		10.40	30.00	37.30	7.00	34.70	36.83
Cu		0.04	0.10	0.01	0.10	0.10	0.10
Mo		0.01	1.00	0.10	1.00	1.00	1.00
Co		-	0.10	0.01	0.10	-	0.10
I		4.50	5.00	-	4.50	-	5.00
Al		-	-	-	-	-	-
Ni		-	-	-	-	-	-

Nota: modificado de Bhojwani & Razdan (1996)

Anexo 6. Rol de los diferentes elementos químicos importantes en fisiología vegetal

Elemento químico	Fuente	Funciones
Carbono	CO ₂	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos
Oxígeno	H ₂ O, O ₂	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos
Hidrógeno	H ₂ O	Es parte de la estructura de todos los componentes orgánicos
Nitrógeno	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Es parte de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila, nucleótidos, coenzimas
Cloro, sodio	Cl ⁻ , Na ⁺	Importante en el mantenimiento del equilibrio iónico y en la regulación de la presión osmótica
Potasio	K ⁺	Asegura la conformación estructural de proteínas, importante en la apertura y cierre estomáticos, sirve como activador para varias enzimas
Fósforo	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	Es parte de la estructura de ácidos nucleicos, compuestos macroérgicos, fosfolípidos, participa en reacciones de fosforilación
Magnesio	Mg ²⁺	Parte de la coenzima A y la clorofila
Azufre	SO ₄ ²⁻	Parte de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos
Hierro	Fe ³⁺ , 2+	Importante en la síntesis de clorofila, citocromos y nitrogenasa
Cobre, Magnesio	Cu ²⁺ , Mg ²⁺	Activadores enzimáticos
Calcio	Ca ²⁺	Parte de la estructura de la pared celular, tiene un rol en la permeabilidad celular, cofactor enzimático

Nota: Duca (2015)

Anexo 7. Resumen de las fases que componen la propagación *in vitro* de organismos vegetales



Anexo 8. Diversidad morfológica en frutos silvestres de *Solanum caripense* recolectados en Latacunga, Cotopaxi

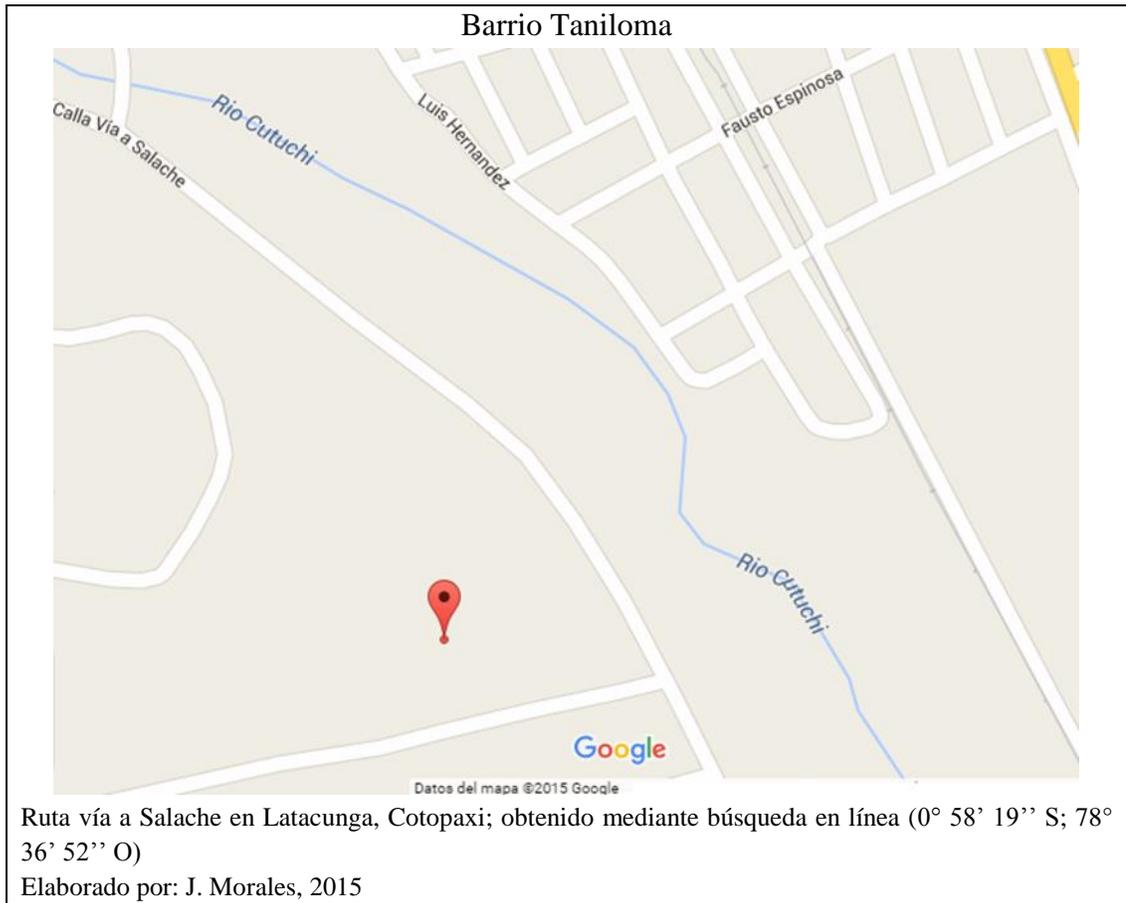
Frutos de tzímbalo en diferente estado de madurez



Para la propagación *in vitro* de tzímbalo a partir de la semilla, se seleccionaron los frutos que presentaron mayor estado de madurez y vigorosidad.

Elaborado por: J. Morales, 2015

Anexo 9. Mapa del lugar de recolección de los frutos silvestres de *Solanum caripense*



Anexo 10. Longitud de raíz y tallo de las plántulas de *Solanum caripense* antes de ingresar a fase de enraizamiento en sustrato

Tratamiento Enraizamiento (TE)	Explanto Fase 2 utilizado (código)	LongRaiz (cm)	LongTallo (cm)	Tratamiento Enraizamiento (TE)	Explanto Fase 2 utilizado (código)	LongRaiz (cm)	LongTallo (cm)
TE0 (AIB 0.0 mg/l)				TE1 (AIB 0.5 mg/l)			
TE0rep1	TM0rep1	4,7	15,6	TE1rep1	TM7rep5	8,6	18
TE0rep2	TM0rep2	10,1	13,2	TE1rep2	TM7rep6	15,9	16
TE0rep3	TM6rep7	5,2	11	TE1rep3	TM5rep4	0	20
TE0rep4	TM6rep8	8,6	17,9	TE1rep4	TM5rep3	5,5	16,5
TE0rep5	TM5rep1	10	17,4	TE1rep5	TM7rep4	8	17
TE0rep6	TM5rep2	8,1	12,3	TE1rep6	TM7rep5	10,4	14,5
TE0rep7	TM7rep7	8,4	17,7	TE1rep7	TM8rep4	5	14,3
TE0rep8	TM7rep8	14,6	15,7	TE1rep8	TM8rep3	5,2	17
TE0rep9	TM8rep9	9,1	15,8	TE1rep9	TM7rep1	8,1	19,6
TE0rep10	TM8rep10	8,3	17,6	TE1rep10	TM7rep2	6,3	21
TE0rep11	TM7rep9	6,2	25,6	TE1rep11	TM6rep3	13	21,6
TE0rep12	TM7rep10	10,4	20,7	TE1rep12	TM6rep4	9,8	17,5
TE0rep13	TM8rep5	13	15,8	TE1rep13	TM8rep1	11,3	7,7
TE0rep14	TM8rep6	11,6	13,7	TE1rep14	TM8rep2	15,3	15,7
TE0rep15	TM6rep5	9	13,3	TE1rep15	TM6rep1	13	16
TE0rep16	TM6rep6	11,2	18,4	TE1rep16	TM6rep2	8,1	16,8
Promedio		9,28	16,36	Promedio		8,97	16,83

Tratamiento Enraizamiento (TE)	Explanto Fase 2 utilizado (código)	LongRaiz (cm)	LongTallo (cm)	Tratamiento Enraizamiento (TE)	Explanto Fase 2 utilizado (código)	LongRaiz (cm)	LongTallo (cm)
TE2 (AIB 1.0 mg/l)				TE3 (AIB 0.2 mg/l)			
TE2rep1	TM2rep5	14	19,7	TE3rep1	TM1rep5	4,3	26
TE2rep2	TM2rep6	7,1	19,6	TE3rep2	TM1rep6	10,4	24,5
TE2rep3	TM5rep5	13,2	24,5	TE3rep3	TM1rep3	2,6	18,7
TE2rep4	TM5rep6	6,8	11,3	TE3rep4	TM1rep4	8,3	18,7
TE2rep5	TM5rep7	3,4	13,2	TE3rep5	TM3rep3	13	15,8
TE2rep6	TM5rep8	6,1	13,4	TE3rep6	TM3rep4	6	17,3
TE2rep7	TM3rep7	15,1	19,3	TE3rep7	TM3rep5	2,3	16,8
TE2rep8	TM3rep8	11,5	17,1	TE3rep8	TM3rep6	20,1	18,4
TE2rep9	TM2rep3	4,3	24,2	TE3rep9	TM2rep1	5,2	20,4
TE2rep10	TM2rep4	10,5	16,4	TE3rep10	TM2rep2	7,8	20,3
TE2rep11	TM4rep9	14,1	12,2	TE3rep11	TM2rep7	5,8	17,3
TE2rep12	TM4rep10	8,4	11,1	TE3rep12	TM2rep8	5,6	25,2
TE2rep13	TM4rep7	13,2	19,9	TE3rep13	TM2rep9	6,2	17,1
TE2rep14	TM4rep8	12,1	18	TE3rep14	TM2rep10	6,5	16,8
TE2rep15	TM4rep1	10,8	13	TE3rep15	TM6rep9	7,1	17,9
TE2rep16	TM4rep2	7	18,3	TE3rep16	TM6rep10	14,5	14,1
Promedio		9,85	16,95	Promedio		7,86	19,08

Tratamiento Enraizamiento (TE)	Explanto Fase 2 utilizado (código)	LongRaiz (cm)	LongTallo (cm)
TE4 (AIB 1.0 mg/l)			
TE4rep1	TM3rep9	14,6	17,5
TE4rep2	TM3rep10	19,1	25,9
TE4rep3	TM3rep1	10,3	27,6
TE4rep4	TM3rep2	13,1	18,3
TE4rep5	TM0rep5	5,2	27,6
TE4rep6	TM0rep6	5,6	6,4
TE4rep7	TM8rep7	11,1	23,2
TE4rep8	TM8rep8	15,5	22,4
TE4rep9	TM5rep9	9,3	19,8
TE4rep10	TM5rep10	5,2	17,3
TE4rep11	TM0rep9	14,3	20,5
TE4rep12	TM0rep10	19,4	24
TE4rep13	TM4rep3	9,5	19,2
TE4rep14	TM4rep4	6,1	23,2
TE4rep15	TM1rep7	10	22,5
TE4rep16	TM1rep8	10,3	14,7
Promedio		11,16	20,63

Elaborado por: J. Morales, 2015

Anexo 11. Resultados semanales para las variables evaluadas durante el establecimiento de un cultivo axénico de *Solanum caripense*

Tratamiento Desinfección (TD)	Día después de la siembra	Contaminación bacteriana (%)	Contaminación fúngica (%)	Germinación (%)	Índice germinación
TD1	7	0	0	20	7
	14	0	0	54	12.11
	21	0	0	64	16.23
	28	0	0	74	20.34
	35	0	0	78	24.28
	42	0	0	92	28.55
TD2	7	0	0	0	0
	14	2	0	40	14
	21	2	0	50	17.89
	28	2	0	50	21.5
	35	2	0	54	25.26
	42	2	0	64	29.41
TD3	7	0	2	30	7
	14	2	2	32	10.61
	21	2	2	34	14.29
	28	2	2	36	18.03
	35	2	2	52	22.83
	42	2	2	56	27.3
TD4	7	0	0	24	7
	14	0	0	46	11.6
	21	0	0	48	15.42
	28	0	0	48	19.06
	35	0	0	48	22.64
	42	0	0	54	26.54

Elaborado por: J. Morales, 2015

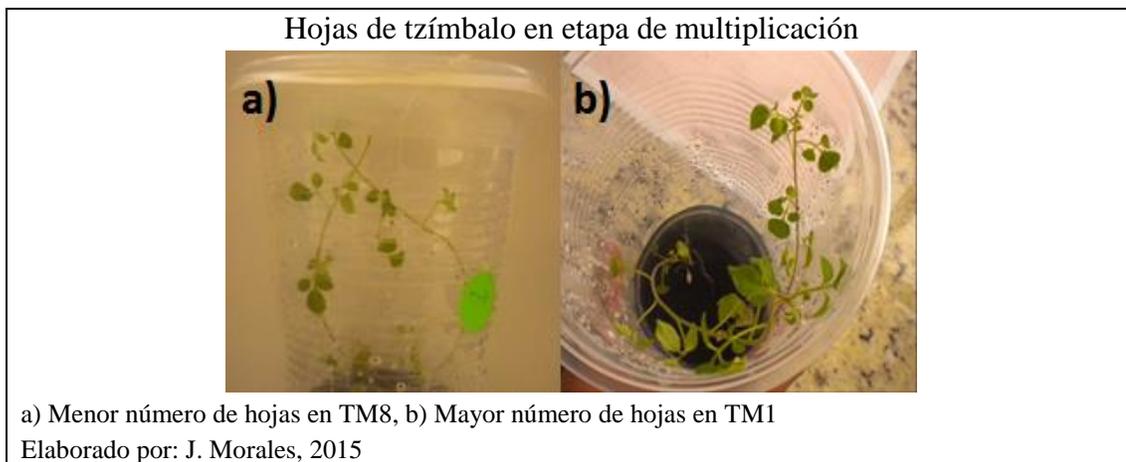
Anexo 12. ANOVA ($p < 0.05$) y promedios para la variable número de hojas de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Número de hojas			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	p-valor
Total	105		
Tratamiento Multiplicación (TM)	8	43.53	0.0412
BAP	2	84.59	0.0193
AIA	2	34.32	0.1938
Error experimental	97	20.56	CV = 36.83

Número de hojas			
Fitohormona	Concentración		Media ± E.E.
BAP (mg/l)	0.0		11.42 ± 0.80 a
	0.5		14.11 ± 0.78 b
	1.0		11.32 ± 0.78 a
AIA (mg/l)	0.0		13.32 ± 0.86
	0.5		12.31 ± 0.72
	2.0		11.23 ± 0.76
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Media ± E.E.
TM0	0.0	0.0	10.25 ± 1.60 ab
TM1	0.5	0.0	16.13 ± 1.60 c
TM2	1.0	0.0	13.57 ± 1.21 abc
TM3	0.0	0.5	12.50 ± 1.21 abc
TM4	0.5	0.5	14.43 ± 1.21 bc
TM5	1.0	0.5	10.00 ± 1.31 a
TM6	0.0	2.0	11.50 ± 1.31 ab
TM7	0.5	2.0	11.79 ± 1.21 ab
TM8	1.0	2.0	10.40 ± 1.43 ab

Nota: Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0.05). Elaborado por J. Morales, 2015

Anexo 13. Hojas de *Solanum caripense* formadas en fase de multiplicación



Anexo 14. ANOVA ($p < 0.05$) y promedios para la longitud del explanto de *Solanum caripense* en fase de multiplicación a los 35 días de la siembra

Longitud del explanto			
Fuente de variación	GL	Cuadrados medios	p-valor
Total	105		
Tratamiento Multiplicación (TM)	8	11.16	0.5145
BAP	2	18.31	0.2312
AIA	2	1.10	0.9150
Error experimental	97	12.32	CV = 26.53

Longitud del explanto			
Fitohormona	Concentración		Media (cm) ± E.E.
BAP (mg/l)	0.0		12.55 ± 0.62
	0.5		14.00 ± 0.61
	1.0		12.99 ± 0.59
AIA (mg/l)	0.0		13.11 ± 0.66
	0.5		13.04 ± 0.56
	2.0		13.37 ± 0.59
Tratamiento Multiplicación (TM)	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	Media (cm) ± E.E.
TM0	0.0	0.0	11.08 ± 1.24
TM1	0.5	0.0	14.78 ± 1.24
TM2	1.0	0.0	13.49 ± 0.94
TM3	0.0	0.5	12.73 ± 0.94
TM4	0.5	0.5	13.06 ± 0.94
TM5	1.0	0.5	13.34 ± 1.01
TM6	0.0	2.0	13.83 ± 1.01
TM7	0.5	2.0	14.15 ± 0.94
TM8	1.0	2.0	12.14 ± 1.11

Nota: Promedios con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa según la prueba de Duncan (≤ 0.05). Elaborado por J. Morales, 2015

Anexo 15. Plántulas de *Solanum caripense* formadas en fase de multiplicación

