

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



INFLUENCIA DEL ÁCIDO GIBERÉLICO (AG₃) Y BENCIL AMINOPURINA (BAP), EN LA PROPAGACION CLONAL IN VITRO DE *Physalis peruviana* L.

TESIS

Para optar el título profesional de

INGENIERO AGRÓNOMO

Presentado por el Bachiller

ELIAS VLADIMIR VENTURA HERNÁNDEZ

ASESOR

Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta

CAJAMARCA – PERÚ

2016

DEDICATORIA

A mis padres José Silvio Ventura Llamo y Ruth Maribel Hernández Rojas, por su amor, cariño, sacrificio, sus buenos consejos y apoyo incondicional y desinteresado, por sus esperanzas y confianza puestas en mí. Para poder culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos Ivan, Pedro y Daniel, tíos y abuelos que de una u otra forma me apoyaron desinteresadamente para cumplir mis logros profesionales.

EL AUTOR

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero y profundo agradecimiento al Ingeniero Segundo Berardo Escalante Zumaeta asesor de la presente tesis y al Ingeniero Manuel Gregorio Malpica Rodríguez, por sus enseñanzas, orientación y apoyo. De igual manera a los docentes de la Escuela Académico Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC).

Especial agradecimiento a la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), Facultad de Ciencias Agrarias por brindarme la facilidad del uso del Laboratorio de Biotecnología Vegetal para llevar a cabo el trabajo de investigación.

A mis padres, hermanos, amigos y compañeros por su incondicional apoyo ya que de una u otra forma contribuyeron en mi formación profesional.

EL AUTOR

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Índice de tablas	<i>vi</i>
Índice de figuras	<i>viii</i>
Resumen	<i>ix</i>
Abstract	<i>x</i>
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Origen, distribución geográfica y requerimientos climáticos del tomatillo	2
2.2. Sinonimia	3
2.3. Descripción botánica	3
2.4. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas superiores	4
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	5
2.6. Micropropagación	9
2.7. Técnicas de micropropagación	10
2.8. Etapas de la micropropagación	11
2.9. Medios de cultivo	12
2.10. Reguladores del crecimiento	16
2.11. Propagación de la especie	19
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación	23
3.2. Materiales	23
3.3. Composición del medio de cultivo	25
3.4. Metodología	25

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
4.1. Fase establecimiento	33
4.2. Fase multiplicación	37
4.3. Fase enraizamiento	48
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	57
ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO	PÁGINA
1. Tratamientos ensayados en las fases de establecimiento y multiplicación de explantas de tomatillo.	26
2. Tratamientos ensayados en la fase de enraizamiento de explantas de tomatillo	27
3. Porcentaje de brotamiento de los explantas por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días de la siembra <i>in vitro</i>	34
4. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de brotes Por explanta (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	38
5. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable número promedio de brotes por explanta (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	39
6. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de hojas del brote mayor (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	41
7. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable número promedio de hojas del brote mayor (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	42
8. Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio del brote mayor (mm)	44
9. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable longitud promedio del brote mayor (mm) por explanta	45
10. Porcentaje de brotes enraizados por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días después de la siembra <i>in vitro</i>	48
11. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de raíces por plántula (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	51
12. Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio de la raíz mayor (mm)	53
13. Componentes del medio de cultivo MS (1962)	63

14.	Resultados de la fase de multiplicación para la variable número de brotes por explanta (números promedios)	64
15.	Resultados de la fase de multiplicación para la variable número de hojas por explanta (números promedios)	65
16.	Resultados de la fase de multiplicación para la variable longitud de brote mayor (mm) por explanta (números promedios)	66
17.	Resultados de la fase de enraizamiento para la variable número de raíces por brote (números promedios)	67
18.	Resultados de la fase de enraizamiento para la variable longitud de raíz mayor en (mm) por plántula (números promedios)	67
19.	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad para la variable número de brotes (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	68
20.	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad para la variable número de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	68
21.	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad para la variable longitud de brote mayor (mm)	69
22.	Prueba de Rango Múltiple Tukey al 5% de probabilidad para la variable número de raíces (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)	69
23.	Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad para la variable longitud de raíz	69
24.	Registro de temperatura y humedad relativa durante la investigación	70

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO	PÁGINA
1. Preparación del medio de cultivo	28
2. Planta <i>in vitro</i> de tomatillo donante de explantas	28
3. Proceso de preparación de explantas de tomatillo.	29
4. Proceso del establecimiento y multiplicación de explantas de tomatillo	30
5. Proceso de la fase de enraizamiento de plántulas de tomatillo	31
6. Porcentaje de explantas brotados por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días de la siembra <i>in vitro</i>	34
7. Número promedio de días necesarios para el inicio del brotamiento de explantas por tratamiento.	36
8. Número promedio de brotes por explanta. Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra <i>in vitro</i> .	39
9. Efecto de los tratamientos en estudio en el número promedio de hojas del brote mayor. Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra <i>in vitro</i>	43
10. Longitud promedio del brote mayor (mm). Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra <i>in vitro</i>	46
11. Porcentaje de plántulas enraizadas por tratamiento. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra <i>in vitro</i>	48
12. Número promedio de días necesarios para el inicio del enraizamiento de brotes de tomatillo por tratamiento.	50
13. Número promedio de raíces por brote. Evaluación realizada a los 30 días después de la siembra <i>in vitro</i>	52
14. Longitud promedio de raíz mayor (mm) por plántula. Evaluación realizada a los 30 días después de la siembra <i>in vitro</i>	53

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la influencia del ácido giberélico (AG_3) y la bencil aminopurina (BAP), en la propagación clonal *in vitro* de *Physalis peruviana* L. Realizadas las evaluaciones, se concluye que el brotamiento de explantas está asociado a la presencia de giberelinas y citocininas. Manteniendo la concentración de BAP entre 0.5 y 1.0 ppm y la concentración de AG_3 sube de 0 a 0.2 ppm el brotamiento se optimiza. El BAP estimula el inicio del brotamiento. Teniendo como mejor tratamiento al (t_6) con (6.5 días) en comparación con los demás tratamientos. La adición de giberelina y citocinina influencia positivamente en la formación de nuevos brotes, el (t_9) estimula la formación del mayor número brotes por explanta (1.63). El mayor número de hojas (3.09) se obtiene en el (t_2). Conforme se incrementa el nivel de citocinina de 0.5 a 1 ppm y en presencia de giberelina, el número de hojas disminuye a (2.23) (t_9). La longitud del brote mayor, varía en función a las hormonas utilizadas. El mejor tratamiento fue el (t_6) el cual produjo brotes mayores con una longitud promedio de 31.1 mm. Cien por ciento de brotes enraizaron bajo el efecto de los tratamientos 2 y 3 con dosis de 2 y 4 ppm de AIB, respectivamente. Adicionalmente, la dosis más alta de AIB (4 ppm) propicia el inicio de enraizamiento en el menor número de días (5.5), así como el mayor número de raíces (2.6) y la mayor longitud de la raíz mayor (59.7 mm) por plántula.

Palabras clave: *Physalis peruviana* L., cultivo *in vitro*, reguladores del crecimiento.

ABSTRACT

This research was conducted out with the objective of determining the influence of the gibberellic acid (AG3) and the benzyl aminopurine (BAP), in the clonal propagation in vitro of *Physalis peruviana* L. In the evaluations, it is concluded that the sprouting of explants is associated with the presence of gibberellins and cytokinins. Keeping the concentration of BAP between 0.5 and 1.0 ppm and the concentration of AG3 rises from 0 to 0.2 ppm the sprouting is optimized. The BAP stimulates the home of the sprouting. Having as best treatment to the (t6) with (6.5 days) in comparison with the other treatments. The addition of gibberellin and cytokinin positively influencing the formation of new shoots, the (t9) stimulates the formation of more shoots by explants (1.63). The largest number of leaves (3.09) is obtained in (t2). As the level of cytokinin 0.5 to 1 ppm and in the presence of gibberellin increases, the number of leaves diminishes (2.23) (t9). The greater shoot length varies according to used hormones. The best treatment was the (t6) which produced shoots higher with an average length of 31.1 mm. One hundred percent of outbreaks arrived under the effect of treatments 2 and 3 doses of 2 to 4 ppm of IBA, respectively. Additionally, the dose more high of AIB (4 ppm) conducive the home of rooting in the lower number of days (5.5), as well as the greater number of estate (2.6) and the greater length of the root greater (59.7 mm) by seedling.

Key words: *Physalis peruviana* L., culture *in vitro*, regulators of the growth.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El “tomatillo” (*Physalis peruviana* L.), es una especie frutal andina perteneciente a la familia Solanáceae, cuyos frutos son importantes para la región cajamarquina por su potencial comercial interno y de exportación (Araujo 2006). Es una planta alógama, principalmente propagada por semilla botánica, debido a lo cual presenta una gran variabilidad fenotípica en su descendencia. Esta característica es indeseable, cuando el cultivo es instalado con fines industriales, pues no existe uniformidad en las características de los frutos, siendo por lo tanto técnicamente necesario obtener variedades comerciales de calidad uniforme, alta productividad y con un hábito particular de crecimiento. Sirve a este propósito la selección y clonaje de genotipos con características superiores. Se selecciona para satisfacer las exigencias del mercado y/o la industria y se practica el clonaje para obtener una descendencia uniforme y con características genéticas estables, a partir del genotipo seleccionado. Una de las formas de clonar el material vegetal seleccionado es la micropropagación de individuos selectos, mediante el cultivo *in vitro* de explantas vegetativas, dentro de los cuales destacan los microesquejes compuestos de un segmento de tallo y una yema vegetativa. Sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido plenamente estudiada en tomatillo.

Las investigaciones realizadas en una especie del mismo género (*Physalis ixocarpa* L.) y con explantas diferentes, señalan que tanto los cotiledones como los hipocotilos generan respuestas morfogénicas cuando se les cultiva *in vitro*, en razón a lo cual, esta técnica puede ser usada para complementar la propagación tradicional (Contreras y Almeida 2003).

En este contexto se inició la presente investigación con el propósito de establecer un protocolo para la propagación clonal *in vitro* de tomatillo. Y que permita alcanzar el objetivo de:

- Determinar la influencia del ácido giberélico (AG₃) y la bencil aminopurina (BAP), en las fases de establecimiento y multiplicación en la propagación clonal *in vitro* de tomatillo.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen, distribución geográfica y requerimientos climáticos del tomatillo

El centro de origen y distribución geográfica del tomatillo no está claramente definido. Por ejemplo, Legge (1974), afirma que esta especie es originaria de los Andes peruanos; sin embargo, un estudio realizado por los países pertenecientes al convenio “Andrés Bello” en el año 1983, determinó una zona más amplia para su origen la cual incluye los Andes ecuatorianos. Almeida y Contreras (2003), afirman que el tomatillo es una Solanácea de rápido crecimiento y frutos comestibles, originaria de México y de amplia distribución en el continente americano. De otro lado, también existen indicios de que proviene del Brasil y fue aclimatado en los altiplanos del Perú y Chile (CRFG 1997).

El tomatillo, fue introducido por los españoles a Sudáfrica hace más de 200 años como fruto anti escorbuto. En Sud América, desde Chile hasta Colombia, crece como planta silvestre y semisilvestre, en zonas altas, entre los 1500 y los 3000 msnm. A parte de Colombia, Sudáfrica es el país de mayor producción, de donde ha sido distribuida a Kenia, Zimbabwe, Australia, Nueva Zelanda, Hawái y la India, países en los cuales se está cultivando comercialmente. Además, hoy se lo encuentra en casi todos los altiplanos de los trópicos (Verheij y Coronel 1991).

En el Perú el tomatillo, se cultiva en la zona agroecológica Quechua, de clima templado a templado frío, en localidades ubicadas en la sierra de Ancash, Huánuco, Junín, Ayacucho, Arequipa y Cuzco, generalmente en huertos familiares, pero también en los bordes de chacras, de zanjas y caminos o intercalados con otros cultivos. En Cajamarca se lo cultiva sobre todo en las provincias de Cajamarca, Chota, Cajabamba y San Marcos y Sam Pablo, lugares en los cuales se ha iniciado su cultivo en forma comercial en pequeñas áreas, existiendo excelentes posibilidades de extender su cultivo hacia otras localidades (Tapia y Fries 2007).

El tomatillo prospera desde el nivel del mar hasta los 3 300 msnm. Puede soportar bajas temperaturas, pero sufre daños irreparables por debajo de 0° C; su crecimiento es afectado si persisten temperaturas menores a 10° C. La temperatura óptima es de 18° C; temperaturas muy altas pueden perjudicar la floración y fructificación. Requiere gran luminosidad y debe protegerse del viento excesivo. Debe contar con suficiente agua durante el crecimiento inicial, no así durante la maduración de los frutos. Es una planta con alto potencial, ya que crece en suelos pobres, bien drenados y requiere baja fertilización (Tapia y Fries 2007).

2.2. Sinonimia

El tomatillo es conocido también como: Aguaymanto, Capulí, Tomate de bolsa, Tomate, Guinda Serrana (Perú); Uchuva, Uvilla, Alquenque, Vejigón, Tomate, Capulí (Colombia); Uvilla, Uchuva, Cereza del Perú (Ecuador); Batesta, Camapú, Camapum, Grosella do Perú, Alquenque amarelo, Groselha do Perú, Tomatinho de capucho (Brasil); Capulí, Motojabobo, Embolsado, Aweillumantu (Bolivia); Bolsa de amor, Capulí (Chile); Huevo de sapo, Topotopo, Cereza de judas (Venezuela); Cereza del Perú (México); Cape gooseberry, Goldenberry, Peruvian cherry (Estados Unidos) (Araujo 2006).

2.3. descripción botánica

El género *Physalis* incluye aproximadamente 100 especies, entre hierbas perennes y anuales (Santana y Anagarita 1997). El tomatillo, es una planta semiperenne, cuyos órganos muestran las siguientes características:

- a. Raíz:** Es fibrosa, pivotante y ramificada. Presenta una profundidad promedio entre 0.5 a 0.8 m, posee coloración amarillo pálido, consistencia suculenta y semileñosa (Fisher 1989). Las raíces que se forman de estacas no son pivotantes y crecen más superficiales, causando un sistema radical débil, una mayor precocidad de la producción y un ciclo de vida más corto de la planta (Tapia y Fries 2007).

- b. Tallo:** Es herbáceo, quebradizo y fuertemente ramificado, de color verde y cubierto de vellosidades, en sus nudos posee varias yemas de donde nace una hoja, otra rama y una flor, su altura promedio es de 1.80 m, con tutores puede llegar a 2.5 m (Fischer 1989).

- c. Hojas:** Son alternas, simples, pecioladas, acorazonadas y altamente pubescentes. Tienen un tamaño entre 5 a 15 cm de largo y 4 a 10 cm de ancho. Una planta en condiciones de crecimiento muy favorables puede formar hasta mil hojas o más y este número depende del desarrollo del tallo (Tapia y Fries 2007).
- d. Flores:** Son solitarias, pedunculadas y hermafroditas, se originan en las axilas y están constituidas de una corola amarilla en forma tubular, originada de 5 pétalos soldados y con 5 puntos morados en su base. El cáliz es gamosépalo, formado por 5 sépalos persistentes. Es veloso con venas salientes y, con una longitud de unos 4 a 5 cm, cubre completamente el fruto durante todo su desarrollo; inicia su alargamiento cuando ha pasado la fecundación del fruto. Durante los primeros 40 a 45 días de su desarrollo es de color verde, pero con la maduración del fruto va perdiendo clorofila volviéndose pergamino al final (Fisher 2000).
- e. Fruto:** Es una baya jugosa en forma de globo u ovoide, de diámetro entre 1.25 y 2.5 cm, pesa de 4 a 10 g, la pulpa está formada por tejido procedente tanto del pericarpio como de la placenta; bajo condiciones favorables de crecimiento, la producción de frutos de mayor tamaño ocurre durante el primer pico de la cosecha, y el menor número de ellos durante el primer año de cultivo (Velásquez 2003).
- f. Semillas:** Son muy pequeñas, ovaladas-achatada, en cada fruto y entre ecotipos existen desde 150 a 320 semillas, las cuales son de color amarillo grisáceo. Un gramo puede contener más de 1000 semillas, logran conservar su capacidad germinativa por 2 a 3 años cuando las condiciones de conservación son favorables. En semillas frescas se obtiene un porcentaje mayor al 90 % de germinación (Medina 1991).

2.4. Cultivo *in vitro* de plantas superiores

Se define como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos. El termino cultivo *in vitro* es

un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir “dentro de vidrio”, es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado. Existen otros términos cuyo significado se solapa parcialmente con el significado de cultivo *in vitro*: cultivo de tejidos vegetales, que se refiere al cultivo *in vitro* de partes de la planta (tejidos o frecuentemente órganos); micropropagación que se usa para referirse a la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la propagación vegetativa de plantas. Esta técnica se está utilizando de forma extensa, tanto en laboratorios como en la industria, con diversas finalidades como: germinación de semillas, multiplicación vegetativa, obtención de plantas “libres” de virus, producción de haploides, estudios fisiológicos diversos y obtención de híbridos (Pierik 1988).

2.5. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en aislar una porción de una planta (tejido, órgano o célula), llamado explanta, para cultivarlo en un medio nutritivo, en condiciones físicas y químicas artificiales. El objetivo es conseguir que las células expresen su totipotencialidad, que no es más que la capacidad que tienen las células vegetales de regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo. Cuando los explantas se cultivan en condiciones apropiadas, es posible inducir la formación de estructuras organizadas y la formación de plantas completas. Si la formación de la planta completa se realiza mediante la formación de brotes o yemas adventicias y posterior enraizamiento de éstos, se dice que el procedimiento es de organogénesis. Pero si la regeneración se obtiene a través de estructuras semejantes a los embriones sexuales, se dice que la vía es embriogénesis somática (Roca y Ramírez 2000).

La producción de plantas superiores se centra en técnicas de cultivo de tejidos vegetales iniciado por Haberlandt a finales del siglo XIX, en la actualidad las propiedades únicas de regeneración de planta y su potencial bioquímico se utiliza esencialmente en 3 vertientes: propagación *in vitro* en silvicultura y horticultura; producción de metabolitos secundarios a

partir de cultivos en masa de células vegetales; y la utilización de técnicas de DNA recombinante para modificaciones genéticas de las plantas (Brown *et al.* 1989).

2.5.1 Explanta

Según Roca y Mroginski (1991), explanta es un fragmento de tejido o célula, aislado del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección de un explanta apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Si el objetivo final es la obtención de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantas que, cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación callosa. Cualquier explanta que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos. Esta facilidad para la proliferación callosa puede hacerse extensiva a células y protoplastos, con el empleo de técnicas y medios de cultivo más elaborados.

2.5.2. Asepsia

Mroginski *et al.* (2010) sostienen que uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, y virus). El ambiente generado por explanta, medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación son altamente propicios para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos, competir con el explanta por el medio de cultivo o modificarlo. En consecuencia evitar la contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos si no en su posterior incubación y manipulación. Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explanta persistan en los cultivos (Roca y Mroginski 1991).

3.5.3. Cultivo de células y tejidos desdiferenciados

Las células del explanta por ejemplo, del parénquima de la hoja, comienzan a dividirse de manera acelerada y desorganizada formando una masa de células denominadas callo. Estas células ya no son células parenquimatosas en virtud de que han sufrido una desdiferenciación parcial o total. Los callos pueden ser mantenidos en este estado por largos periodos y transferírseles en forma periódica a medios de cultivo frescos (Robert *et al.* 2004).

a. Organogénesis

Litz y Jarret (1991) definen organogénesis como el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantas directamente o a partir de callos.

Según Robert *et al.* (2004), cuando un callo es cultivado bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes, pero sobre todo cuando el cociente citocinina/auxina es elevado, algunas células inician una división ordenada (promeristemas) para dar lugar a un brote que se desarrolla en un tallo (caulogénesis). Al transferirse a un medio fresco con un cociente menor de citocinina/auxina o, en muchos casos, carente de citocininas se induce la formación de raíces en la base de los tallos (rizogénesis). A elevadas concentraciones de auxinas los callos forman raíces directamente, pero éstas son incapaces de formar tallos al transferirlas a un medio con elevada citocinina. Si los brotes son transferidos a un medio con citocinina en lugar de hacerlo a un medio de enraizamiento, es posible inducir la formación de nuevos brotes adventicios en su base, este proceso de multiplicación puede repetirse indefinidamente antes de transferirlos a un medio de enraizamiento.

b. Cultivo de meristemas

Según Azcón-Bieto y Talón (2008), se denomina meristemo al conjunto de células indiferenciadas responsables del crecimiento de la planta. El meristemo apical, que se localiza en el ápice del tallo principal, es el responsable de su

crecimiento. Los meristemos axilares se forman en las axilas de las hojas y son los responsables del crecimiento de las ramas laterales.

El cultivo de yemas axilares y, principalmente, de yemas apicales es de gran importancia por dos razones: la primera porque siendo ya tejidos organizados presentan una gran estabilidad genética. La segunda es, que los meristemos apicales se encuentran por lo general libres de patógenos. Los meristemos son extremadamente pequeños (0.8 mm) y su aislamiento de la planta madre debe realizarse bajo el microscopio, lo cual requiere de gran cuidado y habilidad para remover los primordios foliares sin maltratar el ápice. Los meristemos se desarrollan directamente en tallos que pueden seguir las rutas ya descritas para los tallos rediferenciados de callo. El desarrollo de los meristemos no es un proceso de *novo* pues se trata de un tejido ya organizado. En algunos casos, los meristemos se injertan directamente en un patrón tierno, por lo general el brote de una semilla germinada *in vitro* que es decapitado para recibir un nuevo ápice. Este proceso llamado microinjertación es de gran importancia para el cultivo de algunas especies arbóreas (Robert *et al.* 2004).

c. Embriogénesis

Jordan (2005) define embriogénesis como la generación de un embrión somático y posteriormente de plántulas, a partir de una célula somática (o en algunos casos gamética). Este proceso, bajo condiciones *in vitro*, reviste las mismas etapas de desarrollo que ocurren *in vivo*. Pueden formarse embriones somáticos en forma directa o indirecta; la primera es a partir de una sola célula aislada flotando en un medio de cultivo o fijada a un sustrato, generalmente derivada de una suspensión celular. La segunda forma de generación indirecta, ocurre igualmente a partir de una sola célula que forma parte de un tejido no organizado (callo) o de un órgano (por ejemplo cotiledones, hoja, hipocótilo) que se cultiva *in vitro*.

d. Cultivo de células haploides

Se denomina célula haploide a aquella que posee la mitad del número cromosómico normal contenido en las células somáticas de la especie. Cuando los gametos, polen u óvulos son empleados como explanta inicial el resultado es una planta que posee la mitad del número cromosómico de la especie. Una división desorganizada de las células genéticas origina un callo haploide, pero si se emplea el balance correcto de reguladores se produce un desarrollo organizado desde las primeras divisiones que origina embriones. El aspecto técnico más importante de esta metodología es que los gametos deben encontrarse en el estadio correcto para ser embriogénicos. El cultivo de células haploides tiene grandes aplicaciones ya que pueden ser genéticamente modificadas antes de inducir de nuevo su diploidización por métodos químicos (tratamiento con colchicina). El resultado es la generación de plantas *dihaploides* que expresan un solo alelo para todas sus características y que son de enorme valor para los programas de fitomejoramiento (Robert *et al.* 2004).

2.6. Micropropagación

La propagación *in vitro*, llamada micropropagación, fue establecida por Boxus en 1974; como un sistema orientado a lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas y a partir de porciones vegetales muy pequeñas tales como fracciones de tallo o semilla; ápices caulinares o radiculares, callos, células aisladas, granos de polen, etc. Actualmente su aplicación a plantas *in vitro* de papa, “libres” de patógenos, obtenida por cultivo de meristemos, abre las puertas de una importante vía de multiplicación y obtención de un considerable número de nuevas plántulas en un tiempo relativamente corto, las cuales reúnen los más altos niveles de pureza varietal y estado sanitario (Escalante 1989).

La micropropagación tiene una amplia aplicación en cultivos comerciales como plantas ornamentales, frutales, forestales y especies hortícolas comestibles. En América Latina existen unos 180 laboratorios de micropropagación de variada capacidad. De éstos, sólo 50 desarrollan propagación de plantas a nivel comercial. Sin embargo, son pocos los que

alcanzan niveles de producción superior al millón de plantas al año. Las plantas para las cuales se han desarrollado técnicas de micropropagación incluyen principalmente ornamentales, herbáceas, frutales y forestales, aunque la propagación masiva (a nivel comercial) es más utilizada con las ornamentales (Roca y Ramírez 2000).

La micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aun en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación tales como: reducción del tiempo de multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control sanitario del material que se propaga, facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos. Debido a que la micropropagación se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener “variantes” fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo, eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro*. Las plantas que vienen de un mismo meristemo, ápice, o estaca son llamadas “clones” (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

2.7. Técnicas de micropropagación

Roca y Mroginski (1991) sostienen que el cultivo de tejidos *in vitro* comprende un amplio y heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explanta se cultiva asépticamente, en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. En segundo término los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro*, son numerosas y diferentes y se puede resumir: Estudio básico de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines, bioconversión y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libre de patógenos, conversión e intercambio de germoplasma y propagación de plantas.

Según Villalobos y Thorpe (1991), las técnicas de micropropagación han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, y en consecuencia a un aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficientes de las

plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo *in vitro*: Mejoramiento genético, obtención de plantas “libres” de virus y otros patógenos, conservación del germoplasma y micropropagación.

Las técnicas de micropropagación, no sólo permiten mantener la homogeneidad o constancia del genotipo (salvo excepciones), sino que también perpetúan la condición fisiológica de los explantas. Por ejemplo, expresar y mantener la condición de juvenilidad o madurez existentes en los explantas maternos, o de poder mantener o de capturar rasgos poco comunes en una población. Igualmente por ejemplo, perpetuar hábitos arbustivos o de tronco en poblaciones de ambas características. De igual manera, material en floración o con yemas florales, generará material con expresión inmediata de características adultas. La micropropagación es además, la herramienta central en la amplificación de material genético de alta calidad, permitiendo además, el establecimiento y perpetuación de germoplasma o genotipos modificados a través de la ingeniería genética (Jordan 2005).

2.8. Etapas de la micropropagación

La micropropagación presenta 4 etapas principales: establecimiento del cultivo, desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, enraizamiento y aclimatación de las plántulas. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinar y radicular. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantas para el establecimiento (Olmos *et al.* 2010).

a. Etapa 0: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explanta incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explanta. Los factores que influyen sobre la calidad del explanta son: el tipo de órgano que sirve como explanta, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.* 2010).

b. Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explanta a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantas. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas (Olmos *et al.* 2010).

c. Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (sub cultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo (Olmos *et al.* 2010).

d. Etapa 3: Enraizamiento y aclimatación

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan

diferentes substratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales convienen que estén debidamente desinfectados (Olmos *et al.* 2010).

2.9. Medios de cultivo

Para mantener la viabilidad de un cultivo de tejidos, estimular su diferenciación y guiar su crecimiento, este requerirá de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosas investigaciones y que permite que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro* (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal *in vitro* y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Boeri 2015).

El éxito que se obtenga el cultivo *in vitro* de especies vegetales depende del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. (Hurtado y Merino 1988).

2.9.1. Componentes del medio de cultivo

a. Componentes inorgánicos

- **Agua**

Es el componente más abundante de los seres vivos, pudiendo constituir aproximadamente hasta el 90 % del peso fresco de los mismos. Por eso, no sólo es fundamental en el medio nutritivo, sino que también es el componente principal de la planta. Sus propiedades físicas y químicas son resultantes de su estructura molecular. A pesar de ser eléctricamente neutra, es un dipolo que presenta carga positiva y negativa. Una consecuencia de esto, es su capacidad de disolver o neutralizar la atracción de cargas eléctricas de cristales como NaCl, los cuales son

desarmados como tales para ser convertidos en iones hidratados aislados (Barrueto 2005).

Es importante tener en cuenta que la calidad de agua a utilizar en la preparación de los medios de cultivo, debe ser bi-distilada en destiladores de vidrio y ser utilizada tan pronto como haya sido obtenida; de lo contrario, guardarla en envases de vidrio y en forma estéril, para así evitar una acumulación progresiva de bacterias y otros contaminantes que limitarían el éxito del cultivo (Escalante 1989).

- **Sales minerales**

El primer objetivo en la preparación del medio de cultivo es suministrar los elementos minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl); además, existe evidencia de que se debería añadir níquel a la lista (Krikorian 1991).

Los macronutrientes son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de g.L^{-1} (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Quizá los requerimientos minerales más obvios son los de fósforo (necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos), de azufre (aminoácidos, cisteína y metionina) o nitrógeno (el segundo elemento tras el carbono entre los que forman la célula). Aunque se pueden utilizar fuentes orgánicas, es común usar como fuente de fósforo un fosfato, la de azufre como un sulfato y la de nitrógeno como nitrato o una sal de amonio (Boeri 2015).

Los micronutrientes (nutrientes necesarios en pequeñas cantidades) son elementos que la planta requiere en cantidades del orden de mg.L^{-1} (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B): Son esenciales para el funcionamiento de varias enzimas, y deben estar incluidos en el medio de cultivo. Su requerimiento en muy baja cantidad determina que frecuentemente no sea necesario añadirlos expresamente: es suficiente su presencia como contaminantes de otros componentes. No obstante si se utilizan

componentes y agua de pureza muy altas los medios de cultivo pueden ser deficientes en micronutrientes (Boeri 2015).

b. Compuestos orgánicos

- **Vitaminas**

Los complejos vitamínicos contienen elementos esenciales para las plantas. Aunque las vitaminas normalmente son sintetizadas por ellas, son también requeridas para su crecimiento y diferenciación cumpliendo un rol catalítico en el metabolismo celular. Cuando las células de plantas superiores son cultivadas *in vitro*, la ausencia de vitaminas constituye un factor limitante del crecimiento. No obstante, estas necesidades dependen de la especie considerada. Las vitaminas que son adicionadas más usualmente en medios de cultivo son: tiamina-HCl, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, riboflavina (Boeri 2015).

- **Aminoácidos**

Entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado más frecuentemente como beneficiosos está la L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina. Otros compuestos comúnmente empleados en el cultivo de tejidos son el inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico, para evitar la oxidación de los tejidos (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

- **Fuentes de carbono**

Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg.L⁻¹) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).

- **Agentes solidificantes (Agar)**

Se añaden para preparar medios de cultivo sólidos y semisólidos. El agar-agar es el agente solidificante más utilizado. El agar-agar es un polisacárido de galactosa y galactomanano que se obtiene de las algas rojas (*Echema*, *Gelidium*, *Gracilaria*). Contiene un 70 % de agarosa y un 30 % de agarpectina. Su composición química es indefinida y solidifica con mayor dificultad a medida que desciende el pH. Es insoluble en agua fría, pero se funde y solubiliza en agua hirviendo y solidifica a 45 °C. Forma geles transparentes muy estables y es degradado por muy pocas bacterias. La concentración de agar en los medios de cultivo sólidos es variable y depende de la calidad, pero usualmente es de 0.7 a 1.5 %. Los medios que tienen altas concentraciones de sales requieren de un porcentaje alto de agar (Boeri 2015).

- **Otros compuestos**

Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0,1 a 5 %) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos (Mroginski *et al.* 2010).

c. pH del medio de cultivo

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5,8 y es ajustado con HCl o NaOH 1N, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante. En ocasiones se agrega soluciones tampón (MES), debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado y, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanta (Boeri 2015).

2.10. Reguladores del crecimiento

La mayoría de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro* necesitan de estas biomoléculas. No obstante, la concentración y el tipo de regulador del crecimiento dependerán de cada caso. En general, son 3 grupos de reguladores de crecimiento los más empleados: auxinas, citoquininas y giberelinas. Existen otras 2 biomoléculas muy importantes; el etileno y el ácido abscísico, que aunque son menos utilizados, juegan papeles importantísimos dentro del metabolismo del explanta *in vitro*. Por ejemplo, el etileno es capaz de activar enzimas relacionadas con la senescencia y oxidación fenólica del tejido y en cambio el ácido abscísico es un compuesto hormonal que tiene más acción inhibitoria que estimuladora (Barrueto 2005).

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones. A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury y Ross 1994).

Weaver (1976) considera que los reguladores del crecimiento; son compuestos orgánicos, diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de alguna forma cualquier proceso fisiológico vegetal. Las hormonas de las plantas o (fitohormonas) son reguladores producidos por las mismas plantas que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas. Por lo común las hormonas se desplazan en el interior de las plantas, de un lugar de producción a un lugar de acción.

a. Auxinas

El término auxina designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico pero a menudo se usa como sinónimo del ácido indolacético (AIA) que es la principal auxina natural y que posiblemente se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. La auxina se sintetiza principalmente en el ápice del tallo y ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes y en general en los meristemos (Rojas y Ramírez 1993).

Las auxinas estimulan el agrandamiento y alargamiento celular y promueven la división celular en cultivos de tejidos. Se adicionan combinadas con citocininas durante la etapa de multiplicación o sin ellas, en la etapa de enraizamiento. Se transporta polarmente, a través del floema, desde los ápices (caulinares y radicales). Junto con las citocininas, son esenciales para la viabilidad de las plantas. Su estructura química es muy variable, pueden acumularse en formas inactivas conjugadas a oligosacáridos y aminoácidos (Boeri 2015).

El ácido indolacético (AIA) es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento. Es fotosensible, por lo que no es conveniente utilizarlo en cultivo en suspensión. Por ser hormona natural, su desaparición del tejido es muy rápido ya que en las plantas se encuentran las enzimas oxidasas de la que hidrolizan a la hormona de manera que su efecto es suave y de poca duración. Las auxinas sintetizadas químicamente son: el ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético y ácido indolbutírico (AIB). Todos resultan esenciales para el cultivo de meristemos, en los procesos de morfogénesis directa e indirecta, en la inducción de embriogénesis somática, y en el enraizamiento de microesquejes actúan promoviendo el crecimiento de ápices caulinares (Boeri 2015).

b. Citocininas

Son sustancias del crecimiento de las plantas que provocan la división celular. Muchas citocininas exógenas y todas las endógenas derivan probablemente de la adenina, una base nitrogenada de purina. La primera citocinina fue descubierta en la década de 1950

en la Universidad de Wisconsin, por el grupo del profesor Folke Skoog, a partir de una muestra de DNA envejecido (Weaver 1976).

Las citocininas se sintetizan principalmente en la raíz, y su presencia en las yemas del tallo, (donde tienen efecto hormonal) puede ser por transporte vía floema desde la raíz pero hay informes de su síntesis en las hojas por tener adenina en su molécula. Se cree que provenga parcialmente de productos de hidrólisis de fracciones de ácidos nucleicos (Rojas y Ramírez 1993).

Dentro de las citocininas naturales se encuentra la Zeatina, que se extrae del endospermo del maíz, y 6 isopentanol adenina (2iP), aislada de *Clostridium italicum*, ésta produce un sobre crecimiento de los tejidos. Las citocininas sintéticas son: 6-benciladenina (6 BA), también conocida como bencil aminopurina (6 BAP); la kinetina (KIN) también conocida como 6-furfurylamino purina (FAP). La kinetina fue la primera citocinina identificada producida por la degradación térmica del ADN (Boeri 2015).

c. Giberelinas

Se encuentran naturalmente en las plantas y produce un alargamiento de las células, elongación de los entrenudos y el crecimiento meristemático. También inducen la ruptura de dormancia de embriones aislados o semillas. En general, inhiben la formación de tallos y raíces adventicias. De todas las giberelinas, es el Ácido giberélico (AG₃) el más utilizado en propagación *in vitro* (Boeri 2015).

Las giberelinas se sintetizan principalmente en las hojas jóvenes y en las semillas en cuyo endospermo se ha encontrado un receptor no identificado. El nivel de GA₃ aumenta conforme desarrolla el embrión y luego decrece cuando la semilla madura. Las giberelinas actúan sobre el RNA desreprimiendo genes que en algunos casos se han identificado. A diferencia de las auxinas la acción estimulante del crecimiento se manifiesta en un rango muy amplio de concentraciones lo cual parece indicar que el

número de receptores es muy grande o bien hay una continua síntesis de ellos (Rojas y Ramírez 1993).

2.11. Propagación de la especie

a. Propagación sexual

La propagación sexual involucra una serie de acontecimientos metabólicos y morfogénicos que van desde el momento de la polinización y formación de la semilla, y tienen como resultado la transformación de un embrión en forma de una plántula capaz de valerse por sí sola y transformarse en una planta adulta. La semilla es el producto de la fecundación del ovulo por el polen bien sea en forma autógena o con ayuda de agentes polinizadores, en el caso del tomatillo, las flores amarillas y campaniformes son polinizadas fácilmente por los insectos o por el viento, lo cual origina que en una misma plantación se encuentren frutos con características diferentes como: variación en el crecimiento, vigor, rendimiento y calidad del fruto (Almanza 2000).

b. Propagación asexual

La ventaja más importante de la propagación vegetativa es permitir la reproducción de una planta (clon) notable por su rendimiento, resistencia, calidad y otros factores, en individuos de características iguales a la planta madre. La propagación por esquejes es recomendable cuando se desea mantener un excelente material genético, un porte de planta más bajo con una producción más rápida y uniforme. Dentro de la multiplicación de plantas, el sistema asexual garantiza una rápida, segura y eficiente emisión de raíces. Para que esto funcione, es necesario que los esquejes presenten un enraizamiento vigoroso y uniforme, tanto en calidad como en longitud, lo cual se logra por medio de la adición de sustancias que promuevan un desarrollo más acelerado de la rizogénesis para obtener material propagado en menor tiempo (Almanza 2000).

c. Propagación *in vitro*

En un ensayo realizado en laboratorio, Torres *et al.* (1991), citado por Almanza (2000), tomaron de plantas jóvenes de tomatillo. (4 a 6 meses) yemas laterales y apicales para propagarlas por meristemos. Encontraron que el mejor tratamiento fue el suplementado con 5 mg. L⁻¹ de BAP (6 – Bencil aminopurina), donde las yemas apicales regeneraron una plántula entre los 15 y 20 días posteriores a la siembra, mientras que las yemas laterales lo hicieron a los 30 días, con 5 a 8 brotes.

En *Physalis ixocarpa* L., Contreras y Almeida (2003), determinaron que tanto los cotiledones como los hipocótilos generan respuestas morfogénicas cuando se les cultiva *in vitro*. Bajo estas condiciones, la Zeatina sola (2 mg.L⁻¹) y Bencil-Adenina (2 mg.L⁻¹) en combinación con Ácido Indolacético (0.5 mg.L⁻¹), son buenos inductores de la morfogénesis. El número de plantas neo - regeneradas a partir de los explantas mencionados, indica que esta técnica *in vitro* puede ser usada para complementar la propagación tradicional. La rápida respuesta para la producción de vástagos *in vitro*, representa otra ventaja al momento de planificar un programa de multiplicación masiva del tomatillo.

Rache y Pacheco (2012) establecieron un protocolo de micropropagación de tomatillo a partir de yemas axilares tomadas de plantas adultas que permite la producción masiva de plántulas con características deseables en la producción. Este protocolo comprende: establecimiento de cultivos en Murashige & Skoog, 1962 (MS) sin reguladores de crecimiento durante 30 días y sub cultivo en MS con 0.05 mg.L⁻¹ de AIB más 0.1 mg.L⁻¹ de BA, durante 60 días; multiplicación a partir de segmentos nodales cultivados en MS con 0.05 mg.L⁻¹ de AIB más 0.1 mg.L⁻¹ de BA; enraizamiento de microtallos en MS sin reguladores del crecimiento y aclimatación de plántulas en condiciones controladas utilizando como sustrato tierra, arena y cascarilla de arroz en proporción 3:1:2.

Contrariamente, Barriga *et al.* (2008), con el fin de estandarizar una técnica adecuada para la implementación de cultivos *in vitro* de *Physalis peruviana* Linneo

(Uchuva), diseñó 3 medios de cultivo para sembrar material foliar de 3 ecotipos de esta especie promisoría, distribuidos en los municipios Colombianos de labio y Cota (Cundinamarca) y Villa de Leyva (Boyacá). 3 medios de cultivo, a partir del medio Murashige & Skoog fueron preparados, cada uno con concentración diferente de Kinetina, Auxinas y Giberelinas, con una concentración de sales basales de $4,7 \text{ g.L}^{-1}$. El medio de cultivo con concentración de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de KIN; $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AG y $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA fue el único que permitió la formación de callos y plántulas en el material vegetal.

Para la micropropagación de *Physalis ixocarpa* L., Garcia-Osuna *et al.* (2015), evaluaron la combinación de los reguladores Bencil Aminopurina (BAP), Kinetina y Ácido Naftalenácetico (ANA) a diferentes concentraciones. El mejor tratamiento fue con 3 mg L^{-1} de BAP con 9.5 brotes regenerados por explanta (segmentos nodales).

Andrade-Rodríguez *et al.* (2005) determinaron que la capacidad de propagación *in vitro* del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* L.), varió en función del genotipo de la variedad utilizada. Evaluaron la combinación de 1.5 mg.L^{-1} de bencil aminopurina (BAP) y 1.5 mg.L^{-1} de Ácido Indolacético en la inducción de brotes y las mejores respuestas se obtuvieron en las variedades ‘Tamazula’, ‘CHF1-Chapingo’ y ‘salamanca’ las que produjeron de 20.4 a 21.3 brotes por explanta (segmentos de hipocótilo).

Manzo-González *et al.* (1998) determinaron que a través de la técnica del cultivo de tejidos, es posible la regeneración de plantas de *Physalis ixocarpa* Brot. Y que los explantas más apropiados para la regeneración de plantas, son los segmentos de tallo y hoja. Para inducir organogénesis en la Var. “Rendidora”, el medio de cultivo más adecuado fue el MS suplementado con 3.0 mg L^{-1} de BA más 0.1 mg L^{-1} de AIA.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), ubicado a 2703 msnm. En las coordenadas 07°10' 06.35" S. y 78° 29' 42.70" W, Distrito, Provincia y Región Cajamarca - Perú. Dentro del laboratorio se registró una temperatura promedio 29 °C, con una máxima de 34° C y mínima de 24 °C. La humedad relativa promedio fue de 45%, y el fotoperiodo fue regulado a 16/8 horas de iluminación y oscuridad, respectivamente.

3.2. Materiales

3.2.1. Material biológico

Yemas axilares de tomatillo, obtenidas de plantas *in vitro* de 2 meses de edad, procedentes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC).

3.2.2. Reactivos

- Constituyentes del medio basal: Murashige y Skoog (1962) (tabla 13 del anexo 1)
- Reguladores del crecimiento: Ácido Giberélico (AG₃), Bencil Aminopurina (BAP) y Ácido Indol Butírico (AIB).
- Agar (AGAR AGAR ING)
- Sacarosa
- Hipoclorito de sodio al 2 %
- Ácido clorhídrico (HCl 0.1 N), Hidróxido de potasio (KOH 0.1 N)
- Alcohol Etilico al 70 %
- Agua destilada estéril

3.2.3. Material de vidrio

- Tubos de ensayo de 10 x 1.5 cm
- Placas Petri de 9 y 11 cm de diámetro
- Probeta de 250 ml
- Matraces de 125, 250, 500 y 1000 ml
- Beakers de 500 y 1000 ml
- Embudo
- Frascos para reactivos de 100 ml de capacidad
- Mechero de alcohol

3.2.4. Equipos

- Hornilla eléctrica con resistencia espiral (INSEGESA)
- Cámara de flujo laminar (ENVIRCO)
- Balanza analítica (OHAUS)
- Agitador magnético (NUOVA II)
- Autoclave
- Refrigerador (COLDEX)
- PH-metro (SCHOTT / HANDILAB 1)
- Destilador de agua (WD 3 RK)
- Equipos fluorescente de 40 W (PHILIPS)
- Estufa (CAUTION)
- Estereoscopio (HERTEL Y REUSS)

3.2.5. Otros

- Papel aluminio
- Parafilm
- Algodón
- Gradillas
- Pinzas de metal
- Mangos de bisturí de metal n° 7

- Hojas de bisturí nº 11
- Cámara fotográfica (CANON) Power Shot ELPH 160
- Jeringas hipodérmicas de 1, 5, 10 y 20 ml
- Plumones marcadores Faber Castell

3.3. Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento de explantas de tomatillo (microesquejes con yemas axilares) es el medio basal completo Murashige y Skoog, 1962 (Tabla 13 del anexo 1), constituido por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos, suplementado con sacarosa (30 g.L⁻¹) y agar (AGAR AGAR ING. 9 g.L⁻¹), además de los balances hormonales correspondientes a cada tratamiento (Tablas 1 y 2).

3.4. Metodología

3.4.1. Factores, niveles y tratamientos en estudio

Las concentraciones de los reguladores del crecimiento fueron establecidos en función a otras investigaciones realizadas anteriormente. Garcia – Osuna *et al.* (2015), establecen que la bencil amonopurina es la citocinina más indicada para la micropropagación de (*Physalis ixocarpa*). De otro lado (Santana y Angarita 1997), recomiendan emplear combinaciones de ácido giberélico y bencil aminopurina para estimular la regeneración adventicia de plantas de tomatillo.

Factor A: Ácido Giberélico (AG₃)

Niveles: a₀ = 0.0 ppm

 a₁ = 0.20 ppm

 a₂ = 0.40 ppm

Factor B: Bencil Aminopurina (BAP)

Niveles: $b_0 = 0.0$ ppm

$b_1 = 0.5$ ppm

$b_2 = 1.0$ ppm

a. Fases de establecimiento y multiplicación

Tabla 1. Tratamientos ensayados en las fases de establecimiento y multiplicación de explantas de tomatillo

Tratamientos		MS (1962) 1X suplementado + balance hormonal (ppm)
N°	clave	Fase establecimiento y Fase multiplicación
1	$a_0 b_0$	AG ₃ (0.0 ppm) + BAP (0.0 ppm)
2	$a_0 b_1$	AG ₃ (0.0 ppm) + BAP (0.5 ppm)
3	$a_0 b_2$	AG ₃ (0.0 ppm) + BAP (1.0 ppm)
4	$a_1 b_0$	AG ₃ (0.2 ppm) + BAP (0.0 ppm)
5	$a_1 b_1$	AG ₃ (0.2 ppm) + BAP (0.5 ppm)
6	$a_1 b_2$	AG ₃ (0.2 ppm) + BAP (1.0 ppm)
7	$a_2 b_0$	AG ₃ (0.4 ppm) + BAP (0.0 ppm)
8	$a_2 b_1$	AG ₃ (0.4 ppm) + BAP (0.5 ppm)
9	$a_2 b_2$	AG ₃ (0.4 ppm) + BAP 1.0 ppm)

b. Enraizamiento

Esta fase se desarrolló adicionalmente al objetivo de la investigación. Con la finalidad de establecer un protocolo para el enraizamiento de brotes de tomatillo, donde se probaron 3 dosis de ácido indolbutírico (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos ensayados en la fase de enraizamiento de explantas de tomatillo

Tratamientos	MS (1962) 1X suplementado + Ácido Indol Butírico
1	MS + (0.0 ppm AIB)
2	MS + (2.0 ppm AIB)
3	MS + (4.0 ppm AIB)

3.4.2. Diseño Experimental

Para las fases de establecimiento y multiplicación se utilizó un diseño estadístico Completamente Randomizado (DCR), con arreglo factorial 3 x 3 con nueve tratamientos, tres repeticiones y diez unidades experimentales por cada tratamiento. Para la fase de enraizamiento se utilizó un DCR con tres tratamientos, tres repeticiones y diez unidades experimentales por tratamiento.

3.4.3. Conducción del experimento

a. Preparación del medio de cultivo

Se realizó mezclando las sales que componen el medio MS, 1962, sacarosa y agar según las cantidades indicadas en la (Tabla 13 del Anexo 1). A esta mezcla se le agregó los reguladores del crecimiento, según las dosis correspondientes a cada tratamiento en estudio (Tabla 1). Luego se procedió a ajustar el pH de los medios de cultivo los cuales fueron ajustados a 5.7, con KOH 0.1 N y HCl 0.1 N, uniformizando la mezcla con el agitador magnético (Fig. 1). A continuación, los medios preparados se distribuyeron de manera uniforme en los tubos de ensayo de en volúmenes de 3 ml por tubo, tapando la boca del tubo con papel aluminio, e identificando cada tratamiento. Seguidamente, se procedió a esterilizar los medios en la autoclave a 121° C y 15 libras de presión, durante 20 minutos. Finalmente los tubos de ensayo conteniendo a los

medios de cultivo estériles fueron conservados en un refrigerador (5 °C) hasta su utilización.

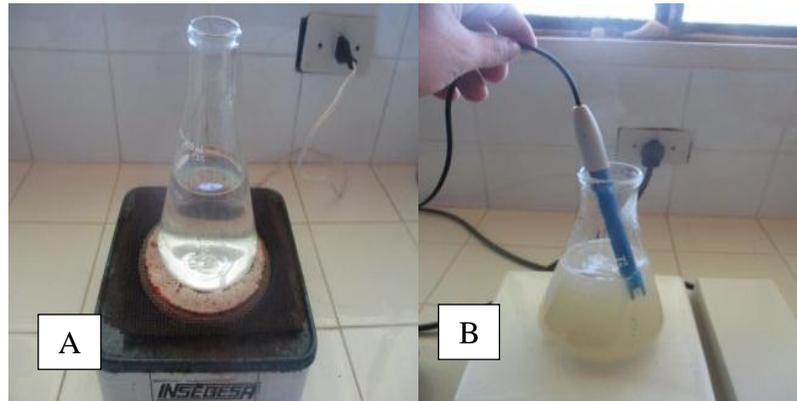


Figura 1. Preparación del medio de cultivo: (A) Calentamiento del agua destilada estéril para mezclar los componentes del medio de cultivo, (B) medición y ajuste del pH del medio de cultivo a un valor de 5.7

b. Selección del material vegetal

Las plantas *in vitro* donantes de explantas (microesquejes compuestos de un segmento de tallo de 1 a 1.5 cm de largo y una yemas axilar en la parte central) las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca (UNC), estas plantas fueron seleccionadas en base al tamaño, número de yemas y color de follaje (Fig. 2).



Figura 2. Planta *in vitro* de tomatillo, donante de explantas

c. Preparación del explanta

Bajo condiciones asépticas, cada planta *in vitro*, previamente seleccionada, fue extraída de su envase y puesta en una placa petri estéril, y con la ayuda de pinzas y bisturí debidamente esterilizadas se procedió a eliminar las hojas, yema terminal y raíces, quedando solamente el tallo con 3 a 5 yemas axilares. Seguidamente se procedió a segmentar el tallo hasta obtener los microesquejes con yemas axilares. Cada microesqueje estuvo formado de un segmento de tallo de 1 a 1.5 cm de largo y una yema axilar en la parte central (Fig. 3).



Figura 3. Proceso de preparación de explantas de tomatillo: (A) Segmentación de tallos, (B) Segmento de tallo con una yema axilar y hoja, (C) Microesquejes compuestos de un segmento de tallo y una yema axilar, listos para ser sembrados.

d. Fase de establecimiento y multiplicación

En estas fases, la siembra *in vitro* de los explantas seleccionados se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, colocando un explanta por cada tubo conteniendo el medio de cultivo y los balances hormonales de acuerdo a cada tratamiento (Tabla 1). Realizada la siembra, los tubos fueron tapados con papel aluminio y las tapas aseguradas con Parafilm, luego se los identificó e incubó en el cuarto de cultivo (Fig. 4) por un periodo de 45 días, a 24 °C, y fotoperiodo de 16/8 horas de iluminación y oscuridad y 47% de humedad relativa.

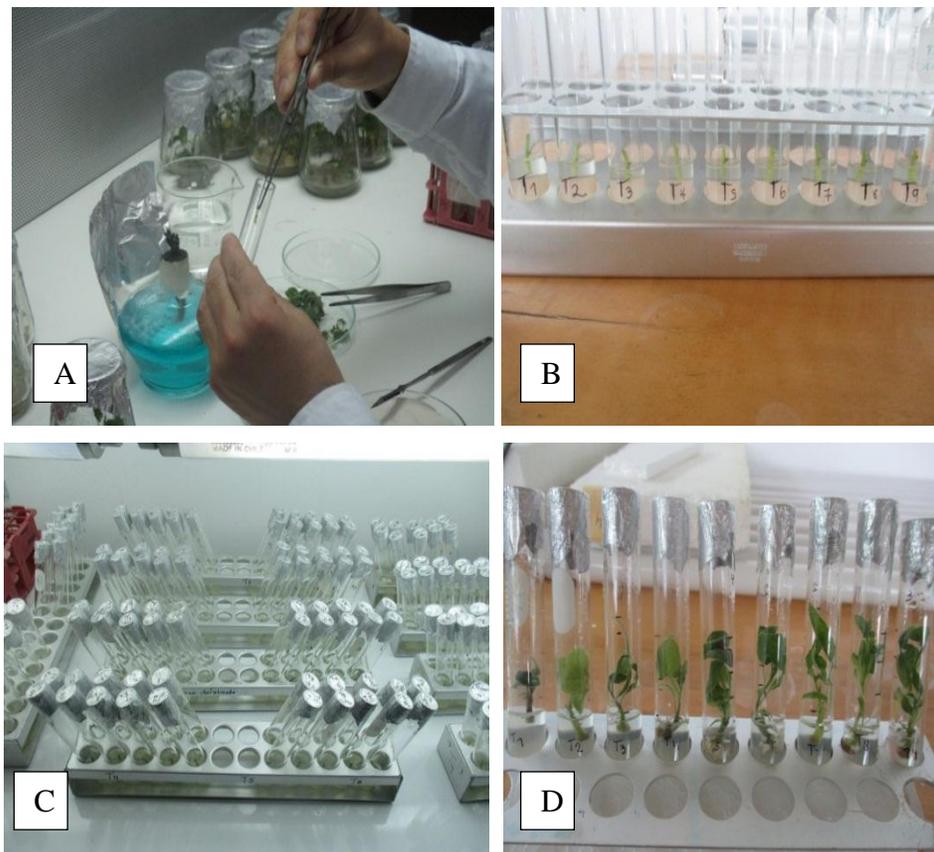


Figura 4. Proceso del establecimiento y multiplicación de explantas de tomatillo: (A) Siembra *in vitro* de explantas, (B) Explantas sembrados en el medio de cultivo por cada tratamiento, (C) Incubación de explantes sembrados en el cuarto de cultivo, (D) Brotes obtenidos a los 45 días de la siembra *in vitro* por tratamiento

e. Fase de enraizamiento

Los mejores brotes obtenidos en la fase de establecimiento y multiplicación, fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde fueron aislados y sembrados en frascos de 125 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo de acuerdo a los tratamientos en estudio (Tabla 2), los frascos fueron tapados con papel aluminio y sus tapas aseguradas con Parafilm. Luego fueron debidamente identificados y finalmente incubados en el cuarto de cultivo (Fig. 5) por un periodo de 30 días, a 28 °C y fotoperiodo de 16/8 horas de iluminación y oscuridad y 35 % de humedad relativa.

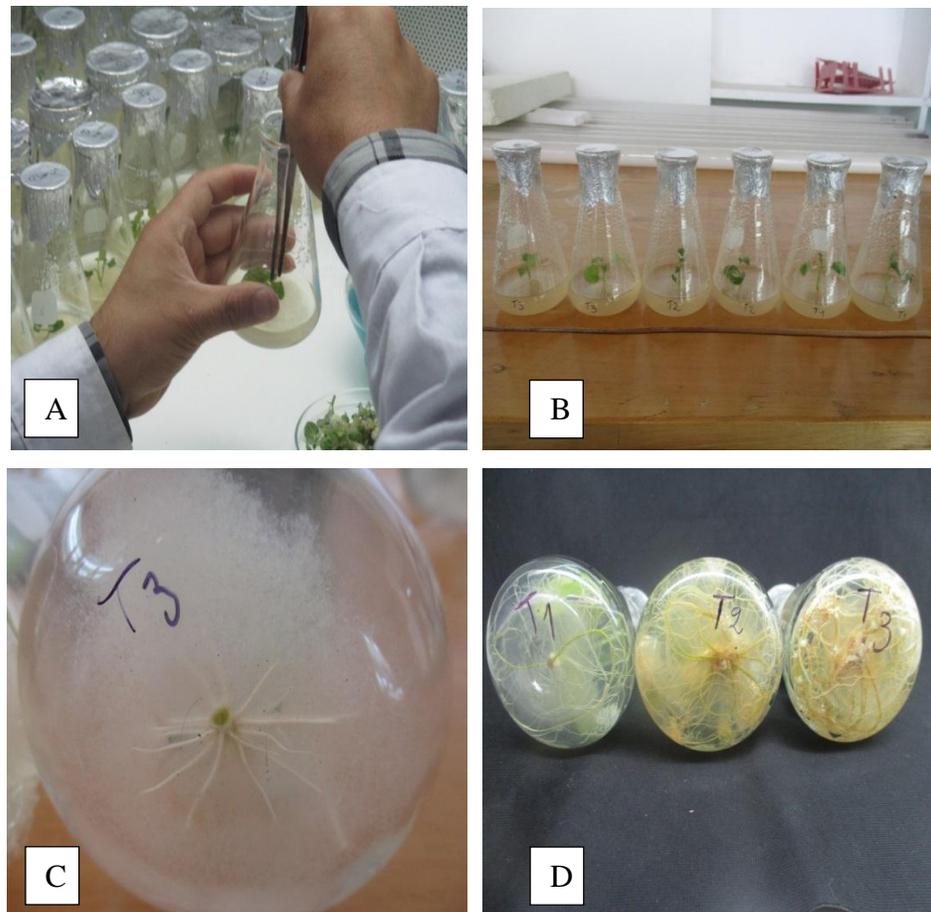


Figura 5. Proceso de la fase de enraizamiento de plántulas de tomatillo: (A) y (B) Siembra *in vitro* de plántulas, (C) Inducción de raíces a los 7 días de siembra *in vitro*, (D) Plántulas enraizadas a los 30 días de la siembra *in vitro*.

3.4.4. Evaluaciones realizadas

a. Fase de establecimiento

Brotamiento: Se determinó el porcentaje de explantas brotados por cada tratamiento. Esta evaluación se realizó a los 15 días después de la siembra de los mismos. Además se determinó el número de días necesarios para iniciar el brotamiento de los explantas por cada tratamiento. Esta evaluación se realizó diariamente hasta los 15 días después de sembrados los explantas. Además

b. Fase de multiplicación

A los 45 días después de la siembra de los explantas, se determinó el número de brotes por explanta y el número promedio de brotes por tratamiento. Asimismo, se contó el número de hojas del brote mayor y el número de hojas por tratamiento; y se midió la longitud del brote mayor de cada explanta (mm), además se calculó el promedio de la longitud del brote mayor.

c. Fase de enraizamiento

La evaluación consistió en:

- Determinar el porcentaje de plántulas enraizadas por tratamiento. La evaluación se realizó a los 15 días después de la siembra *in vitro*,
- Determinar el número de días necesarios para iniciar el enraizamiento de las plántulas en función al tratamiento. La evaluación se realizó diariamente hasta los 15 días después de la siembra *in vitro*,
- Contar el número de raíces por plántula y el número promedio de raíces por cada tratamiento; y
- Medir la longitud de la raíz mayor de cada plántula y la longitud promedio de la raíz mayor por tratamiento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se presentan y se discuten los resultados de la investigación, a través de los datos recolectados en las diferentes fases ensayadas que se realizaron en laboratorio, con el propósito de cumplir con el objetivo propuesto que es. Determinar la influencia del ácido giberélico (AG_3) y la bencil aminopurina (BAP), en las fases de establecimiento y multiplicación en la propagación clonal *in vitro* de tomatillo.

4.1. Fase establecimiento

4.1.1. Porcentaje de brotamiento

En la Tabla 3 y Figura 6, se observan los resultados tanto numéricos como porcentuales del brotamiento de explantas de tomatillo. Se deduce que los tratamientos que dieron óptimos resultados fueron el 5 (0.2 ppm de AG_3 + 0.5 ppm de BAP) y el 6 (0.2 ppm de AG_3 1 ppm de BAP), con 30 explantas brotados, lo que se traduce en 100 % de brotamiento. Contrariamente el tratamiento 1 es el que nos muestra menos explantas brotados (17) y un porcentaje de brotamiento de 56.67 %, los otros tratamientos arrojaron resultados intermedios.

Posiblemente el brotamiento de yemas axilares de tomatillo se debe a que hay un balance hormonal adecuado para los tratamientos 5 (0.2 ppm de AG_3 y 0.5 ppm de BAP) y 6 (0.2 ppm de AG_3 y 1.0 ppm de BAP), donde se obtuvieron el 100 % de explantas brotados. Y en el caso del tratamiento 8 (0.4 ppm de AG_3 y 0.5 ppm de BAP), se obtuvo el 90 % del brotamiento de los explantas. El menor porcentaje de brotamiento 56.67 % se obtuvo en el tratamiento 1 (0.0 ppm de AG_3 y 0.0 ppm de BAP). De lo expuesto, se podría deducir que manteniendo la concentración de BAP entre 0.5 y 1.0 ppm, la dosis de AG_3 influencia al brotamiento de explantas. Este proceso se optimiza cuando la concentración de AG_3 en el medio de cultivo (giberelina exógena) sube de 0 a 0.2 ppm. Mayores dosis de AG_3 (0.4 ppm) reducen el porcentaje de brotamiento de 100 (t_5 y t_6) a 93.3 % (t_9). Sin AG_3 (t_1 , t_2 y t_3) o sin

BAP (t_1 , t_4 y t_7), el brotamiento alcanza sus menores porcentajes, pero el proceso no se inhibe, lo cual evidencia el efecto benéfico de la giberelina y citocinina endógena presente en los explantas. Manteniendo la giberelina exógena en su nivel óptimo (0.2 ppm), el brotamiento de explantas responde positivamente al aumento de la concentración de BAP en el medio de cultivo, destacando con ello la importancia de la citocinina para éste fenómeno. En suma, el brotamiento de los explantas de tomatillo está asociado al tipo de balance hormonal y específicamente a la presencia de giberelinas y citocininas en el medio de cultivo y/o explanta.

Tabla 3. Porcentaje de brotamiento de los explantas por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días de la siembra *in vitro*

N° TRAT	Medio de cultivo	N° explantas sembrados	N° explantas brotados	% de brotamiento
T ₁	MS + (0.0) AG ₃ + (0.0) BAP	30	17	56.67
T ₂	MS + (0.0) AG ₃ + (0.5) BAP	30	26	86.67
T ₃	MS + (0.0) AG ₃ + (1.0) BAP	30	20	66.67
T ₄	MS + (0.2) AG ₃ + (0.0) BAP	30	23	76.67
T ₅	MS + (0.2) AG ₃ + (0.5) BAP	30	30	100.00
T ₆	MS + (0.2) AG ₃ + (1.0) BAP	30	30	100.00
T ₇	MS + (0.4) AG ₃ + (0.0) BAP	30	22	73.33
T ₈	MS + (0.4) AG ₃ + (0.5) BAP	30	27	90.00
T ₉	MS + (0.4) AG ₃ + (1.0) BAP	30	28	93.33

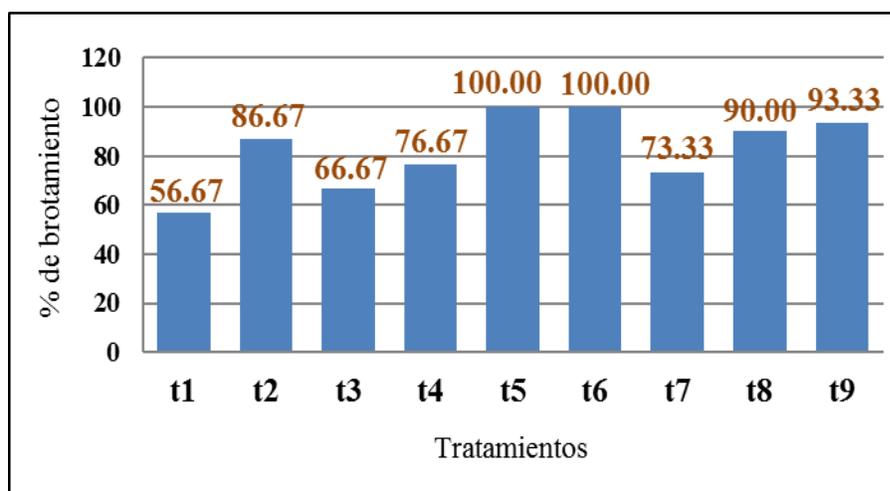


Figura 6. Porcentaje de explantas brotados por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días de la siembra *in vitro*

Al respecto Otrshy *et al.* (2013), mencionan que el aumento en la concentración de citocininas BAP, de 1 hasta 4 mg.L⁻¹, genera una mayor respuesta en la regeneración de plantas a partir de explantas de hoja de *Physalis peruviana* L. Cuando utilizaron 4 mg.L⁻¹ de BAP, obtuvieron la regeneración más alta (98.7 %). Adicionalmente, los mismos autores indican que después de utilizar diferentes concentraciones y combinaciones de BAP, KIN y AIB en la regeneración de plantas a partir de segmentos nodales de *Physalis peruviana* L., el más alto porcentaje de regeneración de plantas se observó en el medio que contiene el mayor nivel de BAP (4 mg.L⁻¹).

De otro lado Yücesan *et al.* (2015), obtuvieron 93.3 % de formación de brotes a partir de segmentos nodales de *Physalis peruviana* L., después de dos semanas de la siembra, cuando utilizaron 0.5 mg.L⁻¹ de BAP solo y en combinaciones con 0.25 de AIA y AIB.

Al analizar el efecto de la giberelina (AG₃) y citocinina (BAP) de modo independiente, se deduce que el porcentaje de brotamiento de los explantas se incrementa progresivamente conforme la concentración de AG₃ se eleva de 0 (56.67 % de explantas brotados) a 0.2 ppm (76.67 % de explantas brotados). Niveles superiores a 0.2 ppm reducen el brotamiento en tres puntos porcentuales. De modo semejante, el porcentaje de brotamiento de explantas mejora conforme la concentración de citocinina (BAP) en el medio de cultivo se incrementa de 0 a 0.5 ppm, concentración que resultó ser la óptima para este proceso, pues elevó el brotamiento de 56.67 a 86.67 %. Por encima de 0.5 ppm de BAP, el brotamiento disminuye de 86.67 a 66.67 %. En consecuencia, la incorporación de 0.2 ppm de AG₃ o de 0.5 ppm de BAP en el medio de cultivo optimizan el porcentaje de brotamiento *in vitro* de los explantas ubicándolo en 76.67 y 86.67 %, respectivamente, dejando evidencia que las citocininas benefician más que las giberelinas, al proceso de brotamiento de las yemas axilares.

4.1.3. Iniciación de brotamiento

En la Figura 7, observamos el efecto de los tratamientos en el inicio de brotamiento de los explantas de tomatillo. Se aprecia que el tratamiento 6 (0.2 ppm AG₃ + 1 ppm BAP), en promedio requiere menor tiempo (6.5 días) para iniciar el brotamiento en comparación con los demás. Por lo tanto, este balance hormonal resulta ser el más adecuado para estimular el brotamiento de los explantas de tomatillo. Contrariamente, los tratamientos 1 (0 ppm AG₃ + 0 ppm BAP), 4 (0.2 ppm + 0 ppm BAP) y 7 (0.4 ppm AG₃ + 0 ppm BAP) son los que menos estimulan el inicio del brotamiento, pues los explantas demandan un promedio de 8.5 días para iniciar este proceso. Finalmente, los tratamientos 2, 3, 5, 8 y 9 inician el brotamiento a los 7.5, 8, 7, 8 y 7.5 días, respectivamente.

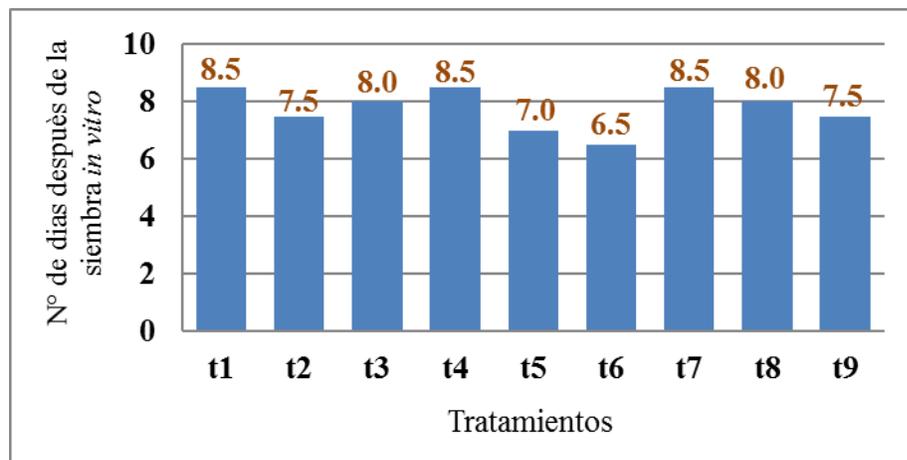


Figura 7. Número promedio de días necesarios para el inicio del brotamiento de explantas por tratamiento.

En función a estos resultados podemos afirmar que el inicio del brotamiento es un proceso dependiente de las giberelinas y citocininas presentes en el medio de cultivo. De estos dos reguladores del crecimiento, la citocinina es la de mayor impacto en el inicio del brotamiento, pues cuando ésta está ausente en el medio de cultivo, aun cuando haya giberelina, los explantas postergan en dos días el inicio de su brotamiento. De modo semejante, en ausencia de ambos reguladores del crecimiento, el inicio del brotamiento tarda dos días más en comparación al mejor tratamiento (t₆), lo que pone de manifiesto, de un lado, el lento efecto de las

giberelinas y citocininas endógenas del explanta; y de otro, el efecto rápido y positivo de estos reguladores (giberelina y citocinina exógena) en el inicio del brotamiento.

Nuestros resultados son concordantes con los de Santana y Angarita (1997) quienes determinaron que la regeneración adventicia de plantas de *Physalis ixocarpa* L. a partir de callos formados a partir de segmentos de hipocótilos, fue estimulada por los tratamientos suplementados con BAP sola y BAP en combinación con AG₃, lo que demostraría que para el brotamiento, la citocinina es indispensable, mientras que la giberelina juega un rol secundario, pero al juntar ambas en un solo balance hormonal, el brotamiento es estimulado, requiriéndose de mayor o menor tiempo según sea la concentración de éstos reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

La Figura 7 también muestra los efectos independientes de la giberelina y citocinina en el número de días después de la siembra *in vitro* que los explantas requieren para iniciar su brotamiento. Al respecto, se encontró que éste requerimiento es el mismo (8.5 días) cualquiera sea la dosis de AG₃; en cambio, el brotamiento de explantas se inicia un día antes (7.5 días de la siembra *in vitro*), respecto al tratamiento control (0 ppm BAP), cuando se utiliza 0.5 ppm de BAP. Por lo tanto, en la presente investigación, las dosis probadas de AG₃ no aceleran el proceso de brotamiento, tal como sí lo hace el BAP a 0.5 ppm de concentración, dosis con la cual el brotamiento se inició un día antes que en el tratamiento control.

4.2. Fase multiplicación

4.2.1. Número promedio de brotes por explanta

El análisis de varianza (ANVA) realizado y mostrado en la (Tabla 4), muestra alta significación estadística para los tratamientos y factores en estudio (AG₃ y BAP). Esto significa que existe un efecto diferenciado de los tratamientos y los niveles (dosis) de AG₃ y BAP en el número promedio de brotes por explanta. Asimismo, la

fueron homogéneos entre sí. El elevado valor del coeficiente de variabilidad (CV = 7.45 %), para condiciones de laboratorio, puede deberse a que los explantas no responden de la misma forma a los balances hormonales y a los cambios de temperatura (Tabla 24 del anexo 2). Sin embargo, los datos son confiables.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de brotes por explanta (Datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Bloques	2	0.02	0.01	1.56	3.63	6.23
Tratamientos	8	0.40	0.05	5.00**	2.59	3.89
AG ₃ (A)	2	0.16	0.08	10.46**	3.63	6.23
BAP (B)	2	0.13	0.07	8.54**	3.63	6.23
A x B	4	0.10	0.03	3.26*	3.01	4.77
Error	16	0.13	0.01			
Total	34	0.94				

$$CV = 7.45 \%$$

Dada la significación estadística en la interacción de los factores en estudio (A x B), se realizó el ANVA de los Efectos Simples que corresponden a cada uno de ellos (Tabla 5). La que nos muestra que hay alta significación estadística para el nivel a₂ del factor A (AG₃) y el nivel b₂ del factor B (BAP), indicando que estos niveles (dosis) actúan conjuntamente para determinar el número promedio de brotes por explanta, lo que significa que el mejor resultado se obtuvo con la combinación (a₂ b₂), que representa al tratamiento 9 (0.4 ppm AG₃ + 1 ppm BAP), hecho que ha sido corroborado por los resultados de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad (Fig. 8 y Tabla 19 del Anexo 2).

Tabla 5. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable número promedio de brotes por explanta (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Efectos simples						
Factor A						
Entre A en b ₀	2	0.01	0.01	1.00	3.63	6.23
Entre A en b ₁	2	0.04	0.02	2.00	3.63	6.23
Entre A en b ₂	2	0.23	0.12	12.00**	3.63	6.23
Factor B						
Entre B en a ₀	2	0.01	0.01	1.00	3.63	6.23
Entre B en a ₁	2	0.03	0.02	2.00	3.63	6.23
Entre B en a ₂	2	0.20	0.10	10.00**	3.63	6.23
Error	16	0.13	0.01			

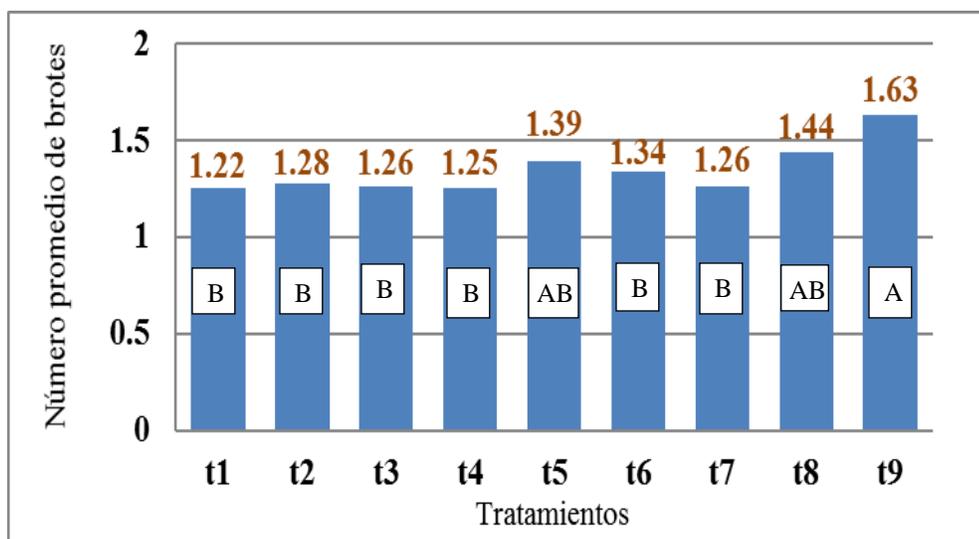


Figura 8. Número promedio de brotes por explanta. Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra *in vitro*.

Los resultados de la Prueba de Rango Múltiple de Tukey, utilizada para medir el efecto de los tratamientos en estudio en el número promedio de brotes por explanta, indican que la incorporación de 0.4 ppm AG₃ y 1 ppm BAP en el medio de cultivo (t₉) estimula la formación del mayor número brotes por explanta (1.63).

Contrariamente, el tratamiento 1 (0 ppm AG₃ + 0 ppm BAP) es el que registra el menor número promedio de brotes por explanta (1.22). Esto evidencia que la giberelina y la citocinina tienen una acción sinérgica y por lo tanto, un rol prioritario en la formación de nuevos brotes a partir de las yemas axilares de los explantas. Los demás tratamientos presentan promedios con valores intermedios a los citados.

Lo expuesto es corroborado al interpretar los efectos aislados de ambos reguladores del crecimiento. Así, se encuentra una respuesta creciente en el número de brotes por explanta al aumento de la dosis de AG₃, pues se eleva de 1.22 a 1.25 y 1.26 brotes por explanta con dosis de AG₃ de 0, 0.2 y 0.4 ppm, respectivamente. En cambio, la respuesta del número de brotes por explanta al aumento de BAP de 0 a 0.5 y de 0.5 a 1 ppm es diferente, pues en el primer caso se eleva de 1.22 a 1.28 brotes por explanta para finalmente decrecer de 1.28 a 1.26 brotes por explanta, respectivamente. Estos resultados reafirman la acción sinérgica de ambos reguladores del crecimiento en el número de brotes por explanta.

Resultados similares sobre la influencia del BAP en la formación de brotes fueron reportados por García-Osuna *et al.* (2015), después de haber sembrado *in vitro* segmentos nodales de *Physalis ixocarpa* L., encontraron que el uso de 3 mg.L⁻¹ de BAP estimuló la formación de 9.5 brotes por explanta. Asimismo, Ramar *et al.* (2014), emplearon segmentos nodales de *Physalis peruviana* L. para determinar el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (BAP, AG₃ 2,4-D) y obtuvieron el mejor resultado utilizando 2.0 ppm de BAP más 1.0 ppm de AG₃ y 1.0 ppm de 2,4-D, con un valor medio de 15.4 brotes por explanta. De igual manera Otrosby *et al.* (2013), mencionan que el mayor número de brotes de *Physalis peruviana* L. lo obtuvieron cuando emplearon 2 ppm de BAP + 2 ppm de KIN, seguido por el tratamiento donde utilizaron 4 ppm de BAP. En la misma especie, Santana y Angarita (1997), indican que la regeneración adventicia de plantas, a partir de callos de hipocótilo, fue estimulada con los tratamientos suplementados con solo BAP (2.5 ppm) o BAP (2.5 ppm) combinado con AG₃ (1 ppm) y en presencia de luz. En una especie distinta a la trabajada en la presente

investigación (*Cyphomandra betacea* (Cav). Sendt (Fenotipo naranja)), Chacón-Cerdas *et al.* (2014), explican que la brotación obtenida en miniestacas de 2 a 4 cm de largo, con uno o dos nudos que presentaron yemas axilares, se vio favorecida con las combinaciones de BAP (0.5 ppm) y AG₃ (0.5 ppm) en donde se obtuvo los mayores promedios de brotación (3.56 brotes por explanta).

4.2.2. Número promedio de hojas del brote mayor

Los resultados del análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de hojas del brote mayor (Tabla 6), muestran la existencia de una alta significación para los tratamientos en estudio, los factores en estudio (AG₃, BAP) y la interacción entre estos. La fuente de variación también indica la ausencia de diferencias estadísticas para los bloques, lo que quiere decir que estos fueron homogéneos. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 6.12 %), supera al establecido como límite máximo para experimentos de laboratorio (5 %) lo que indicaría que los explantas no fueron totalmente homogéneos o que estos no respondieron de la misma forma frente a los balances hormonales o a los cambios de temperatura (Tabla 24 del Anexo 2). Sin embargo, los datos son confiables.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de hojas del brote mayor (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Bloques	2	0.01	0.01	0.25	3.63	6.23
Tratamientos	8	3.77	0.47	23.50**	2.59	3.89
AG ₃ (A)	2	0.55	0.27	12.01**	3.63	6.23
BAP (B)	2	1.10	0.55	24.17**	3.63	6.23
A x B	4	2.12	0.53	23.36**	3.01	4.77
Error	16	0.36	0.02			
Total	34	7.91				

$$CV = 6.12 \%$$

Confirmada la existencia de una alta significación estadística para la interacción de los factores estudiados (A x B), se realizó el ANVA para determinar los efectos

simples de estos factores en el número promedio de hojas del brote mayor (Tabla 7), encontrándose la ausencia de significación estadística para el nivel a_2 del factor A (0.4 ppm de AG_3), lo cual indica que los tratamientos que involucran a este nivel no influyen positivamente al número promedio de hojas del brote mayor. A diferencia de éste, todos los demás niveles de ambos factores (AG_3 y BAP) registraron alta significación estadística.

Tabla 7. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable número promedio de hojas del brote mayor (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Efectos simples						
Factor A						
Entre A en b_0	2	0.53	0.27	13.50**	3.63	6.23
Entre A en b_1	2	1.46	0.73	36.50**	3.63	6.23
Entre A en b_2	2	0.69	0.35	17.50**	3.63	6.23
Factor B						
Entre B en a_0	2	2.95	1.48	74.00**	3.63	6.23
Entre B en a_1	2	0.23	0.12	6.00*	3.63	6.23
Entre B en a_2	2	0.04	0.02	1.50	3.63	6.23
Error	16	0.36	0.02			

Para corroborar los resultados antes descritos, se realizó la Prueba de Significación de Tukey al 5 % de probabilidad (Fig. 9 y Tabla 20 del Anexo 2), en la que podemos observar que los tratamientos 2 y 6 son estadísticamente similares sin embargo existe diferencia numérica superior del tratamiento 2 frente al 9. Además, estos son estadísticamente superiores a los otros tratamientos estudiados.

Mientras el tratamiento 2 (0 ppm de AG_3 + 0.5 ppm de BAP) permitió obtener el mayor número promedio de hojas por brote mayor (3.09), el tratamiento 1 (0 ppm de AG_3 + 0 ppm de BAP) mostró el efecto contrario (1.75 hojas por brote mayor). Los demás tratamientos presentaron promedios con valores intermedios a los antes señalados.

De lo expuesto se deduce que la citocinina, más que la giberelina, estimula la formación de hojas en tomatillo. Sin embargo, conforme se incrementa el nivel de citocinina de 0.5 a 1 ppm y en presencia de giberelina, disminuye el número promedio de hojas en el brote mayor. En ausencia de citocinina (t_1 , t_4 y t_7) y aun cuando la giberelina esté presente en el medio de cultivo (t_4 y t_7), el número promedio de hojas del brote mayor, alcanza sus menores valores.

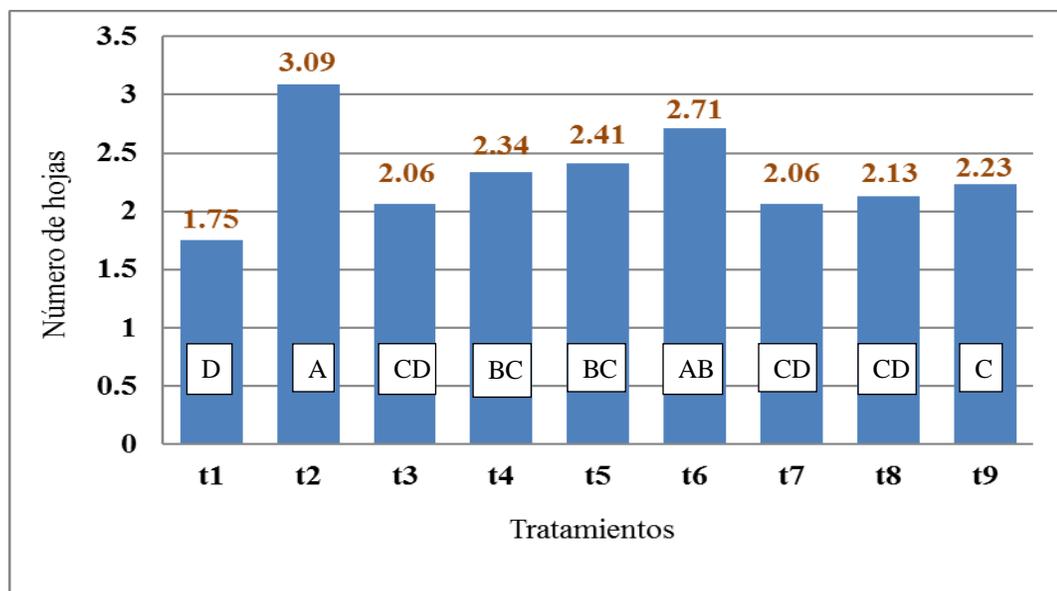


Figura 9. Efecto de los tratamientos en estudio en el número promedio de hojas del brote mayor. Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra *in vitro*

Estudios semejantes, que respaldan la influencia positiva del BAP en la formación de hojas en *Physalis peruviana* L., fueron conducidos por Nogueira, J. (2013), quien empleó segmentos nodales de 1.5 cm de longitud conteniendo una yema y sin hojas los cuales fueron inoculados en medio de cultivo MS (1962) suplementado con mio- inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}), agar (7 g.L^{-1}) y pH 5,8. A esto se añadieron cuatro concentraciones de BAP (0.3 , 0.6 , 0.8 y 1.2 mg.L^{-1}) llegando a obtenerse el mayor número de hojas por explanta en medio MS con 1.2 mg.L^{-1} de BAP. De otro lado Ambriz, J (1995), utilizó tres citocininas (BAP, Kinetina y Zeatina en dosis de 1 y 10 mg.L^{-1}), para propagar brotes de tomate (*Lycopersicon*

esculentum Mill.), sin llegar a encontrar significación estadística para los tratamientos, obteniendo una media general de 2.26 hojas por explanta.

De la Figura 9, también se deduce que de las tres dosis probadas de AG₃ y BAP, las dosis medias (0.2 y 0.5 ppm, respectivamente) de ambos reguladores son las que más estimulan al número de hojas del brote mayor, pues con ellas se consigue un promedio de 2.34 y 3.09 hojas por brote mayor, respectivamente.

4.2.3. Longitud promedio de brote mayor (mm)

El ANVA para la variable longitud promedio de brote mayor (mm) (Tabla 8), indica que existe alta significación para los tratamientos y los factores en estudio (AG₃ y BAP), así como de significación para la interacción de los factores (A x B) al igual que para los bloques. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 13.60 %) es elevado para condiciones de laboratorio (5 %), lo que posiblemente se deba a que los explantas no reaccionaron de la misma forma frente a los balances hormonales y cambios de temperatura (Tabla 24 del Anexo 2). Sin embargo, los datos son confiables.

Tabla 8. Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio de brote mayor (mm)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Bloques	2	81.00	40.50	3.90*	3.63	6.23
Tratamientos	8	647.12	80.89	7.79**	2.59	3.89
AG ₃ (A)	2	287.12	143.56	13.83**	3.63	6.23
BAP (B)	2	176.89	88.45	8.52**	3.63	6.23
A x B	4	183.10	45.78	4.41*	3.01	4.77
Error	16	166.01	10.38			
Total	34	1541.24				

$$CV = 13.60 \%$$

Debido a la existencia de significación en la interacción de los factores en estudio (A x B), se realizó el ANVA para determinar los efectos simples de estos factores en

la longitud promedio del brote mayor (mm) (Tabla 9). Este análisis de varianza muestra ausencia de significación para el nivel a₂ (0.4 ppm de AG₃) del factor A y el nivel b₁ (0.5 ppm de BAP) del factor B, lo que indicaría que el tratamiento a₂ b₁ (0.4 ppm AG₃ + 0.5 ppm BAP) no tiene efectos estadísticamente significativos en la longitud promedio del brote mayor.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANVA) para los efectos simples de los factores en estudio para la variable longitud promedio del brote mayor (mm) por explanta

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Efectos simples						
Factor A						
Entre A en b ₀	2	258.31	129.16	12.44**	3.63	6.23
Entre A en b ₁	2	3.38	1.69	0.16	3.63	6.23
Entre A en b ₂	2	208.54	104.27	10.05**	3.63	6.23
Factor B						
Entre B en a ₀	2	251.78	125.89	12.13**	3.63	6.23
Entre B en a ₁	2	81.61	40.81	3.93*	3.63	6.23
Entre B en a ₂	2	26.61	13.31	1.28	3.63	6.23
Error	16	166.01	10.38			

Para corroborar los resultados antes descritos, se realizó la Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 0.05 de probabilidad (Fig. 10 y Tabla 21 del Anexo 2), en la que no es posible distinguir una clara diferencia estadística entre los tratamientos. Sin embargo, es el tratamiento 6 (0.2 AG₃ + 1 ppm BAP) el que mejor respuesta numérica ha registrado, pues su presencia en el medio de cultivo ha permitido obtener la mayor longitud promedio del brote mayor (31.1 mm) al cabo de los 45 días después de la siembra *in vitro*. Esta mejor respuesta es una de las posibles consecuencias de haber favorecido, en mayor medida, el inicio del brotamiento, conforme fue remarcado anteriormente, observándose así una relación directa entre ambas variables; es decir, que el brotamiento precoz está asociado con la mayor longitud promedio del brote mayor, no únicamente por el mayor tiempo disponible para el crecimiento sino también por una favorable contribución de la giberelina y

citocinina a éste fenómeno. Esto es que, mientras la citocinina contribuye a la división celular, las nuevas células se elongan más rápidamente en presencia de la giberelina. Al respecto Azcon-Bieto y Talon (2008), sostienen que las giberelinas son los factores hormonales determinantes en el control de la elongación del tallo.

En efecto, nuestros resultados nos permiten afirmar que por encima de la dosis óptima (0.2 ppm de AG₃), todo incremento de AG₃, disminuye la longitud del brote mayor. Contrariamente, si analizamos la concentración de BAP, el uso de la máxima dosis (1.0 ppm de BAP) permitió obtener los mejores resultados en longitud del brote mayor. Sin embargo, el uso de dosis de BAP menores que 1 ppm, afectan negativamente a la longitud el brote mayor. En resumen, la respuesta de los explantas, en términos de longitud del brote mayor, cambia en función a los balances hormonales.

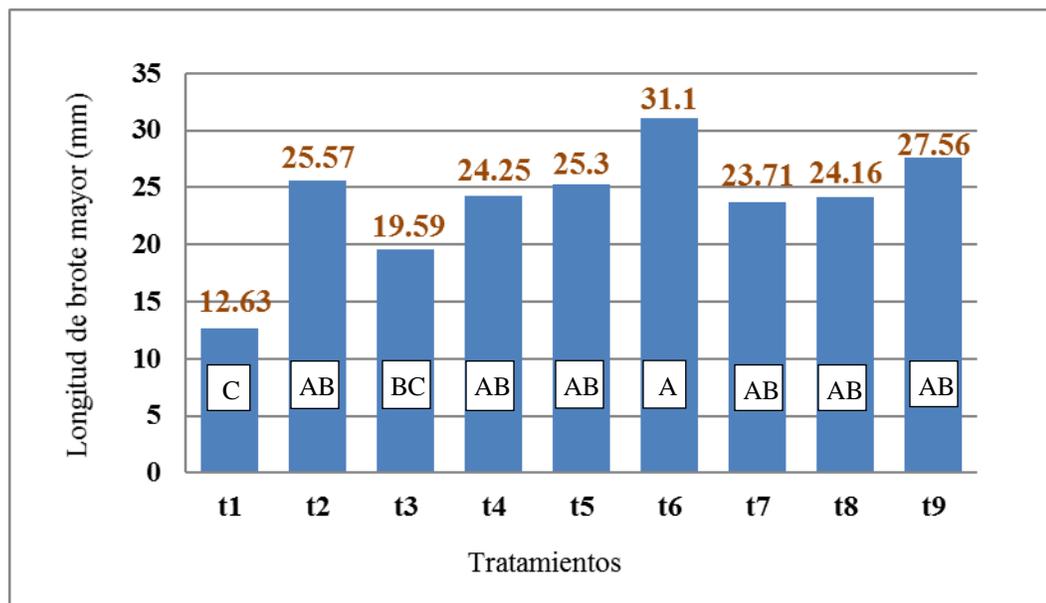


Figura 10. Longitud promedio del brote mayor (mm). Evaluación realizada a los 45 días después de la siembra *in vitro*

Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Yücesan *et al.* (2015), quienes evaluaron la influencia de los reguladores de crecimiento en la longitud de brotes de *Physalis peruviana* L., llegando a la conclusión que el AG₃ desempeña un

papel crucial en el crecimiento de brotes, pues la mayor media de longitud de brote (3.8 cm) la obtuvieron cuando utilizaron medio de cultivo LS + 0.5 mg.L⁻¹ de AG₃. Asimismo, Otroshy *et al.* (2013), indican que los reguladores del crecimiento afectan significativamente la longitud de los brotes de explantas nodales de *Physalis peruviana* L. y que, el aumento en los niveles de BAP y KIN tienen un efecto positivo en la longitud de brotes, obteniendo la mayor longitud de brote (17.47 cm) en un medio enriquecido con (4 mg.L⁻¹ de BAP + 1 mg.L⁻¹ KIN + 0,5 mg.L⁻¹ de IBA). Del mismo modo, Nogueira, J. (2013), encontró significación para las diferentes dosis de BAP (0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg.L⁻¹) y determinó que la longitud del brote en *Physalis peruviana* L. disminuye a medida que la dosis de citocinina (BAP) se incrementa por encima de 0.3 ppm, concentración con la cual obtuvieron brotes de 2,5 cm de longitud. García-Osuna *et al.* (2015), también reportan que obtuvieron el mejor resultado de longitud de brote (8.82 cm) a partir de segmentos nodales de *Physalis ixocarpa* L. inoculados en medio basal MS suplementado con 0.5 mg.L⁻¹ de BAP y 0.5 mg.L⁻¹ de ANA.

Finalmente, nuestros resultados nos permiten afirmar que la longitud promedio del brote mayor es notoriamente mejorado con el uso de dosis medias de AG₃ o BAP, por separado, pues se registran brotes mayores de 24.25 y 25.57 mm, respectivamente. Sin embargo, ésta contribución positiva sigue siendo mejorada cuando ambos reguladores son incorporados al medio de cultivo (conforme se hizo notar previamente), demostrándose con ello una acción sinérgica de giberelinas y citocininas en la longitud del brote mayor.

4.3. Fase enraizamiento

4.3.1. Porcentaje de enraizamiento

En la Tabla 10 y Figura 11, se observan los resultados tanto numéricos y porcentuales del enraizamiento de treinta brotes de tomatillo por tratamiento, procedentes de la Fase anterior (Fase de multiplicación). Se evidencia que los tratamientos 2 (MS + 2.0 ppm de AIB) y 3 (MS + 4.0 ppm de AIB) dieron óptimos resultados al haber permitido obtener 100 % de enraizamiento (30 plántulas enraizadas). Caso contrario ocurre con el tratamiento 1 (MS + 0.0 ppm de AIB) que muestra un 46.67 % de enraizamiento (14 plántulas enraizadas).

Tabla 10. Porcentaje de brotes enraizados por tratamiento. Evaluación registrada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

N° Trat	Medio de cultivo	N° brotes sembrados	N° brotes enraizados	% de enraizamiento
T ₁	MS + (0.0 ppm) AIB	30	14	46.67
T ₂	MS + (2.0 ppm) AIB	30	30	100.00
T ₃	MS + (2.0 ppm) AIB	30	30	100.00

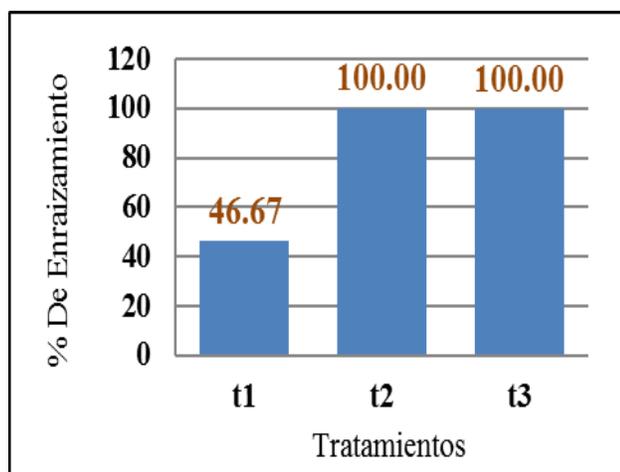


Figura 11. Porcentaje de plántulas enraizadas por tratamiento. Evaluación realizada a los 15 días después de la siembra *in vitro*

Estos resultados confirman la influencia positiva del AIB en la formación de raíces. Particularmente, en el caso de brotes de tomatillo, los tratamientos 2 y 3 con dosis de 2 y 4 ppm de AIB, respectivamente, nos han dado óptimos resultados habiéndose obtenido el 100 % de plántulas enraizadas. Sin embargo, podemos deducir que las dosis empleadas de AIB (2 y 4 ppm) no generan respuestas diferentes en el porcentaje de brotes enraizados, pero sí en el tiempo (número de días) necesario para el inicio del enraizamiento, así como en el número y longitud de raíz mayor, datos que serán presentados y discutidos en los acápite subsiguientes. Similares resultados fueron obtenidos por Otrosby *et al.* (2013), quienes afirman que cantidades apropiadas de auxina, en ausencia o baja concentración de citoquinina, son cruciales para la formación de raíces en explantas de *Physalis peruviana* L. Así, cuando estos investigadores utilizaron 0.5 y 1.0 mg.L⁻¹ de AIB, obtuvieron el mayor porcentaje de enraizamiento (100 %). Contrariamente, Rache y Pacheco (2012), obtuvieron 100 % de enraizamiento en microtallos de *Physalis peruviana* L. incubados tanto en medio MS sin reguladores del crecimiento, como en medio MS complementado con 0.05 y 0.1 mg.L⁻¹ de AIB. Con dosis mayores de AIB (2.5 mg.L⁻¹) el enraizamiento disminuyó a 82 %.

En una especie diferente a la utilizada en esta investigación, Chacón-Cerdas *et al.* (2014), empleando diferentes tratamientos para el enraizamiento *in vitro* de brotes de (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja)), obtuvieron sus más altos porcentajes de enraizamiento de brotes (73 %) con el tratamiento de 0.50 mg.L⁻¹ de AIB, confirmándose así, una vez más el efecto benéfico de las auxinas para el enraizamiento de propágulos vegetativos.

4.3.2. Iniciación de enraizamiento

La Figura 12, muestra el resultado del número promedio de días necesarios para el inicio del enraizamiento en brotes de tomatillo. El tratamiento 3 (MS + 4 ppm de AIB), requiere de tan solo 5.5 días para dar inicio al enraizamiento lo que lo calificaría como el más precoz para éste proceso fisiológico. Esta acción es seguida

por el tratamiento 2 (MS + 2 ppm de AIB), con 6.5 días; y, finalmente el tratamiento 1 (MS + 0.0 ppm de AIB con un promedio de 8 días.

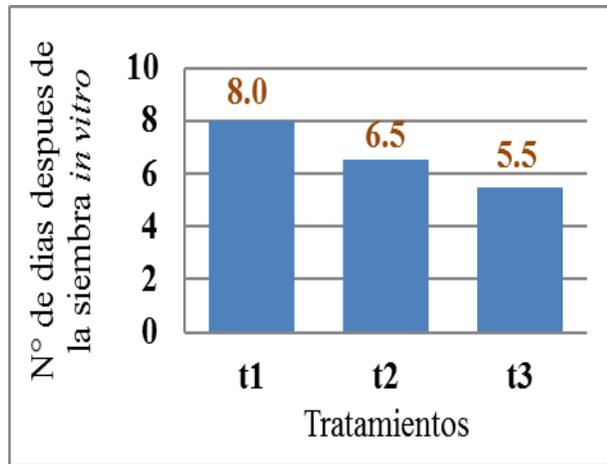


Figura 12. Número promedio de días necesarios para el inicio del enraizamiento de brotes por tratamiento.

De lo descrito anteriormente se deduce que la auxina (AIB) influye positivamente en la inducción de rizogénesis, pues a medida que se incrementa el nivel de AIB (de 0 a 4 ppm), mejora la respuesta, en el sentido que se requiere de un número de días para el inicio del enraizamiento.

Sobre el particular Azcon-Bieto y Talón (2008), señalan que en muchos casos el enraizamiento, es decir, la formación de raíces adventicias en la base del esqueje, es un proceso espontáneo, pero en especies recalcitrantes se ha comprobado que la aplicación de AIA y auxinas sintéticas, como AIB y ANA, estimula el enraizamiento. La formación de raíces adventicias en esquejes es un proceso complejo que consta de, al menos, dos etapas: la formación de primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las raíces. Ambas etapas requieren auxina, aunque en cada una de ellas las necesidades son diferentes y dependen de la especie.

Resultados similares a los nuestros fueron encontrados por Aniel *et al.* (2015), quienes evidencian que la emergencia de raíces se produjo una semana después de

la siembra *in vitro* de brotes de *Physalis angulata* L. cultivados en medio MS suplementado con diferentes dosis de AIB que variaron de (0 a 2 mg.L⁻¹). Por otro lado Afroz *et al.* (2009), emplearon brotes (3 a 5 cm de longitud) de *Physalis minima* L. para inducir rizogénesis *in vitro*. Cultivados en medio MS al 50 %, suplementado con 30 gr.L⁻¹ de sacarosa, 7 gr.L⁻¹ de agar (DIFCO) y diferentes concentraciones y combinaciones de AIB (0.1 a 2 mg.L⁻¹), ANA (0.1 a 1 mg.L⁻¹) y BAP (0.1 Y 0.5 mg.L⁻¹). Donde determinaron que cuando utilizaron (0.2 mg.L⁻¹ de AIB) y (0.3 mg.L⁻¹ de ANA) se reduce el número de días necesarios para la inducción de raíces (21 y 15 días respectivamente). Confirmando que las auxinas influyen positivamente en la formación de raíces.

4.3.3. Número promedio de raíces

El ANVA para la variable número promedio de raíces por brote (Tabla 11), muestra una alta significación estadística para los tratamientos en estudio (0, 2 y 4 ppm AIB), lo que evidencia un efecto diferenciado de la dosis de auxina en la variable evaluada. La fuente de variación también indica que para los bloques no hay significación estadística, lo que los califica como completamente homogéneos. El valor del coeficiente de variabilidad (CV = 12.99 %), lo que deja entrever la heterogeneidad en la respuesta de los explantas frente al efecto del fitorregulador (AIB) y a las fluctuaciones de temperatura (Tabla 24 del Anexo 2). Sin embargo, los datos son confiables.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANVA) para la variable número promedio de raíces por plántula (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Bloques	2	0.07	0.03	0.51	6.94	18.00
Tratamientos	2	1.94	0.97	14.47*	6.94	18.00
Error	4	0.27	0.07			
Total	8	2.28				

$$CV = 12.99 \%$$

La Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5% de probabilidad (Fig. 13 y Tabla 22 del anexo 2), indica que el tratamiento 3 (MS + 4 ppm de AIB), con ligeras diferencias numéricas, es estadísticamente similar al tratamiento 2 (MS + 2.0 ppm de AIB), así mismo, este último es similar estadísticamente al tratamiento 1 (MS+ 0.0 ppm de AIB).

Mientras el tratamiento 3 (MS + 4.0 ppm de AIB), estimuló la formación del mayor número promedio de raíces (2.60) por brote, seguido por el tratamiento 2 (MS + 2.0 ppm de AIB) con un promedio de (2.04) raíces por brote, el tratamiento 1 (MS + 0.0 ppm de AIB) es el que menos número promedio (1.47) de raíces forma. Por lo tanto, es posible sostener que el número de raíces por brote guarda relación directa con la dosis empleada de auxina (AIB), pues cuando esta sube e 0 a 4 ppm, el número promedio de raíces por brote se incrementa en 43.5%, lo que confirma el efecto positivo de las auxinas en éste proceso.

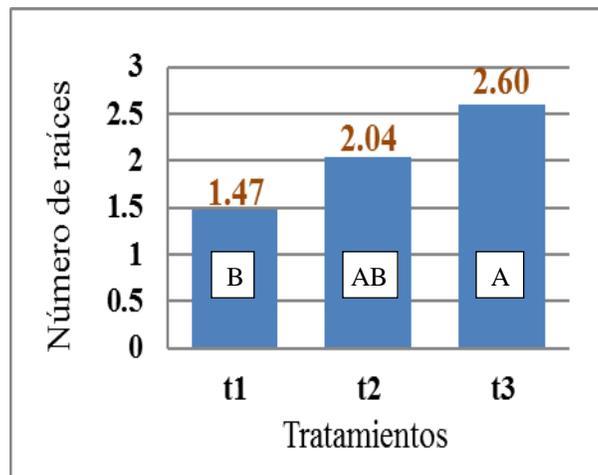


Figura 13. Número promedio de raíces por brote. Evaluación realizada a los 30 días después de la siembra *in vitro*

Al respecto, Sheeba *et al.* (2010), estudiaron el efecto del AIB en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Physalis minima* L. donde emplearon 5 dosis de AIB (1, 2, 3, 4 y 5 mg.L⁻¹) y obtuvieron el mayor número de raíces (6.7), con (2 mg.L⁻¹). Por otro lado Aniel *et al.* (2015), obtuvieron sus mejores resultados cuando utilizaron (1

mg.L⁻¹ de AIB) con un valor medio de 18.2 raíces por brote de *Physalis angulata* L. así mismo Sandhya y Srinath (2015), encontraron el mayor número de raíces (15.20) cuando cultivaron brotes de (4 a 5 cm de longitud) de *Physalis minima* L. en medio MS suplementado de (1 mg.L⁻¹ de AIB).

4.3.4. Longitud de raíz mayor (mm)

El ANVA para la variable longitud de raíz mayor (mm) (Tabla 12), muestra la existencia de significación estadística para los tratamientos en estudio pero no para los bloques, lo que probablemente se deba a que estos hayan sido completamente homogéneos. El valor coeficiente de variabilidad es (CV = 5.24 %), ligeramente excede al rango establecido para condiciones de laboratorio (5 %).

Tabla 12. Análisis de varianza (ANVA) para la variable longitud promedio de la raíz mayor (mm)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabular	
					0.05	0.01
Bloques	2	0.07	0.03	0.51	6.94	18.00
Tratamientos	2	1.94	0.97	14.47*	6.94	18.00
Error	4	0.27	0.07			
Total	8	2.28				

CV= 5.24 %

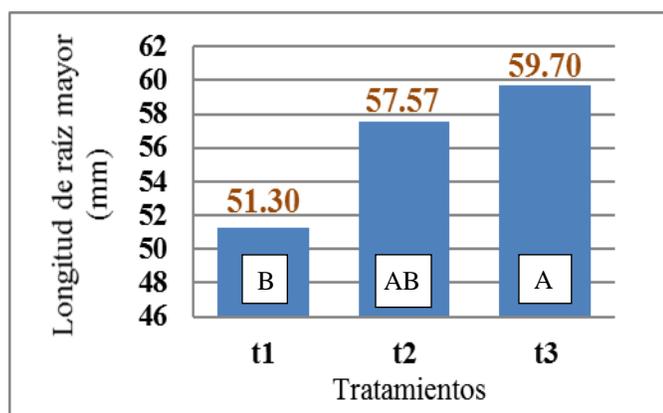


Figura 14. Longitud promedio de raíz mayor (mm) por plántula. Evaluación realizada a los 30 días después de la siembra *in vitro*

La Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad (Fig. 14 y Tabla 23 del anexo 2), indica que el tratamiento 3 (MS + 4.0 ppm de AIB) es estadísticamente similar al tratamiento 2 (MS + 2.0 ppm de AIB), sin embargo existe cierta diferencia numérica, y este último a su vez es estadísticamente similar al tratamiento 1 (MS + 0.0 ppm de AIB) existiendo también una diferencia numérica entre ambos.

El tratamiento 3 (MS + 4.0 ppm de AIB), muestra el mayor promedio de longitud de raíz mayor (59.70 mm), seguido por el tratamiento 2 (MS + 2.0 ppm de AIB) con un promedio de (57.57 mm), y finalmente el tratamiento 1 (MS + 0.0 ppm de AIB) con 51.30 mm de longitud de raíz mayor. Estos resultados evidencian que el incremento en la dosis de AIB (de 0 a 4 ppm) influye favorablemente en la longitud de raíz.

Al respecto Rojas y Ramírez (1993), afirman que el principal efecto auxínico es la estimulación del alargamiento celular o su depresión según la concentración de la auxina, los principales procesos orgánicos que controlan las auxinas son: iniciación de la radícula y de las raíces adventicias, retención de frutos, paso de flor a fruto y juventud del follaje.

De otro lado Aniel *et al.* (2015), estudiaron cinco concentraciones de AIB (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg.L⁻¹), para el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Physalis angulata* L. logrando su mejor resultado cuando emplearon (1 mg.L⁻¹ de AIB) alcanzando una media general de (14.5 cm de longitud de raíz). De otro lado Sheeba *et al.* (2010), llegaron a obtener la mayor longitud de raíz (6.1 cm) a partir de brotes de *Physalis minima* L. sembrados en medio MS adicionado de (2 mg.L⁻¹ de AIB).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se encontró una respuesta creciente del número de brotes por explanta frente al aumento de la dosis de AG₃, pues se elevó de 1.22 a 1.25 y 1.26 brotes por explanta con dosis de AG₃ de 0, 0.2 y 0.4 ppm, respectivamente. En cambio, la respuesta del número de brotes por explanta frente al aumento de BAP de 0 a 0.5 y de 0.5 a 1 ppm fue diferente, pues en el primer caso se elevó de 1.22 a 1.28 brotes por explanta para finalmente decrecer de 1.28 a 1.26 brotes por explanta, respectivamente. Ninguna de las dosis probadas de AG₃ (0, 0.2 y 0.4 ppm) aceleran el proceso de brotamiento de explantas, tal como sí lo hace el BAP a 0.5 ppm de concentración, dosis con la cual el brotamiento se inició un día antes (7.5 días) que en el tratamiento control (8.5 días).
2. Independientemente, la incorporación de 0.2 ppm de AG₃ o de 0.5 ppm de BAP en el medio de cultivo optimizan el porcentaje de brotamiento in vitro de los explantas (76.67 y 86.67 %, respectivamente), número de hojas del brote mayor (2.34 y 3.09 hojas por brote mayor, respectivamente) y la longitud promedio del brote mayor (24.25 y 25.57 mm, respectivamente).
3. El brotamiento de explantas está asociado a la presencia de giberelinas y citocininas exógenas en el medio de cultivo. Manteniendo la concentración de BAP entre 0.5 y 1.0 ppm, y cuando la concentración de AG₃ en el medio de cultivo sube de 0 a 0.2 ppm se optimiza el brotamiento de explantas (100 %). La citocinina es el regulador del crecimiento de mayor impacto en el inicio del brotamiento. El tratamiento 6 (0.2 ppm AG₃ + 1 ppm BAP) fue el que menos días (6.5) necesitó para la iniciación del brotamiento de los explantas.
4. La giberelina y la citocinina cumplen un rol prioritario en la formación de nuevos brotes a partir de las yemas axilares de los explantas, pues incorporación de 0.4 ppm AG₃ y 1 ppm BAP en el medio de cultivo (t₉) estimula la formación del mayor número brotes por explanta (1.63). La citocinina, más que la giberelina, estimula la formación de hojas. El mayor número de hojas (3.09) se obtuvo con 0 ppm de AG₃

y 0.5 ppm BAP (t_2). La longitud del brote mayor, cambia en función a los balances hormonales utilizados. El mejor balance hormonal fue 0.2 ppm AG₃ y 1 ppm BAP el cual produjo brotes mayores con una longitud promedio de 31.1 mm.

5. Cien por ciento de brotes enraizaron bajo el efecto de los tratamientos 2 y 3 con dosis de 2 y 4 ppm de AIB, respectivamente. Adicionalmente, la dosis más alta de AIB (4 ppm) propicia el inicio de enraizamiento en el menor número de días (5.5), así como el mayor número de raíces (2.6) y la mayor longitud de la raíz mayor (59.7 mm) por plántula.
6. Se recomienda profundizar las investigaciones en este campo con la finalidad de determinar la dosis máxima de citocinina (BAP) necesaria para optimizar los procesos de formación y crecimiento de brotes, así como la mejor dosis de AIB necesaria para optimizar el número y la longitud de raíces.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

Abdelnour-Esquivel, A; Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. C.A.T.I.E. Costa Rica. 37 p.

Afroz, F; Hassan, A; Bari, L; Sultana, R; Begum, N; Jahan, A; Khatun, R. 2009. *In vitro* shoot proliferation and plant regeneration of *Physalis minima* L. a perennial medicinal herb. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 44 (4): 453 – 456.

Almanza, P. 2000. Propagación en: Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Impreso por: Universidad Nacional de Colombia, UNIBIBLOS. Primera Edición. Santa Fe de Bogotá-Colombia. 28 – 37 p.

Ambriz, J. 1995. Micropropagación de brotes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). A partir de plántulas germinadas *in vitro*. Tesis Maestro en Ciencias en Producción Agrícola. U. A. N. L. 70 p.

Andrade-Rodríguez, M; López-Peralta, M; González-Hernández, V; García-Velásquez, A; Peña-Lomelí, A. 2005. Efecto del genotipo en la micropropagación del tomate de cascara. Chapingo serie Horticultura. 11(1): 31 – 37.

Aniel, O; Ramesh, S; Subba, S. 2015. Establishment of a Rapid Plant Regeneration System in *Physalis angulata* L. through axillary meristems. Notulae Scientia Biologicae. 7 (4): 471 – 474.

Araujo, G. 2006. El cultivo de Aguaymanto disponible en http://aguaymanto_blog.galeon.com/tags/physalis/, fecha de acceso: 20 de Abril 2015.

Azcón-Bieto, J; Talon, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.L. Segunda Edición. España. 669 p.

- Barriga, P; Díaz, M; Moncayo, E. 2008. Estandarización de un técnica de propagación *in vitro* a partir de material foliar de una especie vegetal promisorio (*Physalis peruviana* L.). Investigación y ciencia del gimnasio campestre. 58 – 65 p.
- Barrueto, L. 2005. El cultivo de tejidos en: Biotecnología Vegetal. PROGRAF impresores. Santiago, CHILE. 31 – 46 p.
- Boeri, P. 2015. Medios de cultivo – Reguladores de crecimiento en: PLANTAS DE PROBETA, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad de La Plata. Primera Edición. Buenos Aires, ARGENTINA. 47 – 63 p.
- Brown, C; Campell, I; Priest, F. 1989. Introducción a la biotecnología. Editorial Acribia S. A. España. 167 p.
- Chacón-cerdas, R; Flores-Mora, D; Alvarado-Marchena, L; Schmidt-Durán, A; Alvarado-Ulloa, C. 2014. Cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. Tecnología en marcha. VI Encuentro de investigación y extensión. 45 – 55 p.
- Contreras, I; Almeida, J. 2003. Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). Facultad de la Farmacia. 45 (1): 61 – 64.
- CRFG. California Rare Fruit Growers. 1997. Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). Inc. 30 p.
- Escalante, B. 1989. Cultivo *in vitro* de papa principios y metodología. Editorial e Imprenta “El Rosario” Cajamarca. 89 p.
- Fisher, G. 2000. Crecimiento y Desarrollo en: Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Impreso por: Universidad Nacional de Colombia, UNIBIBLOS. Primera Edición. Santa Fe de Bogotá-Colombia. 16 – 20 p.
- Fischer, G. 1989. "Aspectos fisiológicos del desarrollo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). En Memorias IV Seminario Nacional Recursos Vegetales Promisorios. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - Tunja. 190 p.

García-osuna, H; Escobedo, L; Robledo-Torres, V; Benavides, A. y Ramírez, F. 2015. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Pub. Esp. Núm. 12: 2301 – 2311.

Hurtado, D; Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas tercera reimpresión. México. 232 p.

Jordan, M. 2005. Aplicaciones de la Técnica de Cultivo de Tejidos en: Biotecnología Vegetal. PROGRAF impresores. Santiago, CHILE. 55 – 71 p.

Krikorian, A. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. CIAT. Colombia. 42 – 59 p.

Litz, R; Jarret, R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y Organogénesis. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. CIAT. Colombia. 144 – 157 p.

Manzo-González, A; Ledesma-Hernández, A; Villatoro-López, J; Álvarez-Escañero, I; Rodríguez-De la O, J; Peña-Lomelí, A. 1998. Regeneración *in vitro* del tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Serie Horticultura. 4 (1): 45 – 49.

Medina, M. E. 1991. El cultivo de uchuva tipo exportación. Agric. Tropical. 64 p.

Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2010. Establecimiento de Cultivo de Tejidos Vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA. Segunda Edición. ARGENTINA. 17 – 25 p.

Nogueira, J. 2013. MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Physalis peruviana* E *Physalis alkekengi*. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL. 69 p.

Olmos, S; Luciani, G; Galdeano, E. 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA. Segunda Edición. ARGENTINA. 353 – 357 p.

- Otroshy, M; Mokhtari, A; Mehdi, S; Bazrafshan, A. 2013. Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis peruviana* L. *International Journal of farming and Allied Sciences*. 2(9): 214 – 218.
- Pierik, R. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. España. 326 p.
- Rache, L; Pacheco, J. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en Desarrollo*. 4(1): 71 – 86.
- Ramar, K; Ayyadurai, V; Arulprakash, T. 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.
- Robert, M; Arce, M; Eastmond, A. 2004. Biotecnología Vegetal. En: Biotecnología Alimentaria. Quinta Reimpresión. Edit. LIMUSA S. A. México. 69 -78 p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura tropical. CIAT. Colombia. 19 – 40 p.
- Roca, W; Ramírez, H. 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Coordinador de la Producción de Documentos Originales: Vicente Zapata S., Ed. D., Cali, Colombia. 174 p.
- Rojas, M; Ramírez, H. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. Fisiología – Tecnología – Experimentación. Segunda Edición. Edit. LIMUSA, S.A. México. 29 – 34 p.
- Salisbury, F; Ross, C. 2000. Fisiología de las Plantas. COPYRIGHT. Madrid – España. 567 p.
- Sandhya, H; Srinath, R. 2015. Role of growth regulators on *in vitro* callus induction and direct regeneration in *Physalis minima* L. *International Letters of Natural Sciences*. 44: 38 – 44.
- Santana, G; Angarita, A. 1997. Regeneración Adventicia de Somaclones de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Agronomía Colombiana*. 14(1): 59 – 65.

Sheeba, E; Parvathy, S; Planivel, S. 2010. Direct regeneration from leaves and nodes explants of *Physalis minima* L. European Journal of Applied Sciences. 2 (2): 58 – 61.

Tapia, M; Fries, A. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima. Millenium digital SRL. Lima – Perú. 209 p.

Velásquez, T. 2003. Innovación agraria: tomatillo. INIA Cajamarca. 36 p.

Villalobos, V; Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. CIAT. Colombia. 128 p.

Viteri, E. 1992. Seminario sobre Procesamiento de frutas y hortalizas. Hortalizas, Ambato, ITAS-LAM-CAAI. 72 p.

Weaver, R. 1996. Reguladores del Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Octava Reimpresión. Edit. Trillas. México. 18 – 20 p.

Yücesan, B; Mohammed, A; Arslan, M; Gürel, E. 2015. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. Disponible en: <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/>, Fecha de acceso 10 de marzo 2016.

ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN “MADRE” UTILIZADA EN LA PREPARACIÓN DEL MEDIO MS (1962), 1X.

Tabla 13. Componentes del medio de cultivo MS (1962)

Sales minerales y vitaminas	Concentración (mg.L⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ 7H ₂ O	740
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ 4H ₂ O	10.9
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6
KI	0.82
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	74.5
FeSO ₄ 7H ₂ O	55.7
Vitaminas	
Mio-Inositol	100
Tiamina HCl	1
Compuesto energético	
Sacarosa	30000
Gelificante	
Agar (AGAR AGAR ING)	9000

ANEXO 2. DATOS OBTENIDOS EN LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Tabla 14. Resultados de la fase de multiplicación para la variable número de brotes por explanta (números promedios)

DATOS ORIGINALES

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	1.00	1.00	1.00	3.00	1.00
2	1.00	1.33	1.14	3.47	1.16
3	1.00	1.00	1.33	3.33	1.11
4	1.00	1.22	1.00	3.22	1.07
5	1.80	1.40	1.10	4.30	1.43
6	1.50	1.30	1.10	3.90	1.30
7	1.00	1.11	1.20	3.31	1.10
8	1.90	1.90	1.00	4.80	1.60
9	2.30	2.20	2.00	6.50	2.17
TOTAL	12.50	12.46	10.87	35.83	1.33

DATOS TRANSFORMADOS: $Y = \sqrt{X + 0.5}$

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	1.22	1.22	1.22	3.66	1.22
2	1.22	1.35	1.28	3.85	1.28
3	1.22	1.22	1.35	3.79	1.26
4	1.22	1.31	1.22	3.75	1.25
5	1.52	1.38	1.26	4.16	1.39
6	1.41	1.34	1.26	4.01	1.34
7	1.22	1.27	1.30	3.79	1.26
8	1.55	1.55	1.22	4.32	1.44
9	1.67	1.64	1.58	4.89	1.63
TOTAL	12.25	12.28	11.69	36.22	1.34

Tabla 15. Resultados de la fase de multiplicación para la variable número de hojas por explanta (números promedios)

DATOS ORIGINALES

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	2.75	2.67	2.33	7.75	2.58
2	8.90	8.78	9.43	27.11	9.04
3	3.88	2.78	4.67	11.33	3.78
4	4.50	5.44	5.00	14.94	4.98
5	5.80	5.50	4.70	16.00	5.33
6	6.50	7.60	6.40	20.50	6.83
7	3.25	3.78	4.20	11.23	3.74
8	4.50	4.90	2.86	12.26	4.09
9	4.20	4.50	4.75	13.45	4.48
TOTAL	44.28	45.95	44.34	134.57	4.98

DATOS TRANSFORMADOS: $Y = \sqrt{X + 0.5}$

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	1.80	1.78	1.68	5.26	1.75
2	3.07	3.05	3.15	9.27	3.09
3	2.09	1.81	2.27	6.17	2.06
4	2.24	2.44	2.35	7.03	2.34
5	2.51	2.45	2.28	7.24	2.41
6	2.65	2.85	2.63	8.13	2.71
7	1.94	2.07	2.17	6.18	2.06
8	2.24	2.32	1.83	6.39	2.13
9	2.17	2.24	2.29	6.70	2.23
TOTAL	20.71	21.01	20.65	62.37	2.31

Tabla 16. Resultados de la fase de multiplicación para la variable longitud de brote mayor (mm) por explanta (números promedios)

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	11.38	13.17	13.33	37.88	12.63
2	24.70	22.44	29.57	76.71	25.57
3	20.88	13.56	24.33	58.77	19.59
4	20.70	24.56	27.50	72.76	24.25
5	28.40	25.20	22.30	75.90	25.30
6	26.00	29.60	37.70	93.30	31.10
7	25.13	19.00	27.00	71.13	23.71
8	24.20	24.70	23.57	72.47	24.16
9	26.70	26.10	29.88	82.68	27.56
TOTAL	208.09	198.33	235.18	642.41	23.76

Tabla 17. Resultados de la fase de enraizamiento para la variable número de raíces por brote (números promedios)

DATOS ORIGINALES

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	2.00	1.33	1.67	5.00	1.67
2	3.10	4.00	3.90	11.00	3.67
3	6.80	8.00	4.30	19.10	6.37
TOTAL	11.9	13.33	9.87	35.1	3.90

DATOS TRANSFORMADOS: $Y = \sqrt{X + 0.5}$

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	1.58	1.35	1.47	4.40	1.47
2	1.90	2.12	2.10	6.12	2.04
3	2.70	2.92	2.19	7.81	2.60
TOTAL	6.18	6.39	5.76	18.33	2.04

Tabla 18. Resultados de la fase de enraizamiento para la variable longitud de raíz mayor en (mm) por plántula (números promedios)

TRAT	BLOQUES			TOTAL	PROM
	I	II	III		
1	47.60	49.00	55.50	152.10	50.70
2	54.70	60.20	57.80	172.70	57.57
3	58.50	62.20	58.40	179.10	59.70
TOTAL	160.80	171.40	171.70	503.90	55.99

Tabla 19. Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número de brotes (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Ord. de merito	Tratamiento	N° promedio de brotes / explanta	significación 0.05
1	T ₉	1.63	A
2	T ₈	1.44	A B
3	T ₅	1.39	A B
4	T ₆	1.34	B
5	T ₂	1.28	B
6	T ₃	1.26	B
7	T ₇	1.26	B
8	T ₄	1.25	B
9	T ₁	1.22	B

Tabla 20. Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número de hojas (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Ord. de merito	Tratamiento	N° promedio de hojas /explanta	significación 0.05
1	T ₂	3.09	A
2	T ₆	2.71	A B
3	T ₅	2.41	B C
4	T ₄	2.34	B C
5	T ₉	2.23	C
6	T ₈	2.13	C D
7	T ₇	2.06	C D
8	T ₃	2.06	C D
9	T ₁	1.75	D

Tabla 21. Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable longitud de brote mayor (mm)

Ord. de merito	Tratamiento	Longitud promedio de brote mayor (mm)	significación 0.05
1	T ₆	31.10	A
2	T ₉	27.56	A B
3	T ₂	25.57	A B
4	T ₅	25.30	A B
5	T ₄	24.25	A B
6	T ₈	24.16	A B
7	T ₇	23.71	A B
8	T ₃	19.59	B C
9	T ₁	12.63	C

Tabla 22. Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable número de raíces (datos transformados con $Y = \sqrt{X + 0.5}$)

Ord. de merito	Tratamiento	Nº promedio de raíces / brote	Significación 0.05
1	T ₃	2.60	A
2	T ₂	1.04	A B
3	T ₁	1.47	B

Tabla 23. Prueba de Rango Múltiple de Tukey al 5 % de probabilidad para la variable longitud de raíz mayor

Ord. de merito	Tratamiento	Longitud promedio de la raíz mayor (mm)	Significación 0.05
1	T ₃	59.70	A
2	T ₂	57.57	A B
3	T ₁	51.30	B

Tabla 24. Registro de temperatura y humedad relativa durante la investigación

Fases de establecimiento y multiplicación			Fase de enraizamiento		
Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Fecha	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
11/11/15	24.0	47.0	28/12/15	28.0	35.0
12/11/15	25.5	51.0	29/12/15	31.0	37.0
13/11/15	25.0	50.0	30/12/15	32.0	34.0
16/11/15	25.0	48.0	31/12/15	33.0	42.0
17/11/15	24.5	54.0	04/01/16	28.1	45.0
18/11/15	25.0	51.0	05/01/16	28.0	48.0
19/11/15	25.8	56.0	06/01/16	29.8	44.0
20/11/15	27.7	52.0	07/01/16	28.0	46.0
23/11/15	25.8	55.0	08/01/16	29.0	43.0
24/11/15	25.3	54.0	11/01/16	30.3	45.0
25/11/15	26.5	55.0	12/01/16	32.0	38.0
26/11/15	26.0	51.0	13/01/16	32.0	40.0
27/11/15	24.6	50.0	14/01/16	30.5	35.0
30/11/15	27.0	49.0	15/01/16	34.0	41.0
01/12/15	25.4	53.0	18/01/16	31.8	48.0
02/12/15	25.9	47.0	19/01/16	29.5	46.0
03/12/15	26.5	50.0	20/01/16	30.5	42.0
04/12/15	27.8	46.0	21/01/16	33.0	39.0
07/12/15	31.4	43.0	22/01/16	34.0	32.0
08/12/15	30.6	41.0	25/01/16	33.0	43.0
09/12/15	28.5	51.0			
10/12/15	32.5	40.0			
11/12/15	33.5	39.0			
14/12/15	31.5	39.0			
15/12/15	30.5	40.0			
16/12/15	30.8	43.0			
17/12/15	31.0	40.0			
18/12/15	33.3	40.0			
21/12/15	28.3	38.0			
22/12/15	27.6	50.0			