

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Escuela Profesional de Agronomía**

**ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE EXPLANTES NODALES  
DEL ZAPALLO DE PLANTA (*Cucurbita sp.*)**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. ESTHER CONDORI CUNO**

**Para optar el Título Profesional de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TACNA - PERÚ**

**2022**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Escuela Profesional de Agronomía**

**TESIS**

**ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE EXPLANTES NODALES**

**DEL ZAPALLO DE PLANTA (*Cucurbita sp.*)**

Tesis sustentada y aprobada el 20 de diciembre de 2018, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE :   
MSc. ARÍSTIDES CHOQUEHUANCA TINTAYA

SECRETARIO :   
Dra. ROSARIO ELENA ZEGARRA ZEGARRA

VOCAL :   
Dra. NELLY ARÉVALO SOLSOL

ASESOR :   
Dr. OSCAR OCTAVIO FERNÁNDEZ CUTIRE

## **CERTIFICADO DE SIMILITUD**

Yo Oscar Octavio Fernández Cutire, en mi condición de asesor del trabajo de tesis titulado "ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE EXPLANTES NODALES DEL ZAPALLO DE PLANTA (Cucurbita sp.)" presentado por el bachiller ESTHER CONDORI CUNO para ser publicado en el repositorio institucional. Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la evaluación realizada a través de software de similitud textual Turnitin cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es de 8% de similitud general. Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD del trabajo de tesis está de acuerdo al nivel permitido, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación. Se emite el presente certificado con los fines de continuar con los tramites respectivos para su publicación.

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Oscar Octavio Fernández Cutire**  
DNI 00472839  
Asesor de Tesis



## **DEDICATORIA**

### **A mis padres, Raúl y Elena**

Por su gran amor, apoyo incondicional e inculcarme valores como el respeto, humildad y gratitud que me permitirán convertirme en una gran profesional.

### **A mis hermanos**

Por su orientación constante, y además, por la gran confianza que siempre depositaron en mí.

### **A mi compañero de vida**

Por su motivación constante en todo este proceso académico, lo cual coadyuvó a la obtención del título profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi familia y amigos**

Quienes siempre estuvieron alentándome en cada etapa de la realización de la presente investigación.

### **A mi asesor Dr. Oscar Fernández Cutire**

Por guiar nuestro estudio con pertinencia. Asimismo, por compartir sus experiencias académicas.

## CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>v</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvii</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>3</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Formulación del problema .....	4
1.2.1. Problema general .....	4
1.2.2. Problemas específicos.....	5
1.3. Delimitación de la investigación .....	5
1.4. Justificación .....	5
1.5. Limitaciones .....	7
<b>CAPÍTULO II OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>8</b>

2.1. Objetivos .....	8
2.1.1. Objetivo general.....	8
2.1.2. Objetivos específicos.....	8
2.2. Hipótesis.....	9
2.2.1. Hipótesis general .....	9
2.2.2. Hipótesis específicas .....	9
2.3. Variables .....	9
2.3.1. Variable independiente (X) .....	9
2.3.2. Variable dependiente (Y) .....	10
<b>CAPÍTULO III MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....</b>	<b>11</b>
3.1. Antecedentes .....	11
3.2. Generalidades .....	16
3.2.1. El cultivo de zapallo .....	16
3.2.2. El Cultivo de tejidos vegetales .....	24
3.2.3. Control preventivo de la contaminación microbiana .....	30
3.2.4. La micropropagación .....	33
<b>CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Tipo de investigación.....	37

4.2. Ubicación del experimento .....	37
4.3. Material experimental .....	37
4.4. Tratamientos en estudio .....	38
4.5. Variables de respuesta.....	38
4.5.1. Número de explantes no contaminados por hongos.....	39
4.5.2. Número de explantes no contaminados por bacterias .....	39
4.5.3. Número de explantes no contaminados por levaduras.....	39
4.5.4. Número de explantes viables.....	40
4.5.5. Altura de brote (cm) .....	40
4.5.6. Número de nudos por brote .....	40
4.5.7. Número de explantes brotados.....	41
4.6. Diseño experimental.....	41
4.6.1. Análisis estadístico .....	41
4.6.2. Procedimiento experimental .....	42
<b>CAPÍTULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
5.1. Número de explantes no contaminados por hongos .....	46
5.2. Número de explantes no contaminados por bacterias.....	49
5.3. Número de explantes no contaminados por levaduras.....	51

5.4. Número de explantes viables .....	54
5.5. Altura de brote (cm) .....	60
5.6. Número de nudos por brote.....	63
5.7. Número de explantes brotados.....	65
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por hongos.....	46
Tabla 2	Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por bacterias .....	49
Tabla 3	Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por levaduras .....	52
Tabla 4	Análisis de varianza para la variable número de explantes viables.....	55
Tabla 5	Análisis de varianza de regresión para la variable número de explantes viables.....	56
Tabla 6	Análisis de varianza para la variable altura de brote (cm).....	60
Tabla 7	Análisis de varianza para la variable número de nudos por brote.....	63
Tabla 8	Análisis de varianza para la variable número de explantes brotados .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres botánicos diferenciales de las principales especies cultivadas del género Cucurbita.....	23
Figura 2. Porcentaje de contaminación por hongos en explantes nodales del zapallo planta .....	47
Figura 3. Porcentaje de contaminación por bacterias en explantes nodales del zapallo de planta .....	50
Figura 4. Porcentaje de contaminación por levaduras en explantes nodales del zapallo de planta.....	53
Figura 5. Función lineal de la viabilidad de explantes con las concentraciones de lejía Clorox.....	57
Figura 6. Porcentaje del número de explantes viables del zapallo de planta .....	58
Figura 7. Altura de brote en explantes nodales del zapallo de planta ....	61
Figura 8. Número de nudos por brote en explantes nodales del zapallo de planta .....	64

Figura 9. Porcentaje de explantes brotados del zapallo de planta  
..... 66

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medio Murashige y Skoog utilizado en el proceso de desinfección e introducción de explantes nodales del zapallo de planta .....	80
Anexo 2. Evaluación del número de explantes no contaminados por hongos, a los 15 días de la introducción .....	81
Anexo 3. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por hongos para el análisis de varianza .....	81
Anexo 4. Evaluación del número de explantes no contaminados por bacterias, a los 30 días de la introducción .....	81
Anexo 5. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por bacterias para el análisis de varianza .....	82
Anexo 6. Evaluación del número de explantes no contaminados por levaduras, a los 30 días de la introducción .....	82
Anexo 7. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por levaduras para el análisis de varianza	82
Anexo 8. Evaluación del número de explantes viables, a los 30 días de la introducción.....	83

Anexo 9. Datos proporcionales del número de explantes viables para el análisis de varianza.....	83
Anexo 10. Evaluación de la altura de brote (cm), a los 30 días de la introducción.....	83
Anexo 11. Datos para el análisis de varianza en la variable altura de brote (cm).....	84
Anexo 12. Evaluación del número de nudos por brote, a los 30 días de la introducción.....	84
Anexo 13. Datos para el análisis de varianza en la variable número de nudos por brote .....	84
Anexo 14. Evaluación del número de explantes brotados, a los 30 días de la introducción.....	85
Anexo 15. Datos proporcionales del número de explantes brotados para el análisis de varianza.....	85
Anexo 16. Galería fotográfica de actividades realizadas en el establecimiento in vitro del zapallo de planta.....	86

## RESUMEN

El presente estudio de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna durante los meses de marzo a diciembre del 2017. El principal objetivo fue lograr el establecimiento in vitro de explantes nodales del zapallo de planta (*Cucúrbita* sp.), determinando la concentración adecuada de lejía Clorox para el establecimiento aséptico de los explantes nodales y el nivel adecuado de 6-bencilaminopurina (BAP) para la inducción de brotes. La investigación se realizó en dos etapas, en la primera etapa los tratamientos fueron 4 concentraciones de lejía Clorox: 10, 20, 40 y 60 %, y en la segunda etapa los tratamientos fueron 4 niveles de 6-bencilaminopurina: 1, 2, 4 y 8 mg/l. El diseño experimental fue el completamente aleatorio con 4 repeticiones y 4 muestras por unidad experimental. Los resultados revelan que las concentraciones de lejía Clorox lograron el establecimiento aséptico de los explantes nodales del zapallo de planta y que las concentraciones de 10 y 20 % obtuvieron resultados altamente significativos, alcanzando el 100 % de explantes viables. Asimismo, se determinó que los niveles de 6-bencilaminopurina indujeron la generación de brotes en los explantes nodales del zapallo de planta, no encontrando diferencias significativas

entre los tratamientos; y que para ambos casos no fue posible determinar la concentración o el nivel adecuado.

**Palabras clave:** Explante, establecimiento in vitro, lejía Clorox, 6 - bencilaminopurina (BAP).

## **ABSTRACT**

The research was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the National University Jorge Basadre Grohmann - Tacna; during the months of March to December 2017. The main objective was to achieve the *in vitro* establishment of nodal explants of the squash (*Cucurbita* sp.), determining the appropriate concentration of Clorox bleach for the aseptic establishment of the nodal explants and the level Adequate 6-benzylaminopurine (BAP) for shoot induction. The investigation was carried out in two stages, in the first stage the treatments were 4 concentrations of Clorox bleach: 10, 20, 40 and 60%, and in the second stage the treatments were 4 levels of 6-benzylaminopurine: 1, 2, 4 and 8mg/l. The experimental design was completely randomized with 4 repetitions and 4 samples per experimental unit. The results reveal that the concentrations of Clorox bleach achieved the aseptic establishment of the nodal explants of the pumpkin plant and that concentrations of 10 and 20% obtained highly significant results, reaching 100% of viable explants. Likewise, it was determined that the levels of 6-benzylaminopurine induced the generation of shoots in the nodal explants of the plant pumpkin, with no significant differences being

found between the treatments; and that for both cases it was not possible to determine the concentration or the appropriate level.

**Keywords:** Explant, in vitro establishment, Clorox bleach, 6-benzylaminopurine (BAP).

## INTRODUCCIÓN

El zapallo pertenece a la familia de las Cucurbitáceas y es originaria de las Américas. El género *Cucurbita* tiene 25 especies de interés agronómico divididas en diferentes grupos. Estas especies que se cultivan pertenecen a *Cucurbita máxima*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata* y *Cucurbita mixta* (Astorquizaga, 2009).

El uso más importante de las especies cultivadas de *Cucurbita* está destinado al alimenticio, no solo en América Latina, sino también en otras partes del mundo (Lira, et al. 2009).

En la región Tacna, específicamente en la localidad de Pachía, se cultiva la especie denominada “zapallo de planta”, un cultivo que otrora tenía alta demanda, motivo por el cual la producción se extendía hasta la ciudad de Arica. Este producto era cultivado mayormente en las localidades de Pachía, Calana, Pocollay y los sectores de Para y Magollo; una de las cualidades de este cultivo es que se consume como alimento especial para bebés (papilla) y en la dieta de ancianos (Ramos, 2007). Teniendo en cuenta que el zapallo de planta está siendo desplazada por otras especies más rentables, y viendo la necesidad de conservar y preservar esta especie

es que se hace necesario el uso de nuevas técnicas de propagación como el cultivo in vitro de tejidos vegetales.

En un sentido amplio, el cultivo de tejidos in vitro incluye un conjunto de técnicas en las que los explantes (distintas partes de una planta) se cultivan asépticamente en medios de una composición química definida y se incuban en condiciones de luz y temperatura controladas (Roca & Mroginski, 1991).

Estas técnicas fueron aplicadas para el desarrollo de la presente investigación, buscando lograr el establecimiento in vitro de explantes nodales del zapallo de planta de forma aséptica y hallar el equilibrio hormonal necesario para la inducción de brotes.

De esta manera evitar la extinción de la especie en estudio, y poder contribuir a su conservación, y quizá más adelante poder competir con aquellas especies de fácil propagación como el zapallo de carga, zapallo macre, el zapallo camote, entre otras.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Planteamiento del problema**

En la región de Tacna el zapallo de planta (*Cucurbita* sp.) es una especie local propagada vegetativamente, que era muy cultivada y consumida , pero que paulatinamente ha ido sufriendo una fuerte tendencia a ser sustituida por variedades de la misma especie, las cuales son propagadas por medio de semillas; esto ha dificultado su disponibilidad hacia los productores.

De acuerdo a las evaluaciones realizadas en campo, la población de individuos del zapallo de planta no supera el centenar, este resultado es concordante con el sistema tradicional de propagación vegetativa implementado por los mismos productores, cuyas características son una limitante para su conservación.

Uno de los obstáculos para la micropropagación de esta especie, sobre todo en la etapa de establecimiento in vitro, es la contaminación causada por hongos, bacterias y levaduras, debido a que las plantas madre provienen de campo.

Estos agentes contaminantes pueden competir con los nutrientes y dañar al explante impidiendo su crecimiento.

En esta etapa del cultivo *in vitro* se tiene dos características fundamentales: el control de los agentes contaminantes para lograr el establecimiento aséptico (ausencia de gérmenes), y el equilibrio hormonal para inducir la organogénesis. Es por ello que, en coordinación con el equipo de investigación del laboratorio de Biotecnología Vegetal, decidimos llevar a cabo dicho proyecto de investigación haciendo uso de las técnicas del cultivo de tejidos, esperando desarrollar el protocolo adecuado para la introducción al sistema *in vitro* y su posterior multiplicación, y de esta forma hacer posible el repoblamiento en los campos de cultivo y ayudar en la conservación de este importante recurso genético.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuál es la concentración de lejía Clorox y el nivel de 6-bencilamonopurina que permite lograr el desarrollo de brotes asépticos a partir de explantes nodales del zapallo de planta en la etapa de establecimiento *in vitro*?

### **1.2.2. Problemas específicos**

¿Cuál es la concentración adecuada de lejía Clorox para el establecimiento aséptico de explantes nodales del zapallo de planta?

¿Cuál es el nivel adecuado de 6-bencilaminopurina para la inducción de brotes en explantes nodales del zapallo de planta?

### **1.3. Delimitación de la investigación**

En el presente trabajo de investigación, se determinó la concentración de lejía Clorox y el nivel de 6-bencilaminopurina (BAP), para el establecimiento *in vitro* de explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita sp.*). Nuestro estudio fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna y esta información corresponde al periodo comprendido entre los meses de marzo a diciembre de 2017.

### **1.4. Justificación**

El zapallo de planta es un cultivo de importancia económica para la región, es cultivado tradicionalmente por su alto valor nutritivo. Se conoce que producto del desarrollo urbano las zonas productoras han sido desplazadas hacia distritos más alejados y el proceso de adaptación a un

nuevo medio ecológico conllevó a que esta especie sea vulnerable. Evidenciándose la reducción de su población en los últimos años, con la existencia mínima de áreas cultivadas con zapallo de planta. Por lo que se corre el riesgo de que la especie ingrese a un proceso de extinción y la oferta del fruto disminuya e incluso desaparezca.

Una forma de preservar esta especie es la conservación *in situ*. Sin embargo, esta posibilidad tiene sus limitaciones, ya que los productores apuestan por el uso de esquejes como medio de propagación, lo que se hace cada vez menos factible debido a la escasez de material vegetal y a factores relacionados con la proliferación de plagas y enfermedades que se presentan en el cultivo.

Bajo esta premisa se apuesta por el uso de la Biotecnología a través de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*. Una de las etapas del cultivo de tejidos es la del establecimiento o introducción, con el cual se da inicio al proceso del cultivo *in vitro* que permitirá la inducción de brotes asépticos y la generación de vitroplantas, posibilitando la ampliación de las áreas de cultivo y su conservación *ex-situ*.

En consecuencia, se hace necesario el uso de nuevas técnicas de propagación como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, que faciliten la obtención de un gran número de plantas en corto tiempo y en un buen

estado fitosanitario. Esta técnica también es importante en el rescate y preservación de especies amenazadas y aquellas en peligro de extinción.

### **1.5. Limitaciones**

Las limitaciones que se tuvo en el desarrollo del presente estudio de investigación, estuvieron relacionadas con: la limitada población de plantas de esta especie, lo cual dificulta la obtención de material vegetativo y la falta de referencias a nivel nacional o local con respecto al establecimiento in vitro de esta especie.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **2.1. Objetivos**

##### **2.1.1. Objetivo general**

Determinar una concentración de lejía Clorox y un nivel de 6-bencilamonopurina que permite lograr el desarrollo de brotes asépticos a partir de explantes nodales del zapallo de planta en la etapa de establecimiento *in vitro*.

##### **2.1.2. Objetivos específicos**

Determinar la concentración adecuada de lejía Clorox, para el establecimiento aséptico de explantes nodales del zapallo de planta.

Determinar el nivel adecuado de 6-bencilaminopurina para la inducción de brotes en explantes nodales del zapallo de planta.

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Hipótesis general**

Existe una concentración de lejía Clorox y un nivel de 6-bencilamonopurina que permite lograr el desarrollo de brotes asépticos a partir de explantes nodales del zapallo de planta en la etapa de establecimiento *in vitro*.

### **2.2.2. Hipótesis específicas**

Existe la concentración adecuada de lejía Clorox para el establecimiento aséptico de explantes nodales del zapallo de planta.

Existe el nivel adecuado de 6-bencilaminopurina para la inducción de brotes en explantes nodales del zapallo de planta.

## **2.3. Variables**

### **2.3.1. Variable independiente (X)**

Etapa 1: Concentraciones de lejía Clorox.

Etapa 2: Niveles de 6- bencilaminopurina (BAP).

### **2.3.2. Variable dependiente (Y)**

Etapa 1: Número de explantes no contaminados.

Etapa 2: Número de explantes brotados.

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL**

#### **3.1. Antecedentes**

Pacheco (2005), llevó a cabo una investigación sobre la “Determinación de una metodología de desinfección y un medio de cultivo para la introducción y micropropagación *in vitro* de once ecotipos de cucúrbitas y cuatro de pasifloras”, controlando la contaminación fúngica con una doble desinfección el cual consistió en lavar los explantes con una solución de jabón líquido y yodo, sumergirlos en una solución de Benomil al 1 % por 5 minutos, someter los explantes dos veces a una solución de alcohol al 50 % durante 30 segundos y finalmente sumergirlos en una solución de cloro comercial al 10 % por 10 minutos, obteniendo como resultado 21,2 % de contaminación bacteriana y logra un 97 % de explantes viables.

Sánchez & Salaverría (2004), en el trabajo sobre el control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.), evaluaron el tiempo de inmersión (10, 20 y 30 minutos) y tres concentraciones (10, 20 y 30 %) de cloro comercial en la desinfección

de explantes de fresa cv. Fresno. Concluyendo que 20 % de cloro comercial por 20 minutos lograron un bajo porcentaje de contaminación, un alto porcentaje de sobrevivencia y una mayor formación de brotes en los explantes. Además, refieren que al controlar la oxidación de los explantes obtuvieron una sobrevivencia del 100%.

Hine & Abdelnour (2013), durante el establecimiento *in vitro* de arándano, revelan que la utilización de brotes tiernos y la desinfección, que consistió en el uso de hipoclorito de sodio al 1,5 % por un tiempo de 40 minutos, permitió el 75 % de explantes asépticos, así mismo menciona que la contaminación en los cuatro tratamientos se debió a la presencia de hongos.

Héctor, *et al.* (2005), en la investigación titulada “Un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.)”, indican que observaron la aparición persistente de colonias de bacterias en los explantes, de color amarillento-rosado en un 92 % de los casos, y que al ser aisladas se determinó que pertenecían al género *Streptobacillus* y *Enterobacter*.

Haque, *et al.*, (2008), al realizar la investigación sobre la propagación *in vitro* de *Cucúrbita máxima* y *Benincasa hispida* a través de segmentos nodales, usaron diferentes concentraciones y combinaciones de

bencilaminopurina y ácido naftalenacético, teniendo como resultado que la mejor hormona para inducir un mayor número de brotes por explante eran los medios que contenían 2 mg/l de bencilaminopurina para *Cucurbita maxima* y 1,5 mg/l de bencilaminopurina para *Benincasa hispida*.

Parvin, *et al.*, (2013), elaboraron un protocolo para la propagación *in vitro* de melón (*Cucumis melo* L.), a través de segmentos nodales, ápices y nudos de cotiledones, los cuales fueron implantados en el medio Murashige & Skoog con diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas, como resultado determinan que 2 mg/l de bencilaminopurina induce el 90 y 70 % de brotes múltiples.

Alam, *et al.*, (2015), llevaron a cabo una investigación para desarrollar un sistema eficiente en la regeneración de explantes nodales de *Cucumis sativus* considerando diferentes concentraciones hormonales, y comprobaron que bencilaminopurina a una concentración de 1,5 mg/l ayudó en la regeneración de brotes en un 87 %, y Kinetina a una concentración de 1,5 mg/l regeneró un 53 % de brotes, de esta forma reafirman que la adición de citoquinina es esencial para inducir la formación de brotes.

A fin de propagar plantas de guayabo Ramírez M. y Salazar E., (1997), efectuaron el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de

guayabo (*Psidium guajava* L.) en el cual probaron diferentes concentraciones de bencilaminopurina para inducir la formación de brotes en yemas axilares, y como respuesta sugieren el uso de 4 mg/l bencilaminopurina que indujo un 88 % de explantes brotados.

Mahzabin, F., S Parvez S. y Alam, M.F. (2008), realizaron la micropropagación de *Cucurbita maxima* Duch. Utilizando ápices de los cultivares Bikrompuri y Baromasi, los cuales fueron cultivados en medio Murashige & Skoog que contenía kinetina, bencilaminopurina y ácido naftalenacético en varios niveles y combinaciones para la inducción y proliferación de brotes, la mejor respuesta se encontró en el medio que contenía 3 mg/l de bencilaminopurina con un 90,45 % de explantes brotados para el cultivar Bikrompuri y 87,75 % de explantes brotados para el cultivar Baromasi.

Sánchez *et al.*, (2009), efectuaron una investigación para establecer las condiciones *in vitro* para la inducción de organogénesis de dos genotipos de calabaza (*Cucurbita pepo* L.): variedad Brujita y Round Zucchini, empleando el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) complementado con 1 mg/l de 6-Bencilaminopurina para inducir la formación de brotes, y como resultado se logró la diferenciación de brotes en estas variedades.

Haque *et al.*, (2010), llevaron a cabo un estudio para la regeneración *in vitro* de calabaza a través de meristemas apicales, que se cultivaron en medio Murashige y Skoog complementados con diferentes niveles de bencilaminopurina y una combinación de ésta con ácido giberélico, como resultado la formación de brotes se dio en el medio que contenía 1,5 mg/l de bencilaminopurina individualmente o combinado con 0,1 mg/l de ácido giberélico.

Sarowar (2003), desarrolló un protocolo eficiente para la micropropagación *in vitro* de un cultivar híbrido de *Cucurbita interrespecifica* (Shintosa), para ello utilizaron yemas apicales que fueron cultivados en medio Murashige y Skoog, con varias combinaciones y concentraciones de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético. La mejor condición para el crecimiento de brotes se halló en el medio que contenía 3 mg/l de 6-bencilaminopurina con un 85 % de brotes regenerados.

Stipp *et al.*, (2012), en el estudio para la elaboración de un protocolo para el cultivo *in vitro* de *Cucurbita pepo* cv. Caserta, utilizaron segmentos de cotiledones e hipocótilo que fueron cultivadas en medio Murashige & Skoog suplementado con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (0, 1,1, 2,2, 3,3, 4,5 y 5,5 mM), como resultado el medio que contenía 4,5 mM de bencilaminopurina indujo la mejor proliferación de brotes.

Escandón et al., (2003), durante la elaboración un protocolo para la multiplicación *in vitro* de Santa Rita (*Bougainvillea sp*), introdujeron explantes que se cultivaron en el medio Murashige Skoog (1962), con diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina y ácido giberélico. Los mejores resultados para la inducción de brotes se obtuvieron con 5 mg/l de 6-bencilaminopurina y 0,01 mg/l de ácido giberélico.

## **3.2. Generalidades**

### **3.2.1. El cultivo de zapallo**

#### **3.2.1.1. Historia y distribución geográfica**

El zapallo integra la gran familia de las cucurbitáceas y es una de las más numerosas, representada aproximadamente por 120 géneros y 800 especies. Estas son muy sensibles en condiciones de frío. Son nativos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo y varias de ellas desarrollan extensas ramas con zarcillos con el fin de adaptarse a la competencia por la luz (Nayar & More 1998, citados por Gaspera & Rodríguez 2014).

El género *Cucurbita* es actualmente estrictamente de origen americano, pues todos sus miembros crecen espontáneamente o fueron domesticados en América. Formado por 20 - 27 especies, destinados para

alimentación, no solo en Latinoamérica, sino también en otras regiones del mundo. Los frutos y semillas de todas estas especies, son las más empleadas con este fin. Las especies domesticadas, en los países de habla hispana a menudo se les llama "calabazas", "zapallos" o con diferentes nombres en lenguas indígenas, mientras que en los países anglosajones se les conoce como "squashes", "pumpkins" o "gourds" (Lira, 2009).

Se han domesticado cinco especies para el uso de los frutos: *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma* con plantas anuales y *C. ficifolia* con plantas permanentes. Debido al carácter fibroso de la pulpa, estas últimas sólo se utilizan para preparar caramelos con propiedades especiales, que confieren a estos productos de confitería una excelente consistencia y un sabor suave (Whitaker & Davis, 1962; citado por Gaspera & Rodríguez, 2013).

Aunque las especies de *Cucurbita* cultivadas tienen lugares de origen tanto en el Viejo y el Nuevo Mundo, este género solo tendría dos lugares de origen en el Nuevo Mundo: México para *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. argyrosperma* y probablemente *C. ficifolia*. Los otros centros de origen estarían en el sur de Perú, Bolivia y el norte de Argentina y corresponden a *C. máxima*. En excavaciones se encontraron restos de *C. moschata* y *C. argyrosperma* que datan del año 5000 a. C. Estas especies

se distribuyeron en el norte y sureste de los Estados Unidos y el sur de América Central; *C. moschata* fue trasladada tempranamente hacia el sur y Sudamérica, y alrededor de los 3000 a. C. fue introducida en el Perú (Esquinas- Alcazar, 1983).

#### **3.2.1.2. Ubicación sistemática:**

De manera esquemática la clasificación puede resumirse de esta forma:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitaceae

Género: Cucurbita

Especie: sp.

Nombre Científico: Cucurbita sp.

Nombre Común: Zapallo planta

#### **3.2.1.3. Descripción botánica**

- a) Raíz:** La raíz primaria alcanza una profundidad mayor a dos metros. Las raíces laterales y sus ramas se dispersan horizontalmente en el

suelo hasta una profundidad máxima de 60 cm (Gracia, Guerra & Cajar; 2003).

- b) Tallo:** Presenta tallos postrados y trepadores provistos de zarcillos (León, 1987). Alcanza una longitud de siete metros o más (Gracia, Guerra y Cajar; 2003).

Tienen la tendencia a desarrollar raíces adventicias en los nudos (Whitaker & Davis, 1962; citado por Gaspera & Rodríguez, 2013).

- c) Hojas:** Las hojas son grandes, cordiformes, pecioladas con tres o más lóbulos triangulares poco profundos, en el caso del zapallo de planta presenta cinco pequeños lóbulos de forma triangular (Ramos, 2007).

Los pecíolos son largos, cilíndricos y están cubiertos de pelos glandulares (Formaris, 2012).

- d) Flores:** El zapallo es una planta monoica, con flores masculinas y femeninas grandes (Gracia et al., 2003).

En el zapallo de planta la flor masculina no tiene apertura floral, presenta estambres deformados y no producen polen viable (Ramos, 2007).

Las flores aparecen solitarias o en grupos en las axilas de las hojas opuestas a los zarcillos (León, 1987).

- e) **Fruto:** El fruto característico se denomina pepo o pepónide, baya grande de paredes externas que se endurecen y las internas se mantienen suaves y carnosas. La morfología del fruto es muy variable (León, 1987).

El zapallo de planta presenta diversas formas (ovaladas, oval-alargadas, periforme), presentándose un promedio de 16 frutos por planta con un peso promedio por fruto de 1,75 kg. (Ramos, 2007).

- f) **Semilla:** Las semillas del zapallo son ovaladas, planas y delgadas con un borde irregular, en algunos casos muy ancho, recortado o fibroso. (Formaris, 2012), y de cotiledones muy desarrollados ricas en proteínas y aceites (León, 1987).

En el caso del zapallo de planta, las semillas se encuentran vacías por dentro (Ramos, 2007).

#### **3.2.1.4. Diversidad de la especie**

El género *Cucurbita* está constituido entre otras por cuatro especies que se cultivan para la obtención de zapallo maduro, y se describen a continuación:

**A. Cucurbita pepo:**

Según evidencia arqueológica, *Cucurbita pepo* L. fue una de las primeras especies domesticadas en las Américas. La distribución de estos restos, junto con otro tipo de evidencias (morfológicas, moleculares, etc.) sugieren que la variedad de este cultivo se pudo originar de dos eventos diferentes de domesticación a partir de poblaciones silvestres originalmente relacionadas y que hoy coexisten geográficamente separadas (Lira ,2005).

**B. Cucurbita máxima:**

Según Lira (1995), esta es una especie que fue domesticada en América del sur, se cultiva en sitios ubicados dentro de un amplio intervalo altitudinal, desde los 100 msnm hasta cerca de los 300 msnm. Es una de las especies cultivadas más diversas del género. Su variación incluye numerosas razas o variedades locales y abundantes cultivares comerciales, tanto comestibles y ornamentales, las variedades cultivadas de *C. máxima* poseen hábitos rastreros y subarbustivos, cuyos frutos y semillas son de dimensiones, formas y coloraciones, en algunos casos, únicos. Muchas variedades han demostrado poseer diferentes niveles de resistencia a varias enfermedades virales. También presentan aspectos de interés agronómico como la duración del ciclo de vida, productividad y en

algunos casos su capacidad de adaptación a condiciones ecológicas limitantes (Citado por Pacheco, 2005).

### **C. Cucurbita moschata:**

*Cucurbita moschata*, es una especie muy variada y de importancia, cuyo antecesor silvestre es un misterio. Este cultivo fue introducido muy temprano al mundo antiguo. Se encuentra en las ilustraciones de hierbas europeas de los siglos XVI y XVII, y se ha descrito a partir de materiales cultivados en Europa. Actualmente se cultiva prácticamente en todo el continente americano y en varios países del antiguo mundo, curiosamente, se han desarrollado algunas variedades agronómicas de mucha importancia. (Lira, 2005).

### **D. Cucurbita argyrosperma:**

Es apreciado en muchas partes de México y Centroamérica, donde se le conoce como pipián. A diferencia de lo que sucede con el resto de las especies de *Cucurbita* cultivadas, la información sobre la propagación fuera del continente americano es limitado. Los únicos datos que se tiene sobre su existencia en el Viejo Mundo son puramente botánicos, ya que entraron en el conocimiento científico en la segunda mitad del siglo pasado en un catálogo de semillas publicado en Alemania; muy recientemente se ha registrado su cultivo en China (Lira, 1995).

Gaspara y Rodríguez (2013), registran las distintas características botánicas de las especies cultivadas del género Cucurbita.








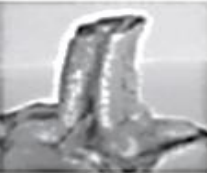


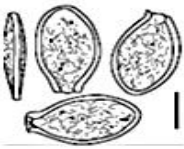

	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Cucurbita argyrosperma</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
<b>Hoja</b>	Lóbulos foliares muy diferenciados. Al igual que las hojas los tallos presentan pelos punzantes.	Lóbulos foliares redondeados, poco marcados. Tallos cilíndricos, poco ásperos, con muchos pelos.	Lóbulos foliares diferenciados. Hojas con manchas pequeñas angulares.	Lóbulos foliares poco marcados, lóbulo apical en punta. Las manchas blancuecinas en la unión de las nervaduras de las láminas se deben a la presencia, debajo de la epidermis, de una delgada capa de aire.
				
<b>Fruto</b>	Pedúnculo duro con ángulos y surcos bien marcados. Inserción del pedúnculo no expandida.	Pedúnculo esponjoso y cilíndrico. Inserción del pedúnculo no expandida.	Pedúnculo duro y cilíndrico, con diámetro muy ensanchado por corcho duro. Inserción del pedúnculo no expandida.	Pedúnculo duro poco estriado. Inserción del pedúnculo muy expandida.
				
<b>Semillas</b>	Color blanquecino-amarillento. Marginadas. Apice truncado recto.	Color blanquecino. Marginadas. Apice truncado en bisel o inclinado.	Color blanquecino. Marginadas. Margen más oscuro que el centro. Con estrias o surcos irregulares en la superficie. Apice truncado recto.	Color castaño-pardo. Marginada. En vista lateral presentan un lado convexo y otro ligeramente comprimido. Apice truncado.
				

Figura 1. Caracteres botánicos diferenciales de las principales especies cultivadas del género Cucurbita.

Fuente: Gaspara, P. & Rodríguez, R. (2013). El género Cucurbita. En Manual de Cultivo del Zapallo Anquito (*Cucurbita moschata* Duch.). INTA.

### **3.2.2. El Cultivo de tejidos vegetales**

Puede definirse como un conjunto de técnicas que sirven para tener un control relativo sobre los procesos morfológicos, genéticos, fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar en los tejidos estudiados (Ábdelnour & Vincent, 1994).

El cultivo de tejidos implica aislar una parte de la planta, llamada explante, y brindarle artificialmente en un laboratorio, las condiciones fisicoquímicas que se requieren y ante todo de procedimientos de limpieza para mantenerlos libres de microorganismos contaminantes (Rojas et al., 2004).

Según Caro et al., (2004), el cultivo de plantas "in vitro" implica el uso de una porción muy pequeña de la planta (planta madre) llamada explante, que se coloca asépticamente en un recipiente, que lleva un medio nutritivo semisólido o líquido para que las células de la planta se desarrollen y generen tejidos vegetales específicos o regeneren plantas enteras bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura (Citado por Delgado, 2012).

El cultivo in vitro de especies vegetales presenta dos procesos morfogénicos muy frecuentes, tales como la embriogénesis somática y la organogénesis. La embriogénesis somática es el proceso de obtención de

estructuras similares a los embriones cigóticos sin fecundación de los gametos, mientras que por organogénesis se pueden obtener tallos, raíces o flores. Si la diferenciación de órganos se da de forma directa, se denomina organogénesis directa y si la diferenciación de órganos se da a partir de callos, se denominará morfogénesis indirecta (Radice, 2010).

La aplicabilidad de la técnica se basa en los principios de totipotencialidad y regulación hormonal, que demuestran con más fundamento los modelos biológicos de morfogénesis in vitro (Rojas et al., 2004).

La totipotencialidad de una célula vegetal se refiere a que la célula de una planta contiene la información genética y la suficiente capacidad de regenerar toda una planta, si las condiciones que se brindan son las adecuadas. Con esta forma de propagación se puede obtener una mayor cantidad de plantas con un solo explante en un tiempo relativamente corto y de buenas condiciones (Caro et al., 2004 citado por Delgado, 2012).

Con respecto a la regulación hormonal se puede mencionar que, las hormonas pueden actuar individualmente o en conjunto y pueden regular diversos sucesos fisiológicos, pero la clave es el equilibrio entre ellas, algunas son muy importantes en estos sucesos, pero necesitan de otras hormonas para ser más eficaces, de este hecho proviene el término

“bioactividad” hormonal, que señala la capacidad que tiene la hormona para regular un suceso fisiológico favorablemente (Días, 2017).

Factores que intervienen en la micropropagación según Abdelnour & Escalante, (1994).

**El explante:** “Es el órgano, tejido, células, etc., extraído de la planta madre para dar inicio al cultivo *in vitro*” (Abdelnour & Escalant, 1994). Es el factor principal en el resultado obtenido; el tamaño del explante, su tipo y la fuente de tejido del que proviene, al igual que su edad fisiológica, influyen decisivamente en el éxito del cultivo *in vitro* (Suárez, 1993).

#### **3.2.2.1. Factores físicos**

- **pH:** El pH del medio de cultivo es primordial y es especial para cada tipo de planta, al igual que ocurre en el suelo, por lo que se debe ajustar a los requerimientos de la especie en estudio (Abdelnour & Escalant, 1994).
- **La humedad:** La humedad dentro de los recipientes en condiciones *in vitro* es casi 100%. Debido a esto la planta *in vitro* generalmente no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutículas, etc. (Abdelnour & Escalante, 1994).

- **La luz:** En condiciones estándar *in vitro*, la calidad y la intensidad de la luz es baja ya que llega hasta los 10 w/m<sup>2</sup>, porque en condiciones de luz natural puede alcanzar hasta los 900w/m<sup>2</sup>. Aquí se dan dos fenómenos muy importantes que dependen de la luz, la fotosíntesis y la fotomorfogénesis. (Abdelnour & Escalant, 1994).

#### 3.2.2.2. Factores químicos

- **Medio de cultivo:** Son muchos los medios de cultivo que se han utilizado, con mayores o menores variaciones en los parámetros indicados; el más popular es el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (Murashige & Skoog, 1982; citado por Suárez, 1993).

Un medio de cultivo generalmente se compone de:

**Sales inorgánicas:** Son las encargadas de darle el soporte nutricional a las plántulas como los macronutrientes y micronutrientes.

Entre los principales elementos esenciales que mayormente requieren todas las plantas en los medios de cultivo, tenemos: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Azufre, Calcio, Magnesio y Hierro. Además, necesitan de otros elementos, pero en cantidades muy pequeñas, entre ellos tenemos:

Boro, Molibdeno, Manganeso, Cobalto, Zinc, Cobre, Cloro y Iodo. (Abdelnour, & Vincent, 1994).

**Compuestos orgánicos:** Dentro de esta categoría se tienen sustancias como carbohidratos, hormonas, vitaminas y varios compuestos que favorecen el cultivo de tejidos vegetales como los aminoácidos, amidas, purinas y pirimidinas y ácidos orgánicos (Abdelnour, & Vincent, 1994).

**Carbohidratos:** Son sustancias de origen orgánico similares al azúcar que aportan tres de los principales elementos indispensables como el Hidrógeno, Carbono y Oxígeno (Abdelnour, & Vincent, 1994).

**Vitaminas:** La tiamina es una de las vitaminas que ha demostrado ser consistentemente importante en el cultivo de tejidos vegetales (Roca & Mroginski, 1991).

**Aminoácidos:** Entre los aminoácidos y amidas que comúnmente se ha demostrado que son más beneficiosos en el cultivo de tejidos vegetales se encuentran la L-arginina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina (Abdelnour, & Vincent, 1994).

**Agente gelificante:** El agar es uno de los compuestos más utilizados el caso de los medios semisólidos, es utilizado entre el 0,6 y 1% (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2010).

**Hormonas:** Entre las hormonas más importantes se tienen a las auxinas y citoquininas. Que participan en el crecimiento, la división celular, la formación de brotes, raíces y la germinación de semillas (Abdelnour, & Vincent, 1994).

**Citoquininas:** Son hormonas que promueven la división de las células, regularizan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales (Muñoz de Malajovich, 2012).

Dentro de las citoquininas más usadas se tiene a la 6-bencilaminopurina, que tiene un efecto directo en el proceso de formación de brotes. Se sintetizan fundamentalmente en las raíces y se transportan hasta el tallo mediante los haces vasculares. Induce el crecimiento de los brotes laterales, la proliferación celular en el meristema apical y el agrandamiento de las hojas. Dado que el explante no presenta raíces, carece de la capacidad de sintetizar 6-bencilaminopurina, por lo que su adición es fundamental (Hoyos J., Perea C. & Velasco R., 2018).

Locy (1984), refiere que las proporciones altas de citoquininas en relación con la auxina, tiende a promover la formación y crecimiento de brotes (citado por Suarez 1993).

Raven *et al.*, (1992), menciona que los ápices de brotes en crecimiento de los cultivos tisulares se exponen a una concentración de citoquinina lo suficientemente elevada como para mantener el crecimiento de los brotes, pero también para estimular el desarrollo de yemas laterales en las axilas de las hojas.

Otros compuestos orgánicos que normalmente se emplean en el cultivo de tejidos vegetales son: el inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ácido ascórbico (Abdelnour, & Vincent, 1994).

### **3.2.3. Control preventivo de la contaminación microbiana**

Uno de los principales requisitos para lograr el éxito en el cultivo de tejidos vegetales es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes.

Según Roca & Mroginski, (1991), a continuación, se describen las principales fuentes de donde proceden los microorganismos contaminantes.

- **Los tejidos:** Estos pueden contener contaminantes en su superficie o en su interior, o en ambos. Los cuales se pueden eliminar mediante la desinfección usando fungistáticos o bacteriostáticos (Roca & Mroginski, 1991).

Para mantener los tejidos libres de microorganismos contaminantes se tienen diferentes agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio.

El hipoclorito de sodio se presenta en una solución al 5,25 %. Para realizar desinfecciones, las diluciones son entre 0,1 y 1 %, mientras que soluciones concentradas son corrosivas para la piel, metales y otros materiales (Sanchez, 2005).

Roca & Mroginski (1991), refieren que las soluciones de hipoclorito de sodio, en concentraciones que van del 1 al 3 %, son las soluciones más útiles como germicidas y agentes oxidantes.

Las ventajas de esta solución sobre otros desinfectantes incluyen la baja toxicidad, la facilidad de manejo y el costo relativamente bajo. (Sánchez, 2005).

- **El área de trabajo:** Entre los contaminantes más comunes que se encuentran se pueden mencionar a las bacterias y esporas de hongos que viven en el medio ambiente. El uso de una cabina de

flujo laminar permite mantener la esterilidad durante el trabajo (Roca & Mroginski, 1991).

- **Los instrumentos:** El instrumental de trabajo se debe ser esterilizado antes y después de su uso. Se deben esterilizar flameándolos cuidadosamente con alcohol etílico al 96 % durante 2 o 3 minutos (Roca & Mroginski, 1991).
- **El exterior de los recipientes de cultivo:** Es posible que en el tiempo que ha transcurrido entre la esterilización del recipiente con el medio de cultivo y el momento en que se utiliza, ciertos contaminantes se asienten en su exterior; por lo tanto, la boca de cada recipiente debe ser flameado antes y después de implantar el explante (Roca & Mroginski, 1991).
- **El investigador:** Los investigadores son la principal fuente de contaminación. Por ello, el uso de guardapolvos, guantes y la protección del cabello con gorros desechables, la boca y la nariz con mascarilla reducen considerablemente la contaminación (Roca & Mroginski, 1991).

#### **3.2.4. La micropropagación**

Según (Rojas, García & Alarcón, 2004), indican que la micropropagación es la multiplicación masiva de un explante con la capacidad de diferenciarse en condiciones muy favorables generando nuevos individuos similares al parental. Su objetivo principal es multiplicar eficientemente individuos cuyo fenotipo sea fiel al fenotipo del progenitor. (García et al.1998).

La micropropagación es una técnica que rápidamente alcanzó la aprobación en la industria y se está realizando en hortalizas, en árboles y especies ornamentales (Ábdelnour & Vincent, 1994).

La micropropagación de nudos se basa en el principio en el cual un nudo de una plántula in vitro, puesto en un medio de cultivo adecuado, estimula el crecimiento de brotes axilares y produce nuevas plántulas. Este tipo de propagación promueve el desarrollo de estructuras morfológicas preexistentes. El estado nutricional y hormonal del medio de cultivo rompe el estado latente de la yema axilar y promueve su crecimiento (Lizarraga et al., 1992; citado por Toledo et al., 1998).

Una vez establecido el protocolo de micropropagación, se presentan ventajas importantes frente a los métodos tradicionales, tales como:

- Aumento rápido del número de plantas por cada especie.
- Corto tiempo de propagación.
- Producción constante de material vegetal.
- Capacidad para propagar un gran número de plantas en una superficie reducida.
- Mejor control sobre la sanidad del material vegetal multiplicado.
- Mayor facilidad para transportar el material vegetal.
- Posibilidad de propagar con mayor celeridad una especie del cual se posea poco material vegetal (Rojas *et al.*, 2004).

El proceso de micropropagación vegetal tiene diversas etapas (Werbroug & Debergh, 1994; citado por Simón & Moysset, 2006) en las que se crean protocolos de trabajo “*in vitro*” y “*ex vitro*”, dependiendo de la especie que se quiere multiplicar (Delgado, 2012).

### **Etapas 0: Preparativa**

Donde se selecciona el material vegetal del cual se extraerá el explante, el cual debe ser cuidadosamente cultivado para obtener plantas

sanas y en un estado fisiológico adecuado para la propagación *in vitro* (Werbroug & Debergh, 1994, citado por Simón & Moysset, 2006).

### **Etapa 1: Introducción o de establecimiento**

Es la primera etapa del cultivo durante la cual se induce el desarrollo de los meristemas por medio del empleo de citoquininas (García *et al.*, 1998). En ella se da el inicio del establecimiento del cultivo *in vitro*, seleccionando el material vegetal, desinfectándolo y cultivándolo asépticamente en un medio de cultivo iniciador, en condiciones ambientales controladas para obtener un cultivo viable (Werbroug & Debergh, 1994; citado por Simón & Moysset, 2006).

### **Etapa 2: Multiplicación**

Una vez que el explante se ha adaptado, libre de cualquier tipo de contaminación endógena o exógena, se transfiere a otro medio de cultivo, suplementado con hormonas cuyo equilibrio generalmente favorece a las citoquininas que son hormonas importantes en el proceso de diferenciación (Rojas, 2004). En esta etapa se aprovecha el rol de las citoquininas como factor de crecimiento de los brotes y de su antagonismo a la auxina en lo que respecta al control de la dominancia apical (Raven, Evert & Eichhorn, 1992).

### **Etapa 3: Enraizamiento**

Se permite que los explantes propagados crezcan, formen hojas durante un periodo que depende de la especie y luego se cambian a uno nuevo en el que el cambio del equilibrio hormonal favorece a las auxinas, con la finalidad de inducir el desarrollo de las raíces. Al final de esta etapa deberá quedar formada completamente la vitroplanta (Rojas, 2004).

### **Etapa 4: Aclimatación**

Consiste en la adaptación de las plantitas a un ambiente *ex vitro* de condiciones ambientales (Werbroug & Debergh, 1994; citado por Simón & Moysset, 2006).

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Tipo de investigación**

El trabajo de investigación fue de tipo experimental.

#### **4.2. Ubicación del experimento**

Se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Escuela Profesional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, sito en el fundo “Los Pichones Sur”, entre los meses de marzo a diciembre de 2017.

#### **4.3. Material experimental**

El material experimental fue el siguiente:

Explantes nodales de zapallo de planta, de aproximadamente 1,5 cm de longitud, que fueron recolectados por la zona del fundo Santa Rosa – Miculla - Distrito de Pachía, concentraciones de lejía Clorox y niveles de 6-bencilaminopurina.

La investigación se realizó en 2 etapas.

#### **4.4. Tratamientos en estudio**

**Etapas 1:** Fueron 4 concentraciones de lejía Clorox.

t<sub>1</sub> : 10 %

t<sub>2</sub> : 20 %

t<sub>3</sub> : 40 %

t<sub>4</sub> : 60 %

**Etapas 2:** Fueron 4 niveles de 6-bencilaminopurina.

t<sub>1</sub> : 1 mg/l

t<sub>2</sub> : 2 mg/l

t<sub>3</sub> : 4 mg/l

t<sub>4</sub> : 8 mg/l

#### **4.5. Variables de respuesta**

**Etapas 1:** Las variables que se registraron fueron las siguientes:

#### **4.5.1. Número de explantes no contaminados por hongos**

Se evaluó el número de explantes no contaminados por hongos mediante observación visual de la ausencia de micelio, a los 5 y 15 días después de la implantación al medio de cultivo. Calificándose con 1 a explantes no contaminados y 0 a explantes contaminados.

#### **4.5.2. Número de explantes no contaminados por bacterias**

Se evaluó el número de explantes no contaminados por bacterias mediante observación visual de la ausencia de exudados de coloración amarillenta o rosada en el explante a los 5, 15 y 30 días después de la implantación a medio de cultivo. Calificándose con 1 a explantes no contaminados y 0 a explantes contaminados.

#### **4.5.3. Número de explantes no contaminados por levaduras**

Se evaluó el número de explantes no contaminados por levaduras mediante observación visual de la ausencia de exudados de coloración blanquecina a los 5, 15 y 30 días después de la implantación al medio de cultivo. Calificando con 1 a explantes no contaminados y 0 a explantes contaminados.

#### **4.5.4. Número de explantes viables**

Se evaluó el número de explantes viables por observación visual a los 5, 15 y 30 días después de la implantación al medio de cultivo. Considerando como explante viable a uno de color verde y no viable a uno de color amarillento, crema o marrón. Calificando con 1 a explantes viables y 0 a explantes no viables.

**Etapa 2:** Las variables que se registraron fueron las siguientes:

#### **4.5.5. Altura de brote (cm)**

Se midió la altura estimada del brote con el uso de un vernier, desde la base del tallo hasta el ápice del brote a los 15 y 30 días después de la implantación al medio de cultivo. La evaluación solo se realizó en los explantes que formaron un brote.

#### **4.5.6. Número de nudos por brote**

El número de nudos por brote se evaluó por conteo visual a los 15 y 30 días después de la implantación al medio de cultivo. La evaluación solo se realizó en los explantes que formaron un brote.

#### **4.5.7. Número de explantes brotados**

Se evaluó el número de explantes brotados por observación visual a los 15 y 30 días después de la implantación al medio de cultivo. Calificando con 1 a explantes brotados y 0 a explantes no brotados.

#### **4.6. Diseño experimental**

Para la primera y segunda etapa, el diseño experimental fue completamente aleatorio con cuatro repeticiones.

##### **4.6.1. Análisis estadístico**

El análisis de datos se realizó de la siguiente forma:

**Etapas 1:** Para realizar el análisis de datos de las variables, número de explantes no contaminados, número de explantes viables y número de explantes brotados se obtuvieron las proporciones de cada unidad experimental.

Para el análisis de los datos; se usó el análisis de varianza (ANVA), la prueba estadística fue F con un nivel de significación  $\alpha = 5$  y 1 %, y para estimar la relación entre las variables se realizó el análisis de regresión simple que permitió determinar la función de respuesta con un nivel de significancia del 5%.

**Etapa 2:** Antes de realizar el análisis de los datos para la variable número de nudos, se realizó la transformación “raíz cuadrada” de los resultados.

Para analizar los datos; se utilizó el análisis de varianza (ANVA), la prueba estadística utilizada fue F con un nivel de significancia  $\alpha = 5$  y 1%.

#### **4.6.2. Procedimiento experimental**

**Etapa 1:** El procedimiento experimental fue el siguiente:

##### ➤ **Recolección del material vegetal**

Para la recolección del material vegetal, se extrajeron segmentos de brotes del zapallo de planta traídas de campo, tomadas desde el ápice de la planta hasta el 4to nudo, estos explantes fueron colocados en un enfriador (Cooler) y se mantuvieron bajo humedad durante su traslado al laboratorio para evitar su deshidratación.

##### ➤ **Obtención de los explantes**

Para la obtención de explantes nodales se cortaron las hojas y el ápice y se extrajeron los segmentos nodales de aproximadamente 1,5 cm correspondientes al 3er nudo.

➤ **Desinfección de los explantes**

La desinfección se realizó usando la metodología de Pacheco (2005), con algunas modificaciones, la cual es descrita a continuación:

Los explantes nodales fueron lavados con agua corriente y jabón líquido antibacterial durante 5 minutos para luego ser enjuagados. Posteriormente pasaron a la cabina de flujo laminar y fueron tratados con alcohol al 70 % por 30 segundos, seguido de 3 enjuagues con agua destilada estéril; posteriormente se sumergieron en una solución de lejía “Clorox” (hipoclorito de sodio 4,4 %) según los tratamientos (10, 20, 40 y 60 %), más unas gotas de Tween-20 por un periodo de 10 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril; finalmente fueron implantados en los tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo.

➤ **Condiciones del medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (visto en anexo 1), con 2 mg/l de 6-bencilaminopurina, complementado con 30 g/l de sacarosa y 0,1g/l de myo-inositol. El pH fue ajustado a 5,7 usando hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

Posteriormente se adicionó 3 g/l de Phytigel, y se llevó al horno microondas para su dilución, seguidamente el medio se distribuyó en los

tubos de ensayo y fueron tapados con papel aluminio, para luego ser esterilizados en autoclave a 121 °C de temperatura y 15 lb de presión durante 15 minutos.

➤ **Conservación**

Los tubos de ensayo se trasladaron al cuarto de cultivo, el cual tuvo las siguientes características:

- Temperatura promedio : 24 °C.
- Humedad relativa : 70 %
- Intensidad luminosa : 4 000 lux.
- Fotoperíodo : 16 horas luz, 8 horas oscuras.

**Etapa 2:** El procedimiento experimental fue el siguiente

➤ **Recolección del material vegetal**

La recolección del material vegetal fue similar a la primera etapa.

➤ **Obtención de los explantes**

La obtención de los explantes se realizó igual que la primera etapa.

➤ **Desinfección de los explantes**

Los explantes nodales fueron desinfectados con el mejor resultado determinado en la primera etapa.

➤ **Condiciones del medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962), con los diferentes niveles de 6-Bencilaminopurina (1, 2, 4 y 8 mg/l) según los tratamientos, complementado con 30 g/l de sacarosa y 0,1g/l de mio-inositol. El pH fue ajustado a 5,7 usando hidróxido de sodio y ácido clorhídrico.

➤ **Conservación:** La conservación de los tubos de ensayo tuvieron las mismas condiciones que la primera etapa.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Etapa 1:** Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### 5.1. Número de explantes no contaminados por hongos

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta, a los 15 días de la introducción.

**Tabla 1**

*Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por hongos*

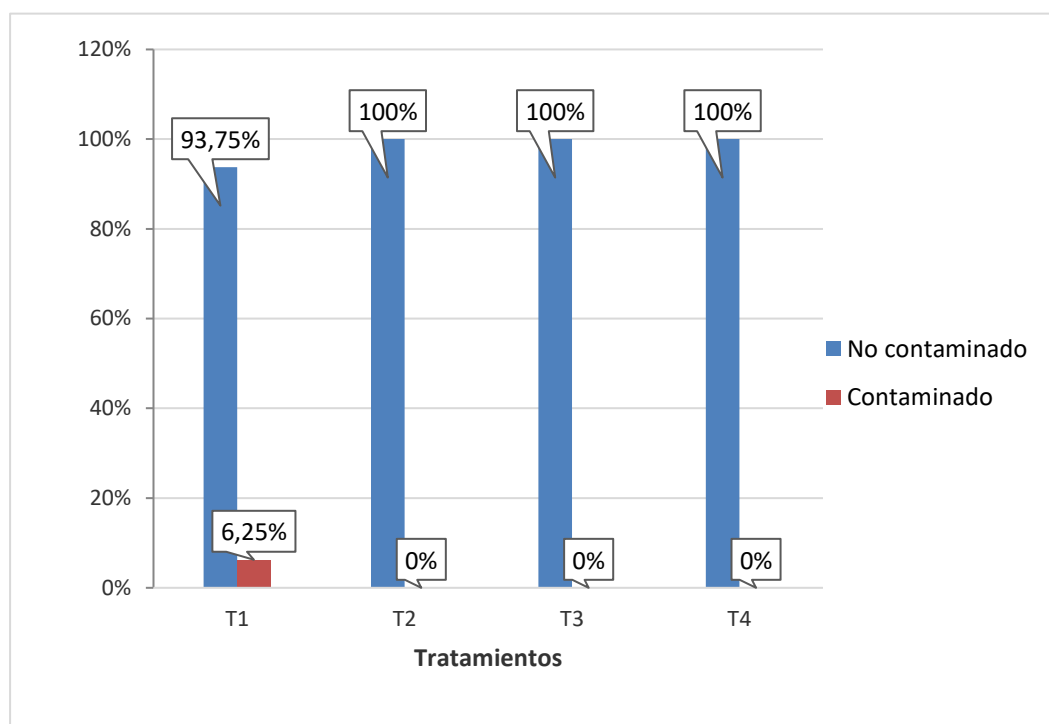
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,011719	0,003906	1,000	N.S.
Error exp.	12	0,046875	0,003906		
Total	15	0,058594			

C.V. = 6,35%

N.S. = No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por hongos en la Tabla 1, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.



*Figura 2.* Porcentaje de contaminación por hongos en explantes nodales del zapallo planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 2, se observan los resultados obtenidos después de tratar los explantes del zapallo de planta con las concentraciones de lejía Clorox, teniendo 6,25 % de contaminación en el T1, que se encuentra por debajo del rango señalado por Niubó, et al. (2002), quienes refieren que la frecuencia de contaminación por hongos en los cultivos in vitro es de 10 a

15 %. Este resultado supera al obtenido por Pacheco (2005), quien controla la contaminación fúngica con una doble desinfección usando 10 % de cloro comercial en material vegetal proveniente de invernadero.

De la misma forma Hine & Abdelnour (2013), controlan la contaminación en explantes de arándano con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % por 40 minutos obteniendo un 75 % explantes sanos, lo que nos indica que el uso de lejía Clorox es eficiente en el proceso de desinfección.

Por su parte Leiffer, *et al.* (1991), indica que los microorganismos fungosos que comúnmente se encuentran en el cultivo de tejidos son los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* y *Fusarium*” (citado por Hernández & González, 2010).

Cabe señalar que la contaminación se hizo presente a los 5 días de haber sido implantado en el medio de cultivo y que el crecimiento se inició desde la zona axilar del explante, lo que nos hace suponer que el agente contaminante es propio del material vegetal y que la contaminación presente pudo deberse a una mala elección del material vegetal al momento de la colecta.

## 5.2. Número de explantes no contaminados por bacterias

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.), a los 30 días de la introducción.

**Tabla 2**

*Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por bacterias*

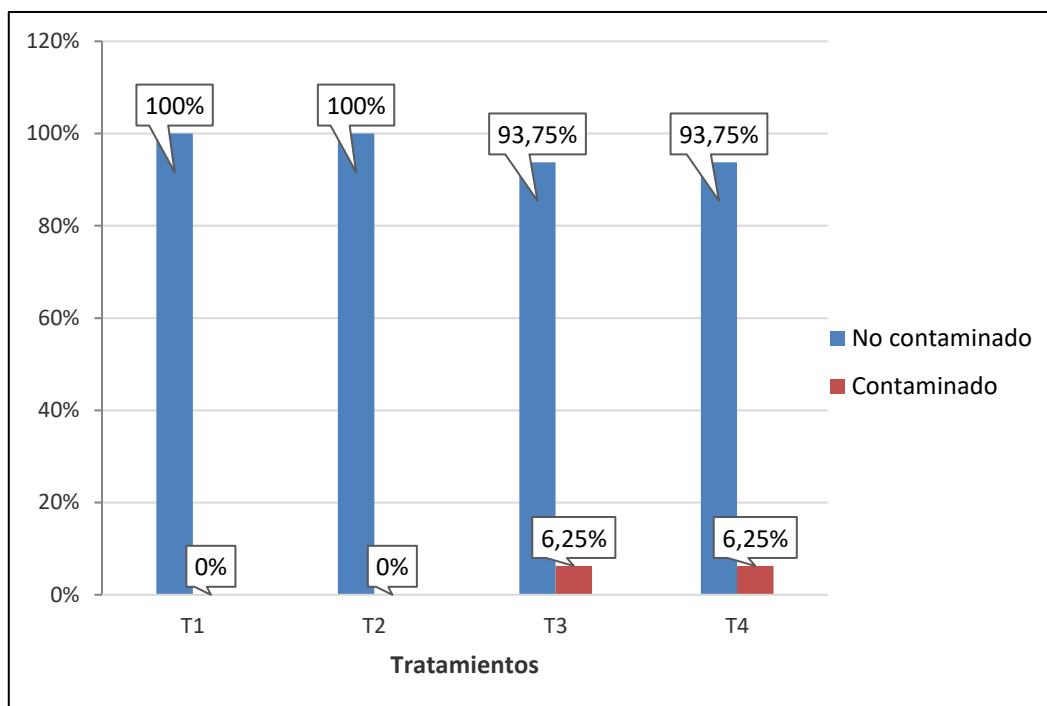
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,015625	0,005208	0,667	N.S.
Error exp.	12	0,093750	0,007813		
Total	15	0,109375			

C.V. = 9,12%

N.S.= No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por bacterias en la Tabla 2, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 3.** Porcentaje de contaminación por bacterias en explantes nodales del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 3, se muestra como resultado un bajo porcentaje de contaminación (6,25 %), el cual se encuentra por debajo de lo citado por Niubó, *et al.* (2002), que indican que la frecuencia de contaminación bacteriana en los cultivos *in vitro* es de 20 a 55 %.

El resultado logrado supera lo hallado por Pacheco (2005), que obtiene 21,2 % de contaminación bacteriana con una doble desinfección y 10 % de cloro comercial a pesar de que el material vegetal provenía de invernadero.

Así mismo se debe mencionar que la presencia de las bacterias se hizo notable a los 10 días de la implantación al medio de cultivo y a lo largo de las evaluaciones, observando exudados de coloración rosado y amarillento en la base y alrededor del explante.

Con respecto a las bacterias Héctor, *et al.* (2005), observaron la aparición permanente de colonias de bacterias en explantes de menta japonesa, de coloración amarillento-rosado en un 92 % de los casos, y mencionan que al ser aisladas se determinó que pertenecían al género *Streptobacillus* y *Enterobacter*.

Además, Leiffer (2001), revela que los microorganismos contaminantes más difíciles de detectar son las bacterias ya que pueden ser sistémicas (citado por Niubó *et al.*, 2002).

Asimismo, Mroginski *et al.* (2010), señalan que en algunos casos los microorganismos contaminantes no matan los cultivos, pero pugnan con el explante por los nutrientes que contiene el medio o bien lo transforman.

### **5.3. Número de explantes no contaminados por levaduras**

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.) a los 30 días de la introducción.

**Tabla 3**

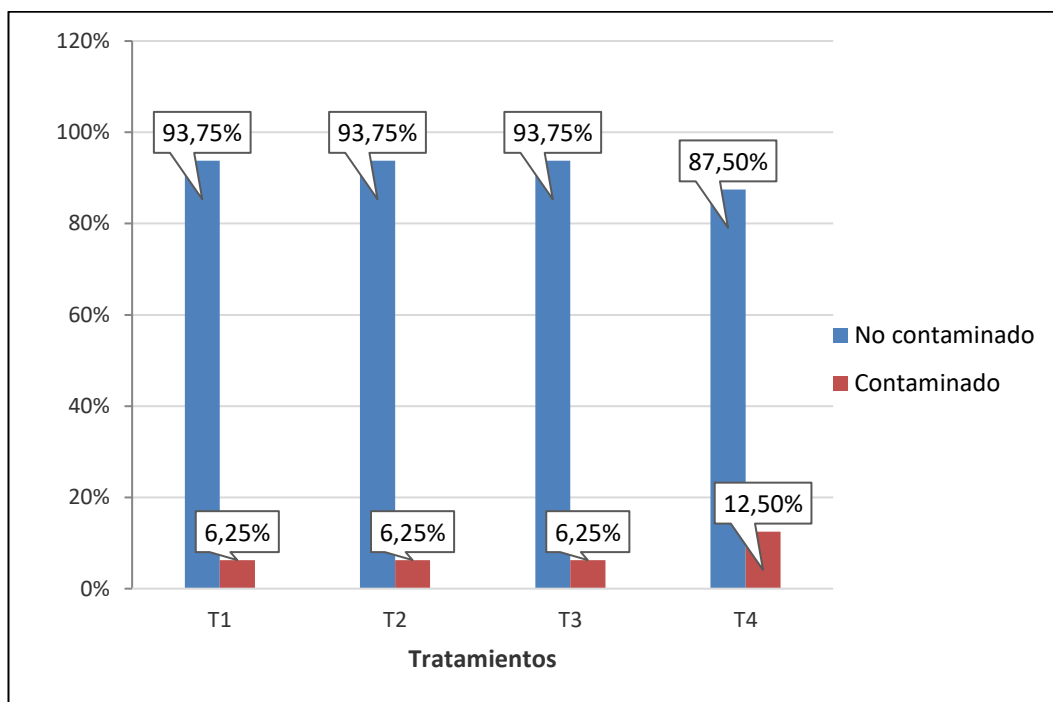
*Análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por levaduras*

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,011719	0,003906	0,231	N.S.
Error exp.	12	0,203125	0,016927		
Total	15	0,214844			

C.V. = 14,11%      N.S. = No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de explantes no contaminados por levaduras en la Tabla 3, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Indicando que la respuesta pudo estar condicionada a la elección del material vegetal utilizado el cual proviene directamente del campo.



*Figura 4.* Porcentaje de contaminación por levaduras en explantes nodales del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 4, se tiene como resultado un porcentaje de contaminación de 6,25 y 12,5 %, dicho resultado se encuentra dentro del rango señalado por Niubó, *et al.* (2002), que indica que la frecuencia de contaminación por levaduras en el cultivo *in vitro* es de 10 a 35 %.

Hernández *et al.* (2005), refieren que la incidencia de contaminación con levaduras en vitroplantas de malanga fue de 10,5 %, demostrando el carácter endógeno de los microorganismos contaminantes. De ahí radica

la importancia del proceso de desinfección para la eliminación de estos microorganismos.

Asimismo, la presencia de la levadura se hizo visible a los 5 días de la implantación al medio de cultivo, en la base del explante o alrededor de él, solas o en combinación con las bacterias. También se debe mencionar que las levaduras se hicieron notables a lo largo del proceso de cultivo, y aun estado sometidas a concentraciones que causaron daño en el tejido de los explantes.

Con respecto a esto Alvarado (1998), menciona que los métodos de desinfección que se utilizan no siempre eliminan los microorganismos que se asocian a los tejidos de las plantas, varios de ellos son capaces de mantenerse en latencia dentro de las células, en los espacios entre las células o en sus haces conductores y permanecen protegidos de los agentes químicos. Es así, que se introducen en el cultivo de tejidos, se propaga con el material vegetal y pasan desapercibidos en el medio de cultivo durante largos periodos de tiempo.

#### **5.4. Número de explantes viables**

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.), a los 30 días de la introducción.

**Tabla 4***Análisis de varianza para la variable número de explantes viables*

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	2,921875	0,973958	187,000	**
Error exp.	12	0,062500	0,005208		
Total	15	2,984375			

C.V. = 12,15%

\*\* = Altamente significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de explantes viables en la Tabla 4, revela que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Para continuar con el análisis de los datos, se realizó el análisis de regresión lineal, este análisis de varianza se presenta en la Tabla 5, donde se observa:

**Tabla 5**

*Análisis de varianza de regresión para la variable número de explantes viables*

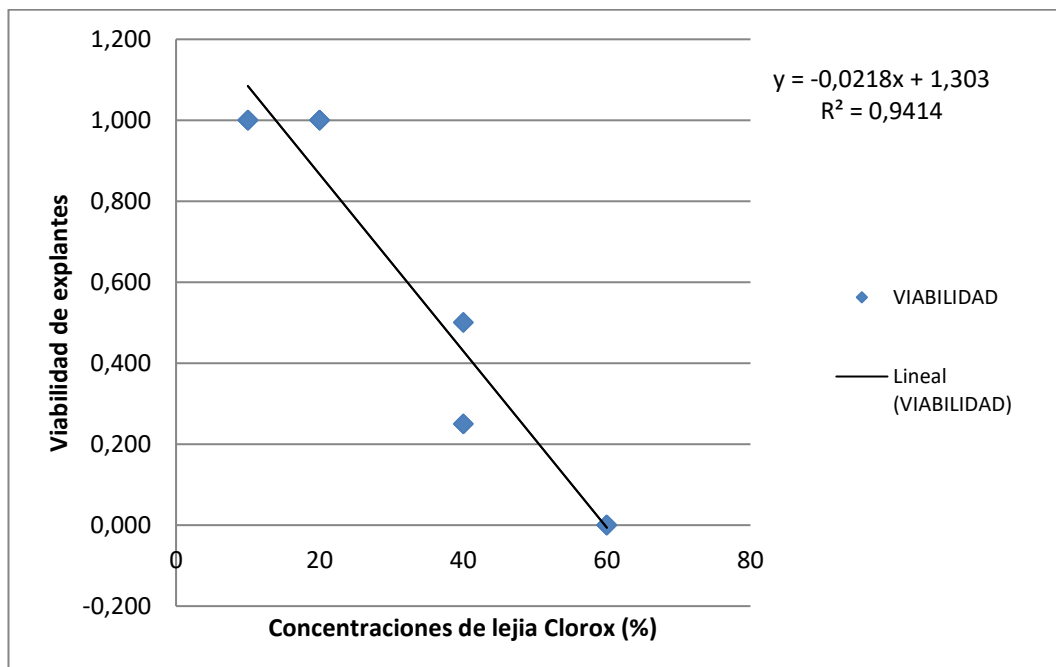
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>Fc</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Regresión	1	2,809587	2,809587	225,039	**
Residuos	14	0,174788	0,012485		
Total	15	2,984375			

\*\* = Altamente significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza de regresión para la variable número de explantes viables, en la Tabla 5, resulta altamente significativo indicando que existe una relación lineal entre las concentraciones de lejía Clorox y el número de explantes viables.

Este resultado se corrobora con la función lineal en la Figura 5.



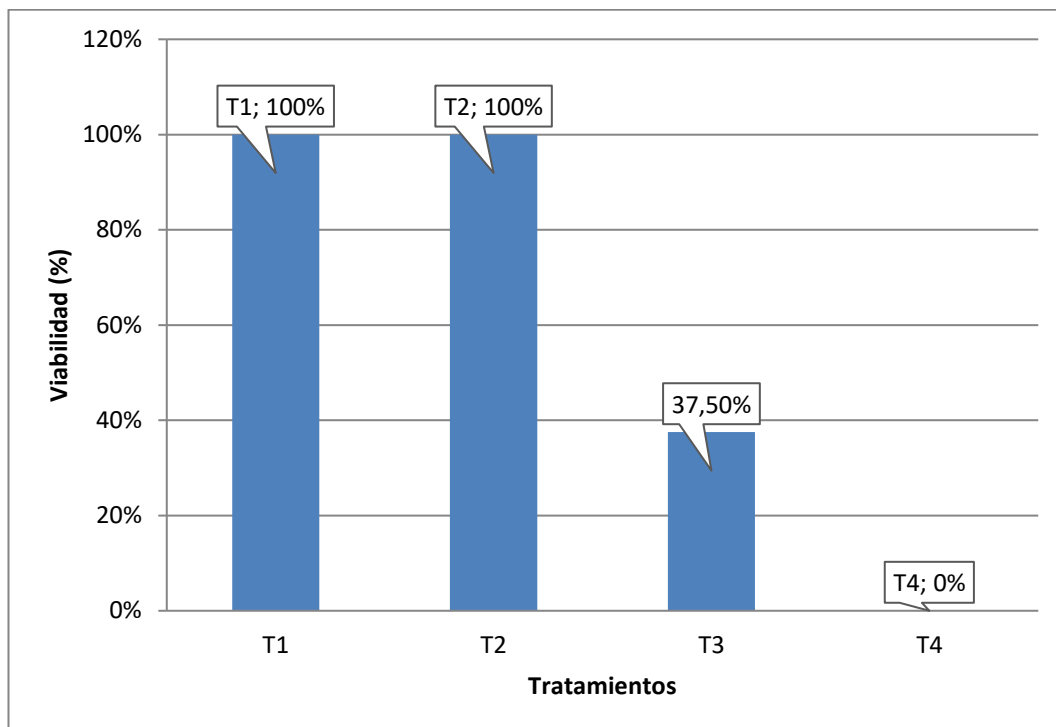
*Figura 5.* Función lineal de la viabilidad de explantes con las concentraciones de lejía Clorox

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 5, se observa la función lineal de respuesta de la viabilidad de los explantes nodales, siendo altamente significativa en el análisis de varianza (Tabla 07), lo que conduce a establecer el siguiente modelo de primer orden:

$$Y = -0,0218x + 1,303$$

Esta función de respuesta indica, que al aumentar 1% de la concentración de lejía Clorox la viabilidad del explante se reduce en 0,0218.



*Figura 6.* Porcentaje del número de explantes viables del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 6, se puede observar la reducción del porcentaje de viabilidad en los explantes nodales del zapallo de planta al aumentar la concentración de lejía Clorox.

Esta reducción se debió al daño causado por el efecto fitotóxico que produce el hipoclorito de sodio sobre los segmentos nodales del zapallo de planta; el cual se observa en los tratamientos con concentraciones de 40 y 60 % de lejía Clorox. Dicho daño se evidenció durante el proceso de desinfección haciéndose más visible con el pasar del tiempo.

Este resultado supera al logrado por Pacheco (2005), que alcanza un 97 % de explantes viables con una doble desinfección usando 10 % de cloro comercial.

Por su parte Sánchez & Salaverría (2004), lograron una mayor sobrevivencia con el uso de cloro comercial al 20 % durante 20 minutos y refieren que concentraciones altas o tiempos de inmersión prolongados causaron la muerte en el tejido de los explantes de fresa.

De la misma forma Borges et al. (2009), señalan que a medida que se aumenta la concentración y el tiempo de inmersión, disminuye el porcentaje de contaminación, pero se incrementa el porcentaje de necrosis o muerte de los explantes.

También se debe acotar que el daño causado a los explantes del zapallo de planta debido a las altas concentraciones de lejía Clorox limitaron el desarrollo normal de los brotes e impidieron la generación de estos.

**Etapa 2:** Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

### 5.5. Altura de brote (cm)

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.) a los 30 días de la introducción.

**Tabla 6**

*Análisis de varianza para la variable altura de brote (cm)*

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,663138	0,221046	0,648	N.S.
Error exp.	12	4,092344	0,341029		
Total	15	4,755482			

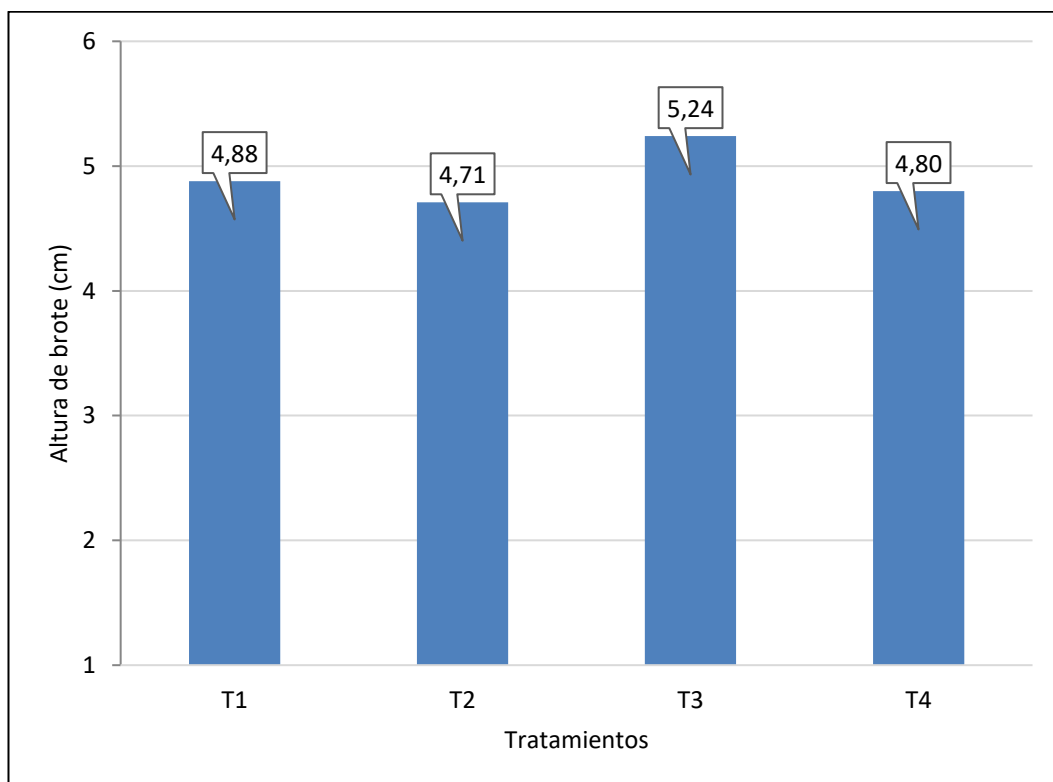
C.V. = 11,90%

N.S.= No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la altura de brote en la Tabla 7, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Esto se debe a que los niveles de 6-bencilaminopurina que van de 1 a 8 mg/l causaron el mismo efecto en los explantes nodales.



*Figura 7.* Altura de brote en explantes nodales del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 7, se observan los resultados obtenidos después de exponer los explantes del zapallo de planta a los niveles de 6-bencilaminopurina, confirmando así que los niveles en estudio logran inducir la formación de brotes.

Haque, M.E., *et al.* (2008), obtienen 5,8 cm de longitud de brote en explantes nodales de zapallo con 2 mg/l de BAP, asimismo Mahzabin, F., S Parvez S. y Alam, M.F. (2008), logran  $6,1 \pm 0,85$  y  $5,8 \pm 0,22$  cm en explantes

nodales de 2 cultivares de zapallo con 3 mg/l de BAP, pudiendo afirmar que se obtuvieron buenos resultados en el cultivo *in vitro* del zapallo de planta.

George (2008), menciona que el cultivo *in vitro* de explantes requiere de la adición de citoquininas para la inducción de la brotación en yemas axilares, reafirmando así que la adición de citoquininas es esencial para la formación de brotes.

También se debe mencionar que el inicio de la brotación se dio a los 3 días de la implantación al medio de cultivo y que al finalizar las evaluaciones la altura del brote fue muy variada en todos los tratamientos, obteniendo 1,30 cm como la más baja y 10,10 cm como la más alta.

Radice (2010), señala que los procesos morfogénicos que determinan la respuesta en condiciones *in vitro* dependen del genotipo, del explante que se selecciona, el tratamiento que se da a la planta madre, el estado físico y fisiológico en que se encuentra y el lugar del cual se toma el explante. Esto pudo haber influenciado en la altura del brote ya que los explantes fueron tomadas de diferentes zonas de la planta y de varias plantas madre.

## 5.6. Número de nudos por brote

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.), a los 30 días de la introducción.

**Tabla 7**

*Análisis de varianza para la variable número de nudos por brote*

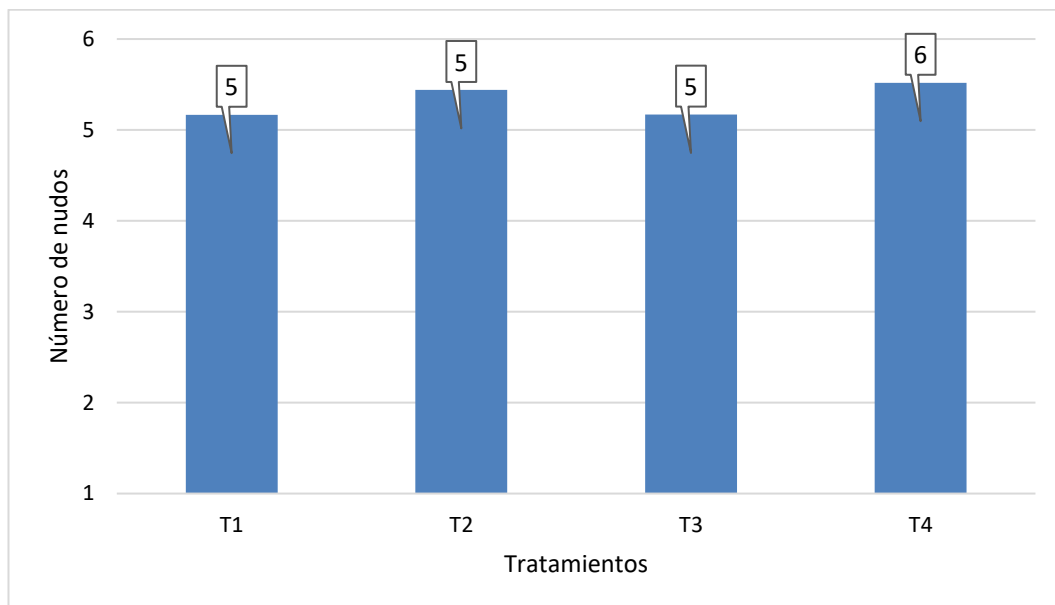
<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,014395	0,004798	0,403	N.S.
Error exp.	12	0,142814	0,011901		
Total	15	0,157210			

C.V. = 4,49%      N.S.= No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de nudos por brote en la Tabla 8, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Este resultado sugiere que los tratamientos en estudio lograron similares efectos en los explantes nodales del zapallo de planta.



*Figura 8.* Número de nudos por brote en explantes nodales del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 8, se observa el promedio del número de nudos por brote logrado con los niveles de 6-bencilaminopurina, los cuales muestran una mínima diferencia entre ellos. Además, según las evaluaciones se observaron variaciones con respecto al número de nudos en los tratamientos, teniendo 2 como el menor y 9 como el mayor, estos resultados en gran parte fueron proporcionales a la altura de los brotes.

Pacheco (2005), obtiene 5 nudos por brote en promedio al usar 0,25 mg/l de ácido giberélico ( $AG_3$ ) y 2 mg/l de pantotenato de calcio en la introducción de diferentes ecotipos de cucurbitas, pudiendo mencionar que

se obtuvieron resultados similares, teniendo en cuenta que solo se hace uso de la 6-bencilaminopurina.

La variación en el número de nudos, pudo estar influenciados por el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico, factores que deben ser considerados (Abdelnour, & Vincent, 1994), ya que determinan los procesos morfogénicos (Radice, 2010) de los explantes.

### 5.7. Número de explantes brotados

Evaluación de los explantes nodales del zapallo de planta (*Cucurbita* sp.) a los 30 días de la introducción.

**Tabla 8**

*Análisis de varianza para la variable número de explantes brotados*

<b>F de V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig.</b>
Tratamientos	3	0,046875	0,015625	1,000	N.S.
Error exp.	12	0,187500	0,015625		
Total	15	0,234375			

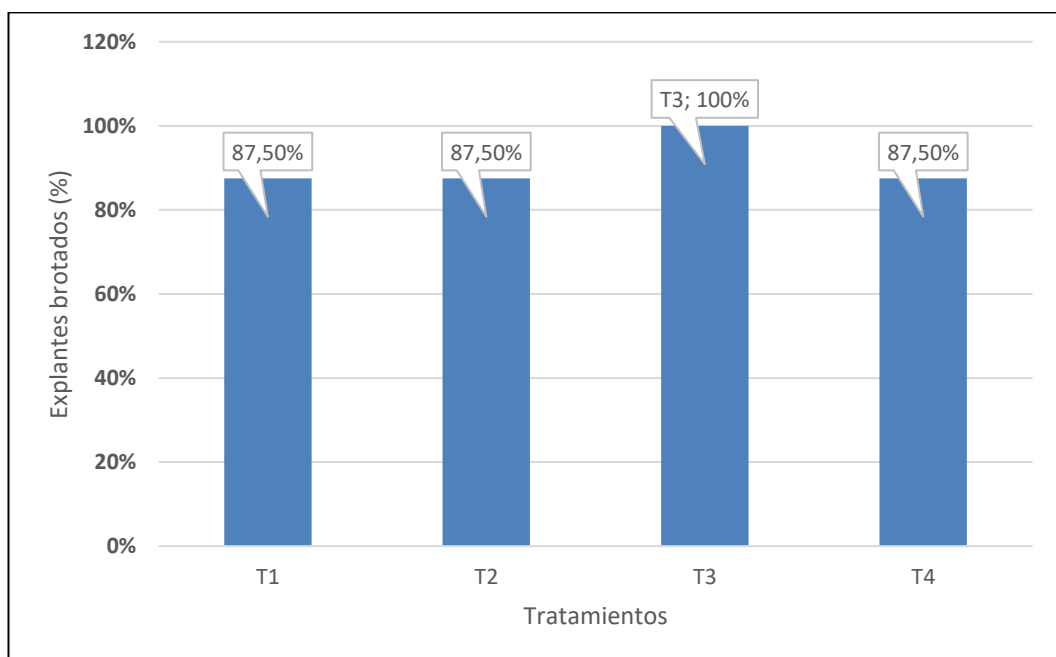
C.V. = 13,79%

N.S. = No Significativo

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza para la variable número de explantes brotados en la Tabla 9, revela que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Esto nos demuestra que los niveles de 6-bencilaminopurina inducen el mismo efecto en los explantes, no habiendo diferencias considerables entre ellas.



*Figura 9.* Porcentaje de explantes brotados del zapallo de planta

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 9, se observan los porcentajes obtenidos después de tratar a los explantes del zapallo de planta con los niveles de 6-bencilaminopurina. Los cuales no muestran grandes diferencias entre ellas.

Haque, M.E., *et al.* (2008), en su investigación alcanza 85 % de explantes de zapallo brotados con 2 mg/l de BAP, igualmente Mahzabin, F., S Parvez S. y Alam, M.F. (2008), logran la inducción de brotes múltiples en un 90,45 y 85,75 % en explantes de 2 cultivares de zapallo con 3 mg/l de BAP, siendo los resultados obtenidos en la presente investigación favorables con respecto al cultivo in vitro del zapallo de planta.

El porcentaje de explantes nodales no brotados pudo deberse a factores propios del explante, con respecto a esto Abdelnour, & Vincent (1994), mencionan que la elección de un explante adecuado es el primer paso para el establecimiento in vitro, y que generalmente, factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar.

De la misma forma Radice (2010), señala que los procesos morfogénicos están determinados por el genotipo, por el explante seleccionado, el tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas y el sector del cual se tome el explante. Tales condiciones pudieron influir en el proceso morfogénico de los explantes nodales, ya que estos fueron tomados de distintas plantas madre y de diferentes sectores. Lo que pudo causar que algunos explantes no hayan brotado.

## **CONCLUSIONES**

1. Se logró el establecimiento aséptico de los explantes nodales del zapallo de planta, determinándose que concentraciones de 10 y 20% de lejía Clorox logran el 100% de explantes viables, pero no se pudo precisar su concentración adecuada.
2. Se logró la inducción de brotes en los explantes nodales del zapallo de planta con los niveles de 6-bencilaminopurina, mas no se pudo determinar su nivel adecuado.

## RECOMENDACIONES

1. Utilizar de 10 y 20 % de lejía Clorox para obtener el 100% de explantes viables.
2. Seleccionar brotes de temporada, para reducir la contaminación por hongos, bacterias y levaduras en los explantes nodales del zapallo de planta.
3. Utilizar otro método de calificación con respecto a las variables de la primera etapa, de esta forma determinar la concentración adecuada de lejía Clorox.
4. Realizar otro proyecto de investigación ampliando el rango de exploración con relación a los niveles de 6-bencilaminopurina, para determinar el nivel adecuado.
5. Realizar proyectos de investigación relacionados a las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación para concluir con el protocolo del cultivo *in vitro* de esta especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelnour, A. & Vincent, J. (1994). *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetal*. CATIE. 16 p.
- Alam, M.F. *et al.*, (2015). *Regeneration of Shoot from Nodal explants of Cucumis sativus considering different Hormonal concentration*. International Research Journal of Biological Sciences. Vol. 4(7), pp.48-52.
- Alvarado, Y. (1998). *Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 31, No. 2, 2000.
- Astorquizaga, R. (2009). Cultivo de zapallo (Cucurbita sp) en el Noroeste de Chubut. Agricultura .15.
- Atarés, A. (2007). El cultivo in vitro de plantas: ventajas y aplicaciones. Grupo de Cultivo in vitro y Mejora Vegetal I.B.M.C.P. - Universidad Politécnica de Valencia.
- De Gracia, N., *et al.* (2003). *Guía para el Manejo Integrado del Cultivo de Zapallo*. Panamá. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá - IDIAP: 114 p.

- Delgado, C. (2012). *Un Modelo Pedagógico para la Enseñanza de la Producción Biotecnológica de Material Vegetal*. Tesis (Magister). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Bogotá.
- Delgado, G., *et al.* (2014). "Caracterización de Frutos y Semillas de Algunas Cucurbitáceas en el Norte del Perú". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz. Lambayeque, Perú. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 37 (1): 7 - 20, 2014.
- Díaz, M. D. (2017). *Las Hormonas Vegetales en las Plantas*. Serie Nutrición Vegetal Núm. 88. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p.
- Escandón, A.S., *et al.* (2003). "Combinación de Técnicas In vitro y Ex vitro para la Micropropagación de Santa Rita (hibr.) una Arbustiva de Relevancia Ornamental". INTA, Argentina. ISSN 0325 – 8718. *RIA*, 32 (1): pp. 111-122.
- Esquinas - Alcazar, J. T. & Gulick P.J. (1983). *Genetic Resources of Cucurbitaceae*. International Board for Plant Genetic Resources (I.B.P.G.R.). Roma, Italia. 101 p.
- Formaris, G. (2012). *Conjunto Tecnológico para la Producción de Calabaza*. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de

Mayagüez Colegio de Ciencias Agrícolas, Estación Experimental Agrícola P-155.

Héctor, E. *et al.* (2005). Un método para la desinfección y el establecimiento in vitro de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). Cultivos Tropicales, vol. 26, núm. 1, 2005, pp. 69-71

Hernández, R. *et al.* (2018). Detección de microorganismos contaminantes del cultivo in vitro de la malanga. [En línea]: [https://www.researchgate.net/publication/266014473\\_Deteccion\\_de\\_microorganismos\\_contaminantes\\_del\\_cultivo\\_in\\_vitro\\_de\\_la\\_malanga](https://www.researchgate.net/publication/266014473_Deteccion_de_microorganismos_contaminantes_del_cultivo_in_vitro_de_la_malanga).

Hernández, Y. & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. Cultivos Tropicales, vol. 31, núm. 4, 2010, pp. 58-69.

Hoyos J., Perea C. & Velasco R. (2018). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmonds*). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol 6 - No. 2.

García, M., *et al.* (1998). *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa. México. Pág. 69-81.

García, M., *et al.* (2013). Caracterización nutricional de frutos de zapallo anquito. En Della Gaspera (ed.) *Manual de Cultivo del Zapallo Anquito (Cucurbita moschata duch.)* pp. 340. INTA, Mendoza.

Gaspera, P. & Rodríguez, R. (2013). El género *Curcubita*. En *Manual de Cultivo del Zapallo Anquito (Cucurbita moschata duch.)*, P. Della Gaspera (Ed.), pp. 9-24. INTA, Mendoza.

George, E., Hall, M.A. & De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. 3 ed. Springer. pp. 2-3, 205-219.

Haque, M.E., *et al.* (2010). "In vitro regeneration of pumpkin (*Cucurbita maxima*) through shoot apical meristem". Department of Genetic Engineering and Biotechnology, University of Rajshahi, Rajshahi 6205, Bangladesh. ISSN 1023-8654. pp 104-17.

Haque, M.E., *et al.* (2008). "In vitro propagation of pumpkin and ash gourd through nodal segments". Department of Genetic Engineering & Biotechnology, University of Rajshahi, Bangladesh. pp. 67-71.

Héctor, E. *et al.* (2005). Un método para la desinfección y el establecimiento in vitro de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.) Cultivos Tropicales, vol. 26, núm. 1, 2005, pp. 69-71

Hine, A. & Abdelnour, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Tecnología en Marcha. Vol. 26, Nº 4. Pág 64-71.

León, J. (1987). *Botánica de los Cultivos Tropicales*. San José de Costa Rica, IICA. Pág. 381.

Lira, R. (S.A.). Calabazas de México. Instituto de biología UNAM.

Lira, R. (2009). *Proyecto Recopilación y análisis de la información existente de las especies de los géneros Cucurbita y Sechium que crecen y/o se cultivan en México*. (Informe). Universidad Nacional Autónoma de México.

Mahzabin, F., *et al.* (2008). "Micropropagation of *Cucurbita maxima* duch. through shoot tip culture". Biotechnology and Microbiology Laboratory. Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh. ISSN 1023-8654. pp 51-65.

Muñoz de Malajovich, M. (2012). *Bioteconología*. 2a ed., actualizada. Universidad Nacional de Quilmes Editorial. Bernal, Buenos Aires.

- Mroginski, L., Sansberro, P. & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). pp.17-25.
- Niubó, E. *et al.* (2002). Metodología para la obtención in vitro de plantas y tejidos de la caña de azúcar libres de contaminantes exófitos y endófitos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 35, No. 3, 2004.
- Pacheco, V. (2005). *Determinación de una Metodología de Desinfección y un Medio de Cultivo para la Introducción y Micropropagación in vitro de Once Ecotipos de Cucúrbitas y Cuatro de Pasifloras*. Tesis de Grado Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.
- Parvin, S., *et al.* (2013). "In vitro propagation of muskmelon (*Cucumis melo* L.) from nodal segments, shoot tips and cotyledonary nodes". *Rajshahi University journal of life & earth and agricultural sciences*. Vol. 41:71-77.
- Radice, S. (2010). "Morfogénesis" en *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (p. 26) Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. INTA.

- Ramírez, M. & Salazar, E. (1997). "Establecimiento In vitro de Segmentos Nodales de Guayabo (*Psidium guajava* L.)". Rev. Fac. Agrom. (LUZ). 14: pp.497-506.
- Ramos, C. (2007). *Estudio de la Fenología del Zapallo de Planta (Cucurbita sp.) en Condiciones de la Localidad de Calientes Departamento de Tacna*. Tesis presentada para optar el título de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- Raven, P., *et al.* (1992). "Biología de las Plantas". Vol. II. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. p. 482.
- Rincón, A., *et al.* (1999). "Establecimiento aséptico de brotes laterales de *Annona* spp." Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16 Supl. 1: 76-81.
- Roca, W. & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 969 p. (Publicación CIAT no. 151).
- Rojas, S., *et al.* (2004). *Propagación Asexual de Plantas*. Produmedios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, Pronatta. 56p.

Sánchez, M. & Salaverría J. (2004). "Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.)" *Revista Científica UDO Agrícola* Vol. 4, Núm. 1, 2004, pp. 21-26

Sánchez, M., *et al.* (2009). "Multiplicación In vitro vía Organogénesis en Calabaza". *Agronomía Mesoamericana*, vol. 20, núm. 1, pp. 11-22.

Sánchez, L. (2005). Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*, Vol 15: No 2.

Sarowar S., *et al.* (2003). "In vitro Micropropagation of a Cucurbita Interspecific hybrid cultivar – a root stock plant". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. pp 179-182.

Simón, E. & Moysset L. (1996). "Prácticas de Crecimiento y Desarrollo de los Vegetales". Universidad de Barcelona. Departamento de Biología Vegetal. Ediciones Universidad de Barcelona. pág. 65-67.

Stipp, L.C.L. *et al.* (2012). "In vitro Organogenesis of *Zucchini squash* cv. Caserta". *Horticultura Brasileira* 30: 274-278.

Suarez de Castro, F. (1993). *Agricultura, Biotecnología y Propiedad Intelectual*. San José, C.R., IICA. 134p.

Toledo, J., Espinoza, N. & Golmirzaie, A. (1998). Cultivo de Tejidos. Manejo de Plántulas In Vitro en la Producción de Semilla de Papa. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP).

Uribe, M. & Cifuentes, L. (2004). "Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia concinna*". *Bosque* 25 (1): pp.129-135.

## **ANEXOS**

**Anexo 1. Medio Murashige y Skoog utilizado en el proceso de desinfección e introducción de explantes nodales del zapallo de planta**

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>MACRONUTRIENTES</b>	<b>ORIGINAL (mg)</b>	<b>500 ML (g)</b>
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub>	1,65 1,90	16,5 19,0
<b>B</b>	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,44	4,40
<b>C</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> P	0,37 0,17	3,70 1,70
<b>D</b>	EDTA FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0373 0,0278	0,373 0,278
<b>SOLUCIÓN</b>	<b>MICRONUTRIENTES</b>	<b>ORIGINAL (mg)</b>	<b>500 ML (g)</b>
<b>F</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O KI Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,20 16,8 8,6 0,38 0,25	0,62 1,68 0,86 0,082 0,025
<b>SOLUCIÓN</b>	<b>VITAMINAS</b>	<b>ORIGINAL (mg)</b>	<b>500 ML (g)</b>
<b>E</b>	Tiamina Glicina Ac. Nicotínico Piridoxina	0,1 2,0 0,5 0,5	0,05 1,00 0,25 0,25

**Anexo 2. Evaluación del número de explantes no contaminados por hongos, a los 15 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Anexo 3. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por hongos para el análisis de varianza**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	1	1	1	1
II	1	1	1	1
III	0,75	1	1	1
IV	1	1	1	1

**Anexo 4. Evaluación del número de explantes no contaminados por bacterias, a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1

**Anexo 5. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por bacterias para el análisis de varianza**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	1	1	0,75	1
II	1	1	1	0,75
III	1	1	1	1
IV	1	1	1	1

**Anexo 6. Evaluación del número de explantes no contaminados por levaduras, a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1

**Anexo 7. Datos proporcionales del número de explantes no contaminados por levaduras para el análisis de varianza**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	1	1	0,75	1
II	0,75	1	1	0,75
III	1	1	1	0,75
IV	1	0,75	1	1

**Anexo 8. Evaluación del número de explantes viables, a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0

**Anexo 9. Datos proporcionales del número de explantes viables para el análisis de varianza**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	1	1	1	1
II	1	1	1	1
III	0,75	1	1	1
IV	1	1	1	1

**Anexo 10. Evaluación de la altura de brote (cm), a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
7,5	4,6	4	1,3	5,1	2,3	6,2	4,4	4,8	7,7	7,9	4,2	6	2,4	5	5,9
5	0	0	4,8	2,9	0	3,4	4,6	7,2	1,9	4	6,3	4,2	7,2	4,8	0
3,9	2,8	5,6	7,2	0	4,3	2,7	3,1	5,8	5,5	6,4	2,2	0	6,6	6,2	4,4
4,8	7,3	4,9	4,7	6,5	6,6	10,1	3,9	4,6	9,3	2,5	3,6	3,4	4	3,2	4,1

**Anexo 11. Datos para el análisis de varianza en la variable altura de brote (cm).**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	5.3	4.83	5.6	4.53
II	4.9	4.4	6.1	5.05
III	4.83	5.6	5.2	4.80
IV	4.5	4.00	4.08	4.80
PROM.	4,88	4,71	5,24	4,80

**Anexo 12. Evaluación del número de nudos por brote, a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
6	8	6	2	6	5	5	6	5	5	7	6	6	3	6	6
4	0	0	5	4	0	5	6	7	2	6	7	6	7	5	0
4	4	6	6	0	6	3	5	6	4	6	4	0	8	7	6
7	6	5	5	6	7	9	5	6	7	3	5	5	4	5	5

**Anexo 13. Datos para el análisis de varianza en la variable número de nudos por brote**

REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	2,38	2,41	2,55	2,48
II	2,53	2,54	2,20	2,41
III	2,48	2,41	2,43	2,49
IV	2,21	2,45	2,44	2,48
PROM.	2,40	2,45	2,40	2,47

**Anexo 14. Evaluación del número de explantes brotados, a los 30 días de la introducción**

T1				T2				T3				T4			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**Anexo 15. Datos proporcionales del número de explantes brotados para el análisis de varianza**

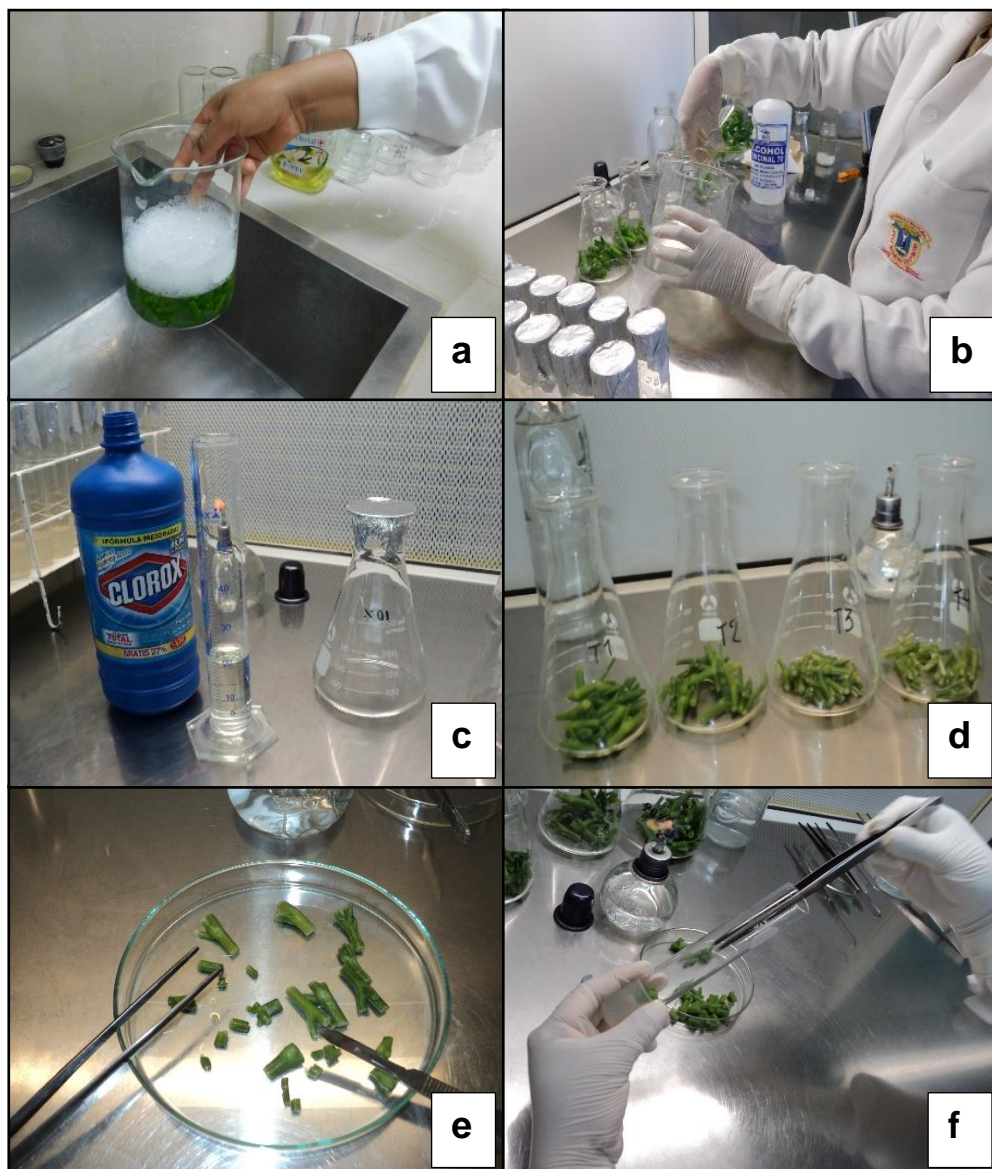
REPETICIÓN	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
I	1	0,75	1	0,75
II	0,75	0,75	1	1
III	0,75	1	1	1
IV	1	1	1	0,75

**Anexo 16. Galería fotográfica de actividades realizadas en el establecimiento in vitro del zapallo de planta**



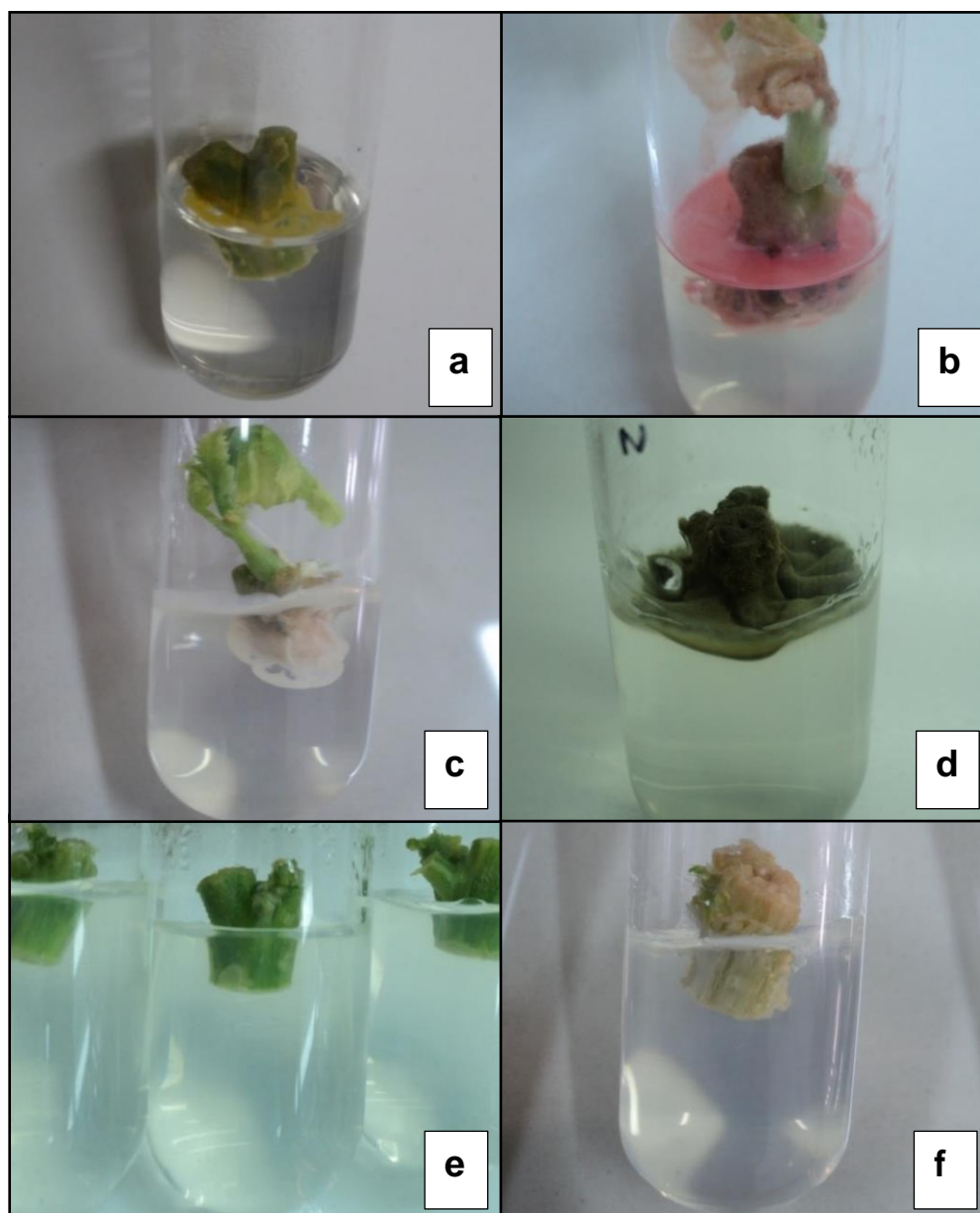
*Figura 1. Colecta de material vegetal en campo (primera etapa).*

a) Plantas madre de zapallo de planta. b) Elección de los brotes en plantas madre del zapallo de planta. c) Brotes seleccionados de zapallo de planta. d) Traslado del material vegetal en Cooler.



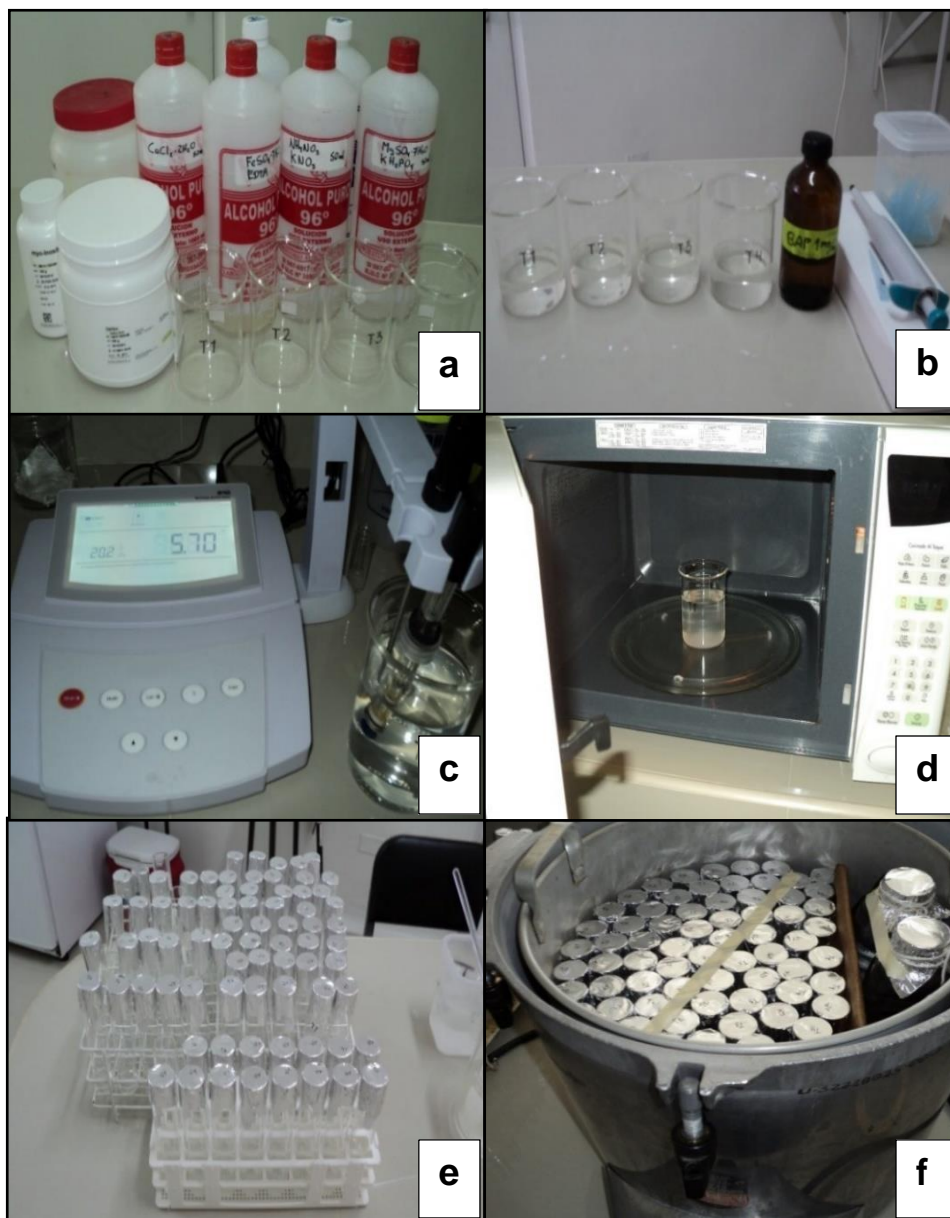
*Figura 2.* Desinfección de explantes del zapallo de planta e implantación en medio de cultivo (primera etapa).

a) Lavado de explantes nodales con jabón líquido. b) Desinfección de explantes con alcohol de 70°. c) Preparación de los tratamientos a base de lejía Clorox. d) Explantes desinfectados con las diferentes concentraciones de lejía Clorox. e) Corte de los extremos en explantes nodales ya desinfectados. f) Implantación de los explantes nodales en el medio de cultivo.



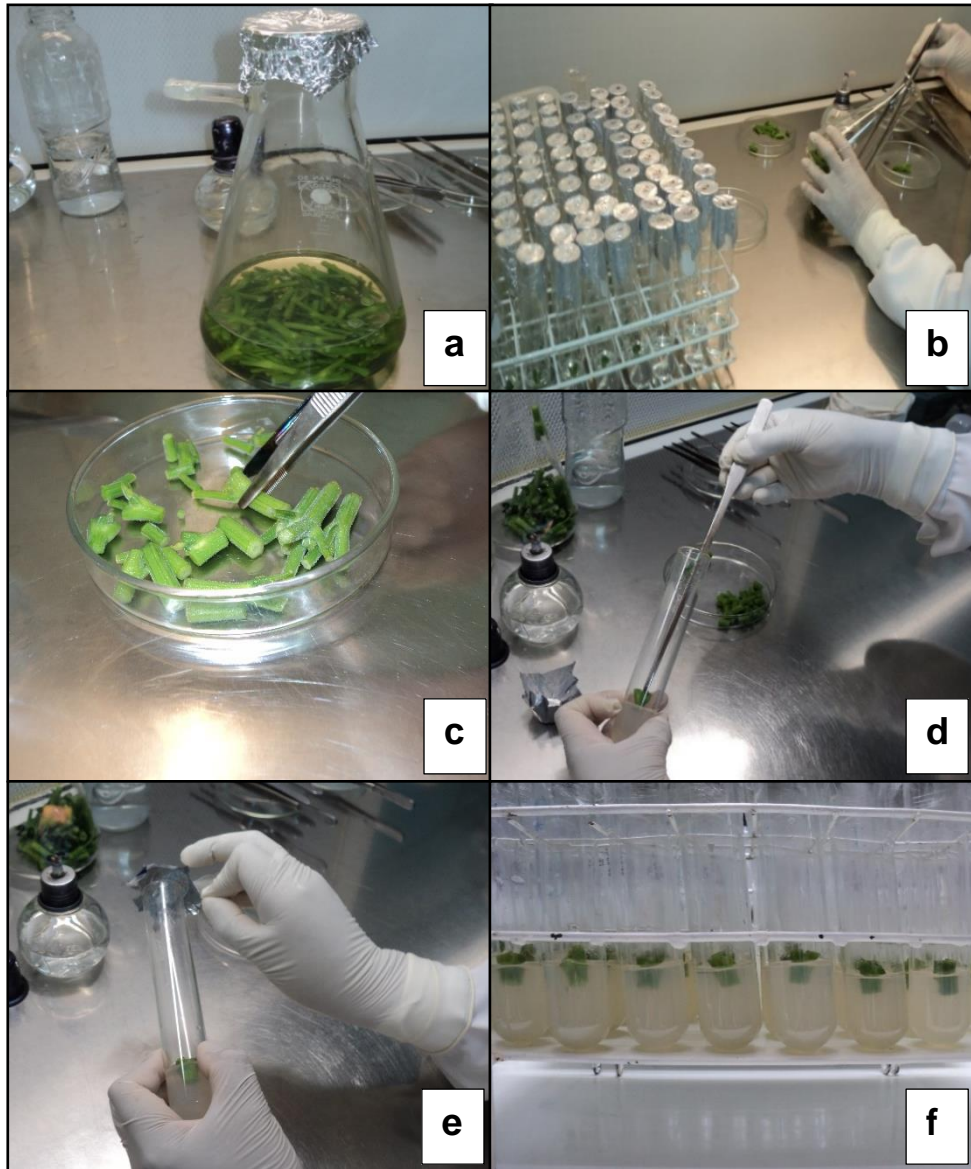
*Figura 3.* Contaminación y viabilidad de explantes nodales de zapallo de planta introducidos *in vitro* (primera etapa).

- a) Explante nodal contaminado con bacteria de coloración amarilla.
- b) Explante nodal contaminando con bacteria de coloración rosada.
- c) Explante nodal contaminando con levadura de coloración blanca.
- d) Explante nodal contaminado con hongo.
- e) Explante nodal viable.
- f) Explante nodal no viable.



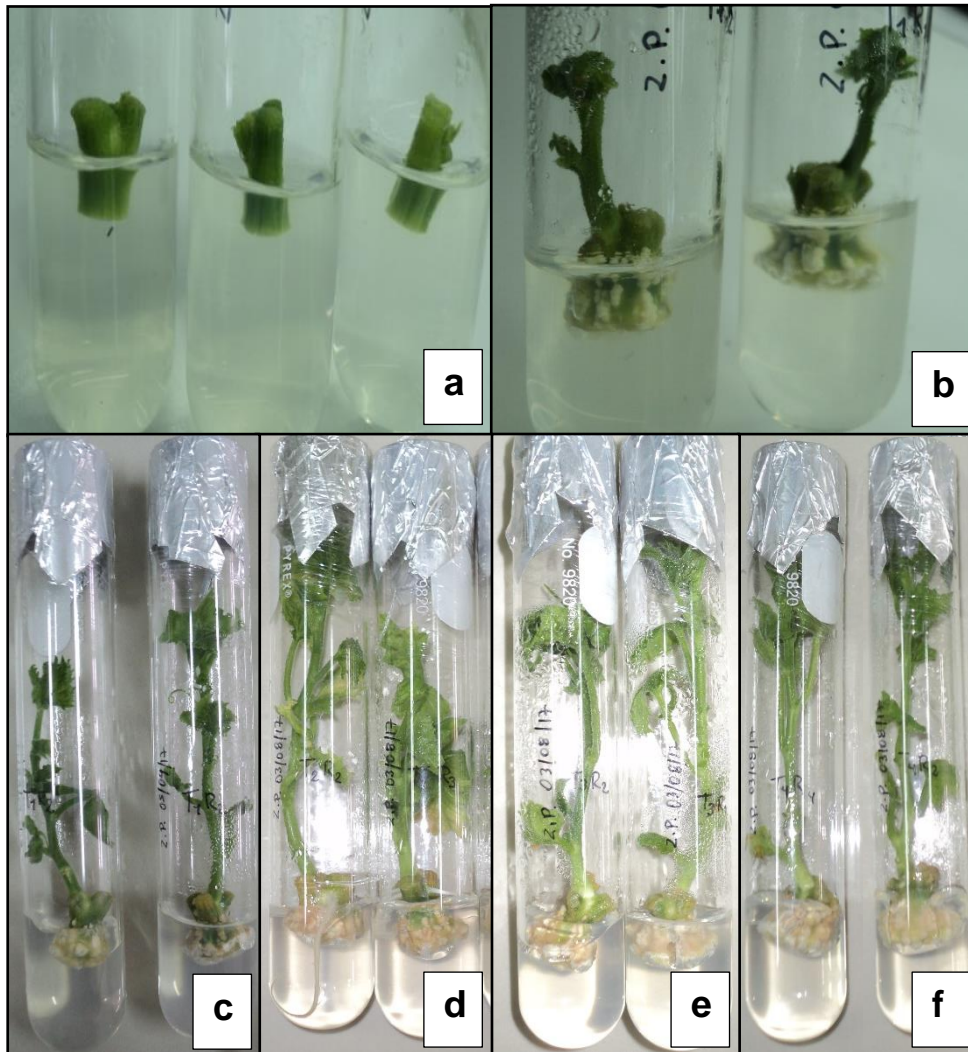
*Figura 4.* Preparación de medio de introducción y esterilización (segunda etapa).

a) Preparación de medio Murashige & Skoog. b) Adición de 6-bencilaminopurina según los tratamientos. c) Medición de pH al medio de cultivo. d) Dilución del agente gelificante (Phytigel). e) Medio dispensado en tubos de ensayo. f) Esterilización de medio y agua destilada.



**Figura 5.** Desinfección y establecimiento *in vitro* de explantes nodales de zapallo planta (segunda etapa).

- a) Desinfección de explantes nodales.
- b) Colocación de explantes nodales en placas Petri.
- c) Corte de los extremos del explante nodal.
- d) Implantación del explante nodal en tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo.
- e) Sellado del tubo de ensayo con papel aluminio y film plástico.
- f) Explantes nodales implantados en el medio de cultivo según los tratamientos.



**Figura 6.** Desarrollo y crecimiento de brotes en explantes nodales de zapallo de planta establecidos *in vitro* (segunda etapa).

a) Explantes nodales a los 5 días de la implantación al medio de cultivo. b) Explantes nodales a los 15 días de la implantación al medio de cultivo. c) Explantes nodales a los 30 días de su implantación al medio de cultivo (T1). c) Explantes nodales a los 30 días de su implantación al medio de cultivo (T2). c) Explantes nodales a los 30 días de su implantación al medio de cultivo (T3). c) Explantes nodales a los 30 días de su implantación al medio de cultivo (T4).