



Universidad Técnica de Ambato
Facultad de Ciencias Agropecuarias



Carrera de Agronomía

**“Efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de
segmentos nodales de *S. betaceum* Cav”.**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO

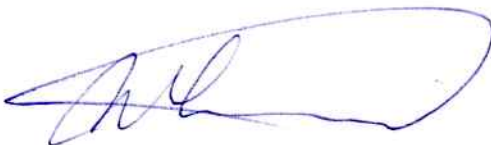
Tutor: Dr. Michel Leiva

Autor: Wilmer Tibanquiza

CEVALLOS, 2025

“Efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum* Cav”.

REVISADO POR



Ing. Michel Leiva Mora, PhD.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

Fecha



Ing. Pedro Pablo Pomboza, PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

12/02/2025



BQF. Isabel Cristina Lopez Villacis, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

12/02/2025



Ing. Jorge Santiago Espinoza Vaca, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

12/02/2025

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Wilmer Ismael Tibanquiza Bastidas**, portador de cédula de ciudadanía número: **1805203088**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “**Efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum* Cav**”; es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....

Tibanquiza Bastidas Wilmer Ismael

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**Efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum* Cav; En el laboratorio de la Biotecnología vegetal de Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato**” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



.....

Tibanquiza Bastidas Wilmer Ismael

DEDICATORIA

La presente investigación de mi tesis está dedicada primeramente a Dios, ya que me ha dado mucha sabiduría gracias al he logrado una meta más en mi vida, quien me dio mucha fortaleza para sobrepasar cualquier obstáculo en mi vida.

A mi madre quien a sido padre y madre en mi vida quiero agradecerle infinitamente por haber confiado en mí, por siempre inculcarme buenos valores y Aser de mi un buen ser humano guiándome siempre por un buen camino ayudándome a cumplir mis metas y siempre a sobresalir en el ciclo de la vida.

A mi hermana Silvia por siempre ayudarme a salir adelante, su sacrificio incondicional ha sido la luz para nunca rendirme, sin su apoyo este logro no hubiese sido posible ya que día a día me motiva a ser mejor y nunca darme por vencido.

A mi familia en especial a mi abuelita, a todos los que me apoyaron ya que de una u otra manera estuvieron ahí en los momentos difíciles nunca me dejaron y siempre me empujaron para hacer una mejor persona y un buen profesional.

AGRADECIMIENTO

A mi madre por siempre confiar en mí y apoyarme en este largo proceso camino a formarme profesionalmente, por siempre brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome, por a ser de mí una mejor persona a través de sus consejos y enseñanzas.

A mi hermana y mi familia en general por su apoyo incondicional y por ser mi roca en cada paso durante mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato facultad de ciencias agropecuarias por haberme formado profesionalmente todos estos años de estudio, A todos mis docentes por inculcarme y compartir sus conocimientos.

Mi sincero agradecimiento al Doctor Michel Leiva Mora, por haber compartido sus conocimientos y ser mi guía al permitirme ser parte de este propósito, le agradezco por su paciencia y orientación en todo este proceso, al poder superar todos los obstáculos y poder lograr el objetivo de obtener resultados científicos.

Estoy muy agradecido con la Ingeniera Vanesa ya que con su carisma y su manera de inculcarnos las ideas fueron las cosas más sencillas ya que nos compartía sus experiencias en el laboratorio y nos servirá para nuestra vida profesional.

Me gustaría agradecer al ingeniero Juan Yáñez ya que sin su esfuerzo no habría sido este proyecto una realidad le agradezco infinitamente por haber formado parte de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN	i
DERECHO DE AUTOR	ii
Capítulo I.....	1
Marco teórico.....	1
1.1 Introducción.	1
1.2. Antecedentes Investigativos.....	2
1.3. Marco teórico	3
1.3.1 Tomate de árbol	3
1.3.2 Taxonomía.....	3
1.3.3. Características morfológicas.	4
1.3.4. Importancia del tomate árbol en ecuador.	4
1.3.5. Propagación del tomate de árbol.	4
1.3.6 Cultivo de tejidos.....	5
1.3.7 Las diferentes fases de la micropropagación.	5
1.3.8. Establecimiento <i>in vitro</i>	6
1.3.9. Desinfectantes.	7
1.3.0. Agua ozonizada	7
1.4. Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general.	9
1.4.2 Objetivos específicos.	9
Capítulo II	9
Metodología.....	9
2.1. Ubicación del experimento.	9
2.2. Características del lugar.....	10
2.3. Equipos y materiales.	10
2.4. Tipo de investigación.....	11
2.5. Factores de estudio.	11
2.6. Tratamientos.....	11
2.7. Diseño experimental.....	13
2.8. Manejo del experimento.	14
2.8.1. Obtención del explante.	14
2.8.2. Preparación de medio de cultivo MS.....	15

2.8.3. Manejo de ensayo en cámara de flujo laminar.	15
2.9. Variables.	16
2.9.1. Variable independiente.....	16
2.9.2. Variable dependiente.....	16
2.9.3. Variables respuesta.	16
CAPITULO III	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
3. Análisis estadísticos y discusión de los resultados.....	17
3.1 Determinación de la influencia de diferentes concentraciones de agua ozonizada (1ppm, 2ppm, 3ppm) sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav.....	17
3.1.1 Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	17
3.1.2 Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	18
3.2 Determinación de diferentes tiempos de exposición del explante a agua ozonizada (5 min, 10 min y 15 min) sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav.....	20
3.2.1 Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	20
3.2.2 Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	20
3.3 Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de <i>S.</i> <i>betaceum</i> sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav. utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	23
3.3.1 Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	23
3.3.2 Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	23
3.4 Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de <i>S.</i> <i>betaceum</i> . Cav sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento <i>in vitro</i> utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	25
3.4.1 Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	25
3.4.2 Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	25
Conclusiones.....	27
Recomendaciones	27
Bibliografía.....	27
Anexos	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía y características morfofisiológicas	3
Tabla 2. Efecto del ozono en el crecimiento de segmentos nodales de ñame para la propagación de plantas in vitro en cuatro semanas de cultivo.	8
Tabla 3. Tratamientos	12
Tabla 4. Influencia de diferentes concentraciones de ozono disuelto en agua (ppm) sobre el porcentaje de contaminación <i>in vitro</i> de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav en el medio de cultivo MS.	17
Tabla 5. Influencia de diferentes concentraciones de ozono disuelto en agua (ppm) sobre el establecimiento in vitro de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> en el medio de cultivo MS.	18
Tabla 6. Influencia de diferentes tiempos de inmersión (5 min, 10 min y 15 min) de agua ozonizada a 3 ppm en comparación con el hipoclorito de sodio al 3% sobre el porcentaje de contaminación en fase de establecimiento in vitro de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i>	20
Tabla 7. Influencia de diferentes tiempos de inmersión (5 min, 10 min y 15 min) de agua ozonizada a 3 ppm en comparación con el hipoclorito de sodio al 3% sobre el porcentaje de establecimiento in vitro de segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav...21	21
Tabla 8. Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de <i>S. betaceum</i> . Cav sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	23
Tabla 9. Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de <i>S. betaceum</i> . Cav. Sobre el porcentaje de establecimiento in vitro utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	24
Tabla 10. Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de <i>S. betaceum</i> . Cav, sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	25
Tabla 11. Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de <i>S. betaceum</i> . Cav sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Ubicación del ensayo Handy GPS-mapa zoom.	9
Ilustración 2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>S. betaceum</i> . Cav bajo la influencia de diferentes concentraciones (a: 1ppm, b: 2ppm, c: 3ppm, de ozono disuelto en agua y dos testigos d: testigo agua desionizada estéril, e: testigo 2 hipoclorito 3%).....	19
Ilustración 3. Explantes de <i>S. betaceum</i> . Cav a: explantes 5 minutos, b: expuestos 10 minutos, c: expuestos 15 minutos, d: testigo hipoclorito al 3% sin tiempo y e: clorosis en sus hojas.....	22
Ilustración 4. Segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav con diferentes longitudes a: 1.5cm hipoclorito 3%, b: 1.5cm agua ozonizada 3ppm y c: 2cm hipoclorito 3%.	24
Ilustración 5. Segmentos nodales de <i>S. betaceum</i> . Cav con diferentes grosores (a: 0,5 cm, b: 0,75 cm y c: 1,00 cm), con hipoclorito al 3%.	26

RESUMEN

El estudio del efecto del agua con ozono sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav, se centra en la evaluación de formas sostenibles y efectivas de mejorar el proceso de propagación en el cultivo de tejidos vegetales. *S. betaceum*. Cav, también conocido como tomate de árbol o tamarillo. El tomate es un cultivo útil y de valor comercial que se puede propagar *in vitro* para obtener plantas genéticamente modificadas y libres de enfermedades y plagas, el agua con ozono, con sus propiedades antimicrobianas y oxidativas, ha demostrado ser una buena herramienta para desinfectar las plantas al reducir el riesgo de microorganismos patógenos sin afectar la supervivencia celular. Este método puede reemplazar los desinfectantes tradicionales como el hipoclorito de sodio, el dióxido cloro, el peróxido de hidrógeno, etc., que tienen muchos efectos fitotóxicos. Sin embargo, su uso en *S. betaceum*. Cav no se ha investigado a fondo. El uso de agua ozonizada en la composición de partes de *S. betaceum*. Cav *in vitro* tiene un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta. El ozono, por sus propiedades antimicrobianas, ayuda a controlar la contaminación microbiana en los medios de cultivo, mejorando así la salud y el bienestar de las plantas. Además, aumenta la absorción de nutrientes, estimula el crecimiento de la raíz y regenera el brote. Sin embargo, se debe determinar la concentración correcta de ozono para evitar efectos tóxicos, logrando así un equilibrio entre los beneficios y la protección de las plantas. El objetivo principal de este método es optimizar las condiciones puras y facilitar la formación exitosa de híbridos proporcionando así una base para una hibridación exitosa de este tipo. El objetivo de esta investigación busca promover la innovación en biotecnología vegetal y el desarrollo de prácticas sostenibles.

Palabras claves: Agua ozonizada, descontaminación, *in vitro*, *S. betaceum*, tamarillo.

ABSTRACT

The study of the effect of ozone water on the *in vitro* establishment of nodal segments of *S. betaceum*. Cav, focuses on the evaluation of sustainable and effective ways to improve the propagation process in plant tissue culture. *S. betaceum*. Cav, also known as tree tomato or tamarillo. Tomato is a useful and commercially valuable crop that can be propagated *in vitro* to obtain genetically modified plants free of diseases and pests. Ozone water, with its antimicrobial and oxidative properties, has proven to be a good tool to disinfect plants by reducing the risk of pathogenic microorganisms without affecting cell survival. This method can replace traditional disinfectants such as sodium hypochlorite, chlorine dioxide, hydrogen peroxide, etc., which have many phytotoxic effects. However, their use on *S. betaceum*. Cav has not been thoroughly investigated. The use of ozonated water in the composition of parts of *S. betaceum*. Cav *in vitro* has a positive effect on plant growth and development. Ozone, because of its antimicrobial properties, helps to control microbial contamination in culture media, thus improving plant health and well-being. In addition, it increases nutrient uptake, stimulates root growth and regenerates the shoot. However, the correct concentration of ozone must be determined to avoid toxic effects, thus achieving a balance between benefits and plant protection. The main objective of this method is to optimize pure conditions and facilitate the successful formation of hybrids thus providing a basis for successful hybridization of this type. The objective of this research is to promote innovation in plant biotechnology and the development of sustainable practices.

Keywords: ozonated water, *in vitro*, decontamination, tamarillo, *S. betaceum*.

Capítulo I

Marco teórico

1.1 Introducción.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales representa una herramienta esencial en la biotecnología agrícola basada en el principio de totipotencia celular, esta técnica se ha consolidado como una alternativa eficaz para la propagación masiva y controlada de especies de interés como *S. betaceum. Cav*, conocido comúnmente como tomate de árbol, permitiendo su reproducción de manera rápida, económica y rentable en cualquier época del año. No obstante, durante este proceso la contaminación de microorganismos supone un reto considerable ya que puede poner en riesgo la viabilidad de los explantes y la eficacia del cultivo (Estévez Fonseca, 2019).

El tomate de árbol *S. betaceum. Cav*, es una especie autóctona de Sudamérica que se cultiva principalmente por sus frutos, en Ecuador el progreso de su cultivo se ve restringido por elementos como la ausencia de diferenciación evidente entre variedades, la baja calidad de los frutos caracterizada por variabilidad y problemas fitosanitarios, la aplicación más resistentes y la sustitución de variedades autóctonas por productos importados (Ramírez et al., 2015).

Tradicionalmente desinfectantes químicos como el hipoclorito de sodio, el cloruro de mercurio y el etanol se han empleado para erradicar contaminantes en las fases iniciales del cultivo debido a sus propiedades antimicrobianas, no obstante, estos pueden perjudicar los tejidos de las plantas provocando oxidación, necrosis o muerte celular lo que complica el éxito del cultivo *in vitro* (Borgues, 2014).

Por lo tanto, en búsqueda de opciones más seguras y eficientes el agua ozonizada se ha presentado como una alternativa con gran potencial. El ozono famoso por su fuerte capacidad oxidante tiene la capacidad de desinfectar de manera eficiente sin dejar restos tóxicos y sin crear resistencia en los microorganismos además que puede aplicarse en concentraciones bajas lo que reduce el impacto negativo sobre los tejidos vegetales así mismo los tratamientos con ozono han resultado amistosos con el ambiente y económicamente factibles (Basail Pérez et al., 2022).

Este estudio se centra en analizar el impacto del agua ozonizada en la formación *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum Cav*, teniendo como objetivo establecer si

esta opción posibilita regular la contaminación sin afectar la calidad de los explantes, ofreciendo una solución revolucionaria para los laboratorios de micropropagación (González Ramírez et al., 2020).

1.2. Antecedentes Investigativos.

(Erazo & Fuenmayor, 2017), mencionan que el ozono posee potentes características oxidantes, lo que lo convierte en un agente con capacidad para realizar acciones funguicidas, bactericidas y antivirales. El gas de ozono ha sido empleado en la purificación del agua destinada para el consumo humano.

(Tapia, & Ayala, 2019), mencionan que el ozono es visto como un potente desinfectante. Además de la efectiva regulación de bacterias, hongos y protozoos, se ha comprobado que inactiva a relevantes géneros fúngicos como: *Fusarium*, *Verticillium*, *Penicillium* spp. y hongos Koji.

El ozono (O_3) es un potente oxidante y, por ende, un potente desinfectante. Su aplicación puede ofrecer múltiples beneficios. La acción microbicida de ozono está ganando relevancia debido a su naturaleza de descomposición en agua en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Risoli & Lauria, 2022).

(Llerena Hidalgo & Castaño Oliva, 2019), mencionan que las altas concentraciones de ozono en el aire tienden a causar efectos perjudiciales en las plantas a nivel morfológico, fisicoquímico y molecular. Por otro lado, dosis reducidas de esta molécula pueden funcionar como catalizador para las plantas, activando sus mecanismos de defensa y promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno y la biosíntesis de compuestos bioactivos, fitoquímicos y fitohormonas.

El proceso micropropagación de *S. betaceum*. Cav. (tomate de árbol), es una técnica biotecnológica empleada para la multiplicación acelerada y regulada de las plantas a partir de fragmentos minúsculos de tejido vegetal (como segmentos nodales, ápices caulinares). Este procedimiento asegura plantas exentas de enfermedades y genéticamente iguales (Criollo. et al., 2016).

El uso de agua ozonizada en diferentes concentraciones para aplicación directa y pulverización, contra patógenos y hongos, la inmersión 0,8 mg/l de agua ozonizada se obtuvo buenos resultados en control de hongos, mientras la tasa de crecimiento de

micelios gradualmente disminuyeron un 67%, el agua ozonizada 7,5 mg/l indico más eficiencia para restringir los patógenos (Guo et al., 2019).

A pesar de lo indicado anteriormente la exposición al ozono en plantas también puede ser perjudicial causando condiciones de estrés debido al uso continuo de ozono, el aumento del estrés oxidativo conduce a daños en el crecimiento y la calidad de la planta, en los procesos de respiración, las numerosas hojas absorben ozono a través de las estomas, este ozono puede modificar la composición química de las células. Los daños oxidantes se muestran o son notables en las primeras etapas de la planta al estar mucho tiempo al contacto con el ozono (Pirata et al., 2022).

1.3. Marco teórico

1.3.1 Tomate de árbol

El origen que mantienen varios autores hace pocos años que el tomate de árbol era nativo de la región andina, principalmente de la vertiente oriental de Ecuador y Perú, investigaciones recientes señalan que el tomate de árbol cultivado, está estrechamente relacionado con un material boliviano de acuerdo a evidencias moleculares y estudios morfológicos (INIAP-Estación Experimental Santa Catalina, s. f.).

El tomate de árbol (*S. betaceum* Cav.), es una fruta semi-perenne que inicia producción desde el primer año de haber sembrado, pero en zonas más altas puede alargarse hasta los dos años, el tomate puede desarrollarse muy bien en zonas andinas que es de Ecuador y Colombia en altitudes de 1000 a 3000m (Berrerril et al., 2020).

1.3.2 Taxonomía.

Tabla 1. Taxonomía y características morfofisiológicas

Taxonomía del tomate de árbol	
Reino	Plantae
División	Angiosperma
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceas
género	<i>Solanum</i>
Subgénero	Cyphomandra
Sección	Pachyphylla
Especie	<i>S. betaceum</i>

Fuente: (Canabio, 2009).

1.3.3. Características morfológicas.

El tomate de árbol (*S. betaceum*) es una planta semileñoso que puede llegar a tener una altura entre 2 y 3 metros y forma parte de la familia Solanaceae. Es una especie nativa de los Andes, que se desarrolla en ambientes cálidos y fríos. El fruto tiene un aspecto ovoide o elipsoide con punta, con piel suave y mucílago de tonalidades violeta, roja, amarilla o anaranjada. En Ecuador, se cultivan cerca de 5900 hectáreas de tomate de árbol, principalmente en la región de la Sierra (Orihuela, 2007).

1.3.4. Importancia del tomate árbol en Ecuador.

En la región Sierra Ecuatoriana, durante el periodo 2015-2017, el área de cultivo de tomate de árbol se incrementó en un 70 %, pasando de 4500 a 7600 ha. Localizadas en los valles interandinos de las provincias de Carchi, Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Cañar, Azuay y Loja registrando rendimientos anuales de 60 a 80 toneladas al año, se cultiva a una altitud de 2000 y 2800m, con una temperatura de 13 y 24 °C en la sierra se ubica la mayor superficie cultivada que se comprende de 2000 a 2500m y entre 1000 y 1500 en el oriente (FAO, 2018).

1.3.5. Propagación del tomate de árbol.

El tomate de árbol se puede propagar de manera sexual mediante semilla o de forma asexual por estaca o injerto.

1.3.5.1 Propagación sexual.

La propagación por semilla se lleva a cabo recolectando frutos cuidadosamente seleccionados, exentos de insectos y enfermedades, de coloración homogénea, maduros y de buen tamaño, procedentes de árboles madres robustos. Se extraen las semillas, se lavan para eliminar el mucílago y se secan al aire libre; luego se lleva a cabo la siembra en un sustrato desinfectado. Las plantas están preparadas para ser trasplantadas cuando lleguen a 25 cm de altura (S.A.S., 2015).

1.3.5.2 Propagación asexual.

Mediante el uso de estacas obtenidas de los chupones basales o aéreos, que deben tener alrededor de 30 cm de longitud y tener múltiples yemas; este material vegetal debe ser originado de plantas saludables. Las estacas se sitúan en un sustrato de turba y se promueve su enraizamiento mediante el uso de auxinas. - Estas plántulas se mantienen en el vivero hasta que lleguen a 0,7 a 1 metro de altura. Otro procedimiento

frecuentemente utilizado es el injerto, que impacta en el aumento de la producción, los dos procesos deben llevarse a cabo con ramillas nuevas (S.A.S., 2015).

1.3.6 Cultivo de tejidos.

1.3.6.1 Vía organogénesis.

A través de la organogénesis se pueden crear plántulas completas a partir de tejidos vegetales, sin atravesar una fase de desdiferenciación, o sea, callo y/o creación de embriones somáticos, preservando de esta manera la estabilidad genómica en las plantas regeneradas. No obstante, es importante tener en cuenta que la mera micropropagación *in vitro* puede provocar, por ejemplo, modificaciones epigenéticas, o sea, patrones de metilación modificados en el genoma de especies propagadas de manera clonal. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales también ha resultado beneficioso o imprescindible para la transformación genética, siendo el inicio para la creación de material de trabajo, para la adquisición y difusión de plántulas que han sido modificadas genéticamente. La mejora genética actúa como un recurso de soporte para la optimización de cultivos clonados, como el tomate de árbol (Murillo, 2021).

1.3.6.2 Vía embriogénesis.

Proporciona la oportunidad de propagar extensamente líneas o variedades de élite sin el peligro de modificar su constitución genética, asegurando así la uniformidad en las plantaciones. Mediante el mejoramiento *in vitro*, ya sea provocando variación soma clonal o incorporando ADN foráneo a través de ingeniería genética, es posible producir variedades con diferentes resistencias a insectos, patógenos y factores ambientales, además de incrementar la calidad de la fruta y su rendimiento. Además, la embriogénesis somática se utiliza en campos de estudio como la variación clonal, investigaciones celulares y la crioconservación de líneas embriogénicas (Arahana, Cabrera, & Torres, 2010).

1.3.7 Las diferentes fases de la micropropagación.

1.3.7.1 Fase I. Establecimiento *in vitro* del material vegetal.

Esta fase se centra principalmente en seleccionar el explantes y su desinfección para comenzar un cultivo aséptico. - El proceso de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede comenzar con diversos órganos o tejidos, dependiendo de su tamaño, tipo y periodo de recolección, el desarrollo de los explantes de tomate provenientes de plantas jóvenes

o áreas de crecimiento activas es superior al de los cultivados en plantas adultas, el tejido a implantar es más joven y menos diferenciado, la respuesta *in vitro* será más favorable, el tamaño del explante es un elemento crucial que impacta en la desinfección y regeneración de las plantas, mientras más pequeño sea el explante, menos probable es la contaminación y más complicada la regeneración (Ruscitti, 2020).

1.3.7.2 Fase II. Multiplicación *in vitro*.

Durante el cultivo *in vitro*, las células somáticas tienen la capacidad de crear órganos como brotes, raíces y/o flores (Organogénesis) o embriones (Embriogénesis somática) en respuesta a un estímulo específico, las dos vías de regeneración pueden realizarse de manera directa o indirecta, la última conlleva el establecimiento de callo (Ruscitti, 2020)

1.3.7.3 Fase III. Enraizamiento *in vitro*.

Los brotes recolectados durante la etapa de multiplicación son transferidos a un medio (Ruscitti, 2020)

1.3.7.4 Fase IV. A climatización.

Desarrollar la transferencia del entorno *in vitro* a condiciones de invernáculo o campo, reducir las pérdidas y agilizar el procedimiento (Ruscitti, 2020).

1.3.8. Establecimiento *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de plantas se refiere a cultivar plantas en un contenedor de vidrio con un entorno que promueva su crecimiento y desarrollo. En el cultivo *in vitro* se consideran dos factores: la asepsia (ausencia de contaminación: presencia de microorganismos) y la regulación de los factores que influyen en el crecimiento de la planta. Las plantas poseen la habilidad de producir un nuevo individuo a partir de una célula o molécula (Arahuana et al., 2010).

La micropropagación es un método frecuentemente empleado en el cultivo *in vitro*, ya que a través de un explante (parte vegetativa de la planta) de una planta madre, se pueden generar descendientes que son genéticamente similares a la planta original. Para conseguir los explantes, es necesario realizar una desinfección de los explantes

de la planta madre con el fin de eliminar los contaminantes, que usualmente son microorganismos como hongos y bacterias presentes en el entorno (Arahuana et al., 2010).

1.3.9. Desinfectantes.

La desinfección es un procedimiento físico o químico donde se expulsan los microorganismos dañinos. Un desinfectante es un compuesto químico que expulsa estos microorganismos. Para ello, existen productos como el alcohol etílico, que es un líquido incoloro de acción rápida que elimina cualquier clase de microorganismo, aunque no posee selectividad. El peróxido de hidrógeno es un desinfectante de amplio espectro. La clorhexidina, es un desinfectante de espectro amplio, también puede eliminar ciertos virus y hongos (González Ramírez, 2019).

La oxidación se define como un fenómeno en el que un átomo o un conjunto de átomos pierde uno o varios electrones (se oxida) y estos electrones son transferidos a otro (se reduce). La oxidación, también denominada oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro*, causa daños al tejido vegetal e incluso puede llevar a la muerte celular. Estos procesos de oxidación son principalmente provocados por el efecto oxidativo de un agente desinfectante que conduce (González Ramírez, 2019).

1.3.0. Agua ozonizada

Se considera al ozono como un oxígeno enriquecido con 3 átomos de oxígeno, este es inestable y puede ser descompuesto con facilidad en oxígeno normal (O_2). El ozono actúa como un eficaz oxidante y desempeña un alto rendimiento como desinfectante, llegando incluso a rivalizar con el cloro. Este gas de color azul puede surgir tras una tormenta eléctrica, es escasamente soluble en agua y muy volátil, permaneciendo en el agua por escasos minutos. Solo al aplicarlo, suele perderse un 10% debido a su volatilización (González Ramírez et al., 2020).

El ozono es reconocido como el desinfectante con la mayor eficacia antimicrobiana y necesita tiempos de contacto muy breves. Su eliminación de bacterias es superior a la del cloro, siendo 3000 veces superior. Aunque ambos son oxidantes, el mecanismo de acción es distinto. El ozono elimina las bacterias rompiendo la membrana celular, un proceso conocido como destrucción de células por lisina. Además, posee tres funciones esenciales: acción antimicrobiana, fungicida y de bactericida (Galindo, 2006).

La aplicación de ozono evidenció que durante la etapa de desarrollo de la propagación *in vitro* a gran escala, únicamente el 4% de los segmentos de ñame presentaban contaminación con microorganismos durante 4 semanas de cultivo *in vitro*. Además, se registró una disminución en la cantidad de microorganismos contaminantes. Comparado con los que no se utilizan 5 veces (Stanisavljević et al., 2017).

El proceso de desinfección de segmentos mediante la exposición a ozono gaseoso y acuoso tuvo impacto en el primer día de germinación, germinación y desarrollo de las plántulas durante la etapa de colonización. Mediante el uso de concentraciones de 1, 1.5 y 2 ppm durante 5 a 10 minutos, los resultados más favorables al aplicar ozono al comienzo de la germinación fueron de 7.5 días. Además, el porcentaje de germinación y expansión de brotes se situó entre el 88% y 4.81 cm cuando los segmentos nodales se encontraban en la etapa acuática (Yuliana et al., 2020).

La germinación de los segmentos de nódulos en la fase gaseosa del ozono fue nula, mientras que los segmentos desinfectados con ozono en la fase líquida (agua) empezaron a germinar en grandes volúmenes más rápido que los segmentos desinfectados con hipoclorito de sodio. Los segmentos desinfectados con 3% de hipoclorito de sodio sufrieron un retraso y empezaron a germinar a los 16 días de cultivo (Megahed A, 2018).

Tabla 2. Efecto del ozono en el crecimiento de segmentos nodales de ñame para la propagación de plantas *in vitro* en cuatro semanas de cultivo.

Tratos	Ozono concentración	Tiempo de exposición (minutos)	inicio de brotante (día)	Brotación (%)		Longitud de brotación (cm)
				Significar	Rango medio	
Flujo de aire directo	10 mgL-1	5 00 0 10 00 0 5 00 0 10 00 0 5 00 0 10 00 0		15,50a	19,50a	0
Flujo de aire directo	10 mgL-1					0
Flujo de aire directo	20 mgL-1					0
Flujo de aire directo	20 mgL-1					0
Flujo de aire directo	30 mgL-1					0
Flujo de aire directo	30 mgL-1					0
Inmersión en agua	1,0 ppm	5	7	87		4,50a
Inmersión en agua	1,0 ppm	10	8	92		4,60a
Inmersión en agua	1,5 ppm	5	7	88	17,20a	5,20a
Inmersión en agua	1,5 ppm	10	9	90	18,75a	4,70a
Inmersión en agua	2,0 ppm		7	85	14,50a	5,10a
Inmersión en agua	2,0 ppm	5 10	7	86	15,50a	4,80a
Hipoclorito de sodio 3,0% SE±				64	11,25b	2,32b
						0,15

Fuente: (Cabrera Jova, 2014)

El ozono actúa como un desinfectante de gran eficacia en el tratamiento del aire y la desinfección de superficies, es altamente eficaz contra todo tipo de microorganismo.

El uso ozono en agua o aire para desinfectar superficies es una práctica muy común que requiere una concentración menor en comparación con otros desinfectantes (Cabrera Jova & González, 2014).

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales *S. betaceum*. Cav.

1.4.2 Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.
2. Calcular el porcentaje de contaminación de segmentos nodales acorde con los diferentes tiempos de inmersión.
3. Evaluar el efecto de la longitud y el grosor del explante sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Capítulo II

Metodología.

2.1. Ubicación del experimento.

La investigación se realizó en la provincia de Tungurahua en la Universidad Técnica de Ambato en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el laboratorio de biología molecular en el sector de Querochaca.

Ilustración 1. Ubicación del ensayo Handy GPS-mapa zoom.



2.2. Características del lugar.

Es un lugar de clima frío que está ubicado en el cantón Cevallos en el sector de Querochaca con una temperatura de 15 °C con moderada frecuencia de lluvias, el experimento evaluará los efectos del agua ozonizada como agente desinfectante en establecimiento *in vitro* de segmentos nodales en tomate de árbol (*S. betaceum*) y se realizará en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que está a 2800 msnm; con las coordenadas 01° 24' 27" S y 78° 35' 00" W.

2.3. Equipos y materiales.

Equipos

Equipos

- Balanza analítica (AE Adam).
- Ozonizador (Dino Purificationcation).
- pH metro (Hanna).
- Cabina de flujo laminar (Series A2).
- Microondas (Panasonic).
- Autoclave (Stermax).
- Agitador Vortex (Corning).

Materiales

- Material vegetal: explantes de tomate de árbol gigante amarillo (4 semanas abundante follaje y libre de plagas y enfermedades).
- Bandeja (metálica).
- Etiquetas adhesivas.
- Vasos de precipitación (vidrio erlenmeyer de 500 ml, 1000ml).
- Probetas (vidrio 50 ml, 100ml).
- Bisturí.
- Pinzas metálicas de acero inoxidable.

- Estantes metálicos.
- Pipetas (plástico 10 ml).
- Papel aluminio.
- Alcohol al 70% (v/v)
- Mechero de alcohol

Reactivos

- Agua destilada.
- NaOH (Sigma -Aldrich, catálogo MFCD00003548).
- Agar Planta (Biolich ®).
- Medio nutritivo Murashige y Skoog.
- Sacarosa.
- 6-bencilaminopurina (hormona BAP).
- El ácido indol-3-acético (AIA).

2.4. Tipo de investigación.

La investigación es de tipo experimental cuantitativa pues se basa en una observación y medición de datos a partir del efecto del agua ozonizada como un agente desinfectante sobre el porcentaje de establecimiento *in vitro* contaminación de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav.

2.5. Factores de estudio.

- A. Concentración de ozono en el agua (ppm).
- B. Tiempos de inmersión de los segmentos nodales sumergidos en agua ozonizada.
- C. Influencia de la longitud, y grosor del explante.

2.6. Tratamientos.

El primer ensayo se determinará en observar el efecto del agua ozonizada como agente desinfectante en la contaminación *in vitro* con diferentes concentraciones en un intervalo de 5 minutos.

Tabla 3. Tratamientos

Número	Símbolo	Descripción
1	T1	Efecto del agua ozonizada en 1 ppm a 5 minutos.
2	T2	Efecto del agua ozonizada en 2 ppm a 5 minutos.
3	T3	Efecto del agua ozonizada en 3 ppm a 5 minutos.
4	C1	Testigo (agua ionizada estéril). 5 minutos
5	C2	Hipoclorito de Na 3% en 5 minutos.

Segundo ensayo se evaluará diferentes tiempos de inmersión o exposición del explante al agua ozonizada con la mejor concentración observada en el primer ensayo con un testigo de hipoclorito al 3%.

Número	Símbolo	Descripción
1	T1	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos.
2	T2	Tratamiento 2 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 10 minutos.
3	T3	Tratamiento 3 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 15 minutos.
5	C2	Hipoclorito de Na 3%. Sin tiempo

Tercer ensayo se evaluará diferentes longitudes del explante con la mejor concentración y la mejor exposición del explante al agua ozonizada sin testigo.

Número	Símbolo	Descripción
--------	---------	-------------

1	T1	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 1 cm.
2	T2	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 1,5 cm.
3	T3	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 2 cm.

Cuarto ensayo se evaluará diferentes grosores del explante con la mejor concentración obtenida, con el mejor tiempo de inmersión, con la mejor longitud obtenida sin testigo.

Número	Símbolo	Descripción
1	T1	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 1 cm, y un grosor de 0.50cm.
2	T2	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 1,5 cm, y un grosor de 0.75cm.
3	T3	Tratamiento 1 agua ozonizada 3 ppm, a un tiempo de inmersión de 5 minutos, a una longitud de 2 cm, y un grosor de 1cm.

2.7. Diseño experimental.

Se utilizará el diseño experimental completamente al azar (DCA).

Factores de estudio:

Diferentes concentraciones de agua ozonizada.

T1:1ppm

T2:2ppm

T3:3ppm

C1: Agua desionizada estéril.

C2: Hipoclorito al 3%.

Diferentes tiempos de inmersión del explante en agua ozonizada.

T1: 5 minutos.

T2: 10 minutos.

T3: 15 minutos.

C1: Agua desionizada estéril.

C2: Hipoclorito al 3%.

Diferentes longitudes del explante y sumergidos en agua ozonizada.

T1:1 cm.

T2: 1,5 cm.

T3: 2 cm.

Diferentes grosores del explante y sumergirlos en agua ozonizada.

T1: 0,5 cm.

T2: 0,75 cm.

T3: 1cm.

2.8. Manejo del experimento.

2.8.1. Obtención del explante.

Se seleccionó la planta madre de (*S. betaceum*. Cav) las plantas se encontraban en viveros en valle hermoso en el canto Pelileo de allí de traslado a la universidad Técnica de Ambato campus Querochaca libre de plagas y enfermedades. Para obtener el explante se visualizó las plantas que estén libre de plagas y enfermedades, para llevarlas al laboratorio de biotecnología vegetal y hacerles un corte transversal de 2cm

cerca de las yemas, los explantes fueron llevados en una probeta a lavarlos para eliminar tierra y otros restos vegetales se lavó y enjuago 3 veces con un intervalo de 5 minutos con agua desionizada estéril y jabón antibacteriano para después ser llevados a la cabina de flujo laminar para después sumergir los explantes en agua ozonizada por un período de 5 minutos a concentraciones de 1, 2, 3 ppm, luego con el testigo (hipoclorito al 3%) aseamos los mismos pasos de cortar el explante, lavar, enjuagar 3 veces y finalmente se colocará el explante en un frasco estéril con medio de cultivo MS (Murashige & Skoog).

2.8.2. Preparación de medio de cultivo MS.

(Murashige & Skoog), se pesó 4,43 g del medio nutritivo(MS) para disolver en agua desionizada estéril, a continuación se pesó las auxinas (6-BAP y AIA) 6-BAP se pesó 0,0018g y de AIA se pesó 0,0006g, luego se pesará 30 g sacarosa y por consiguiente se colocará en los matraces Erlenmeyer de 500 ml, se estabilizará el pH del medio de cultivo a 5,9. finalmente se pesará 3,5g de agar planta en el medio de cultivo MS y se colocará en los matraces Erlenmeyer de 500 ml, los matraces se llevarán al microondas y se calentarán por 5 minutos, se pondrá 20 ml de medio de cultivo y se cubrirá con papel aluminio y se ajustará con ligas, se llevará los tubos a autoclave por 40 minutos a 110 °C y por último se retirará y llevará a la cámara de flujo laminar hasta que se realice la siembra.

2.8.3. Manejo de ensayo en cámara de flujo laminar.

Se esterilizo los materiales en autoclave por 40 minutos a 110 °C: Pinzas, bisturí, placa metálica, cuadros de papel aluminio, frascos de vidrio y papel aluminio, primero se desinfectará con alcohol bisturí, mecheros de alcohol, ligas, encendedor, recipiente plástico, medio de cultivo e introducirlos en la cámara de flujo laminar.

Una vez colocados dentro de la cámara de flujo laminar en orden todos los materiales encendemos la cámara de fujo laminar y encendemos la luz UV de la cámara de flujo por 30 minutos y luego se encenderá los mecheros de alcohol, se llevarán 3 frascos con agua ozonizada con las concentraciones establecidas de 1, 2, 3 y ppm, además se retirará el papel aluminio de los materiales y flamearlos, se flamea las pinzas y el bisturí en el mechero y después se enfría en el agua y retira la planta *in vitro* del frasco, se colocará la planta en la placa metálica y con el bisturí cortamos los segmentos nodales (1 a 2 nudos por explante), Se tapa con papel aluminio y se ajusta con ligas y

finalmente se traslada los tubos de ensayo sembrados al área de transferencia con una temperatura de 24 °C y con luz blanca fluorescente.

2.9. Variables.

2.9.1. Variable independiente.

Concentraciones de agua ozonizada.

Tiempo de inmersión del explante en el agua ozonizada.

Longitud y grosor de los segmentos nodales.

2.9.2. Variable dependiente.

Cultivo *in vitro* de *S. betaceum*. Cav.

Porcentaje de establecimiento *in vitro*.

Porcentaje de contaminación *in vitro*.

Longitud de brotes.

Número de entrenudos.

Número de hojas.

2.9.3. Variables respuesta.

Las variables determinarán el efecto del agua ozonizada sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Análisis estadísticos y discusión de los resultados.

3.1 Determinación de la influencia de diferentes concentraciones de agua ozonizada (1ppm, 2ppm, 3ppm) sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav.

3.1.1 Porcentaje de contaminación *in vitro*.

No existieron diferencias significativas entre los tratamientos a base de agua ozonizada y el hipoclorito de sodio respecto al porcentaje de contaminación *in vitro* (tabla 4).

Tabla 4. Influencia de diferentes concentraciones de ozono disuelto en agua (ppm) sobre el porcentaje de contaminación *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav en el medio de cultivo MS.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i> de segmentos nodales	
	Media (%)	Rango
Hipoclorito de sodio 3%	60	A
Agua ozonizada 1ppm	80	A
Agua ozonizada 3ppm	80	A
Agua desionizada 2ppm	100	A
Agua desionizada estéril	100	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

El agua ozonizada es un desinfectante de alta calidad, pero se deben utilizar concentraciones moderadas al tratar explantes como agente de desinfección ya que a concentraciones elevadas pueden tener un efecto tóxico en los tejidos vegetales, lo cual puede provocar reducción en la brotación de las yemas, así como un estrés oxidativo que conducen a la muerte celular.

Los resultados obtenidos por Díaz et al., (2006) ya que con el agua ozonizada al 1,5 ppm hubo una contaminación de 4% y con el hipoclorito al 3% hubo una contaminación del 6% respectivamente, pero su establecimiento prevaleció

demostrando un vigor en sus explantes en *malanga* estos resultados difieren con mi ensayo ya que con agua ozonizada a 3 ppm obtuvimos una contaminación de 80% y de hipoclorito una contaminación de 60% respectivamente.

3.1.2 Porcentaje de establecimiento *in vitro*.

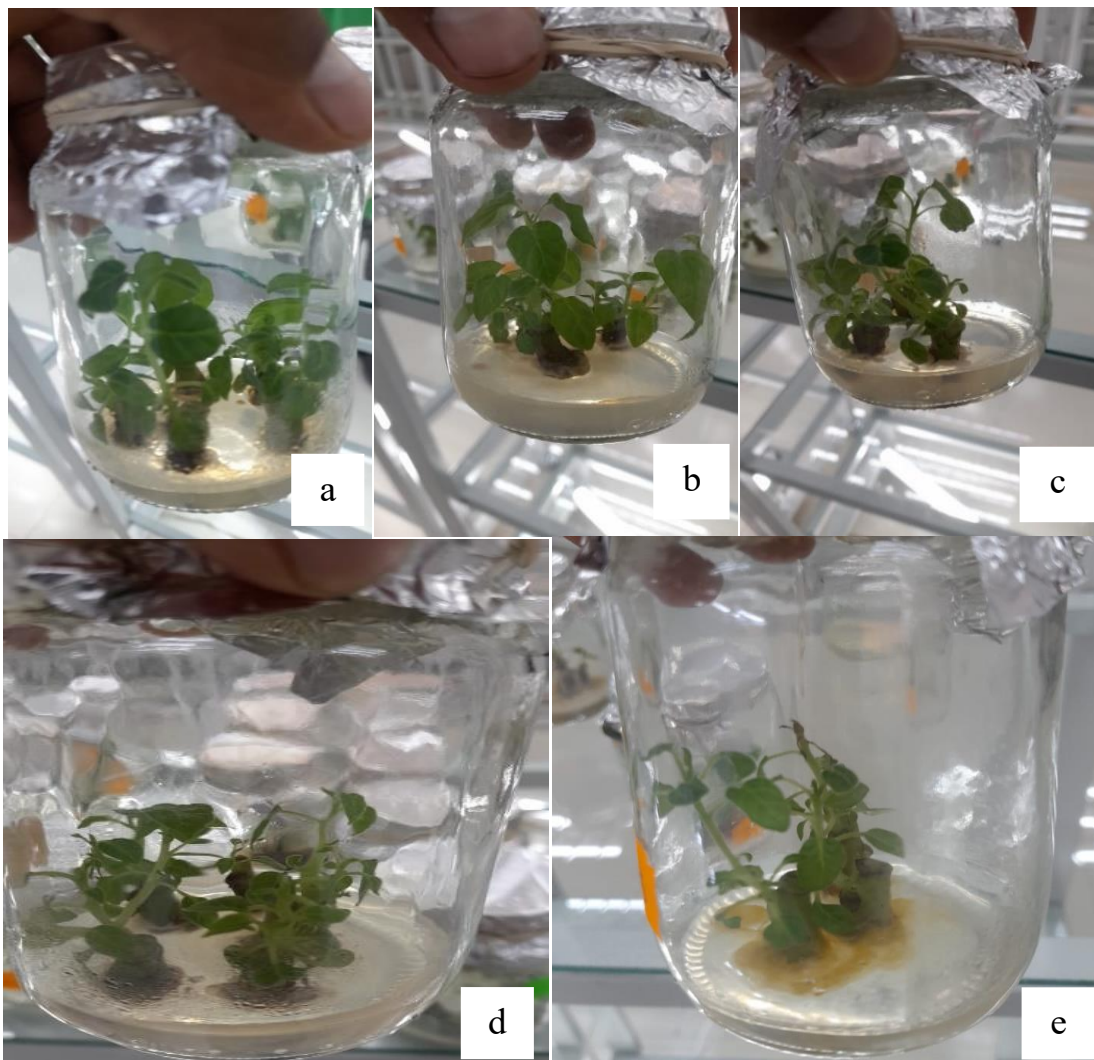
De modo similar no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de ozono disuelto en agua (ppm) sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum* en el medio de cultivo MS (Tabla 5).

Tabla 5. Influencia de diferentes concentraciones de ozono disuelto en agua (ppm) sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum* en el medio de cultivo MS.

Tratamientos	Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales	
	Media	Rango
Agua ozonizada 3ppm	66,67	A
Hipoclorito de sodio 3%	66,67	A
Agua desionizada estéril	53,32	A
Agua ozonizada 2ppm	33,33	A
Agua ozonizada 1ppm	20,00	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

Ilustración 2. Cultivo *in vitro* de *S. betaceum*. Cav bajo la influencia de diferentes concentraciones (a: 1ppm, b: 2ppm, c: 3ppm, de ozono disuelto en agua y dos testigos d: testigo agua desionizada estéril, e: testigo 2 hipoclorito 3%).



A pesar que no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos analizados (tabla 5) debemos señalar que para el cultivo *in vitro* de especies vegetales es muy importante contar con un agente de desinfección que tenga similar efectividad que el hipoclorito de sodio 3% puesto que ello permitiría utilizar el agua ozonizada que produce un efecto desinfectante similar pero que no causa trastornos respiratorios en los técnicos operarios que trabajan en las biofábricas para la producción de vitroplantas como semilla.

Estos resultados difieren con lo descrito con (Guerra et al., 2013) ya que presentaba índices de mortalidad de 45.67% y 90.12% al utilizar hipoclorito de sodio al 3% sumergido 15 minutos y agua más ozono durante 25 minutos,

A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, al utilizar agua ozonizada a 3ppm en explantes sumergidos durante 5 minutos, así como en hipoclorito de sodio 3% durante 5 minutos, las plantas establecidas mostraron un mayor crecimiento de sus brotes es por eso que decidí utilizar agua ozonizada a 3ppm en explantes sumergidos durante 5 minutos para el siguiente tratamiento como son tiempos de inmersión.

3.2 Determinación de diferentes tiempos de exposición del explante a agua ozonizada (5 min, 10 min y 15 min) sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav.

3.2.1 Porcentaje de contaminación *in vitro*.

Al evaluar los diferentes tiempos de inmersión (5 min, 10 min y 15 min) de agua ozonizada a 3 ppm en comparación con el hipoclorito de sodio al 3% no se observaron diferencias estadísticas significativas sobre el establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav. (tabla 6).

Tabla 6. Influencia de diferentes tiempos de inmersión (5 min, 10 min y 15 min) de agua ozonizada a 3 ppm en comparación con el hipoclorito de sodio al 3% sobre el porcentaje de contaminación en fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i> en fase de establecimiento	
	Media	Rangos
Hipoclorito de sodio al 3%.	26,67	A
5 min de inmersión	80,00	A
10 min de inmersión	80,00	A
15 min de inmersión	80,00	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

3.2.2 Porcentaje de establecimiento *in vitro*.

El tiempo de inmersión en agua ozonizada durante 5 minutos fue similar al uso del agente de desinfección hipoclorito de sodio al 3%.

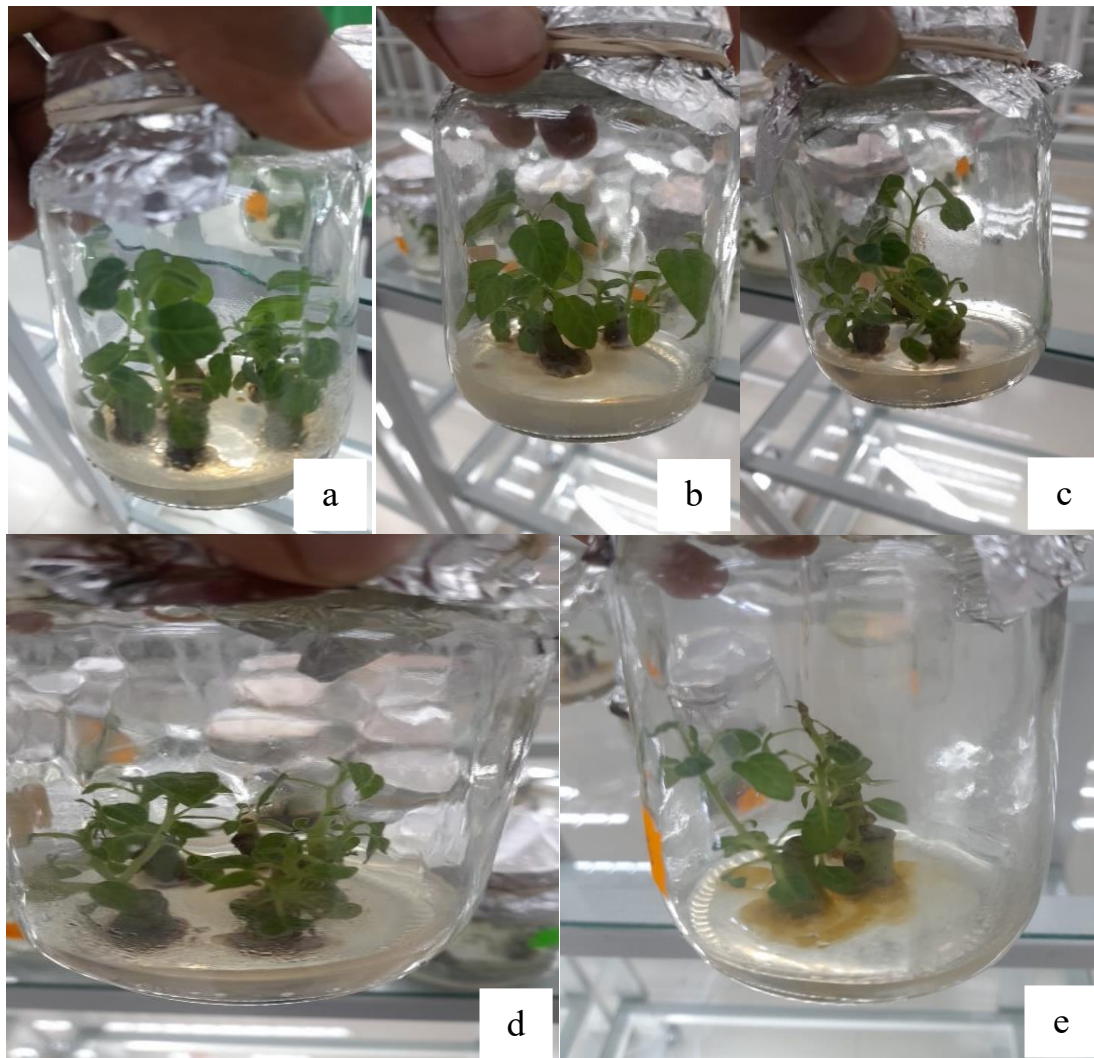
Tiempos superiores a 5 minutos afectaron significativamente el establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav, debido a un fuerte efecto oxidante que afectó los explantes (Tabla, 7).

Tabla 7. Influencia de diferentes tiempos de inmersión (5 min, 10 min y 15 min) de agua ozonizada a 3 ppm en comparación con el hipoclorito de sodio al 3% sobre el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav.

Tratamientos	Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	
	Media	Rangos
5 min de inmersión	100,00	A
Hipoclorito de sodio al 3%	100,00	A
10 min de inmersión	79,98	A
15 min de inmersión	46,67	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

Ilustración 3. Explantes de *S. betaceum*. Cav a: explantes 5 minutos, b: expuestos 10 minutos, c: expuestos 15 minutos, d: testigo hipoclorito al 3% sin tiempo y e: clorosis en sus hojas.



El tiempo de inmersión en agua ozonizada durante 5 minutos fue similar al uso del agente de desinfección hipoclorito de sodio al 3%. Tiempos superiores a 5 minutos afectaron significativamente el establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de *S. betaceum*, debido a un fuerte efecto oxidante que afectó los explantes (Tabla 7, ilustración 3). Estos resultados difieren con lo descrito en la investigación realizada por (Yuliana et al., 2020), que al exponer los explantes al agua ozonizada a más de 5 minutos se obtuvo plantas más uniformes y vigorosas, sin embargo, la exposición del explante durante tiempo prolongado mostró daños en preservar la estructura genómica y clorosis en sus hojas.

A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, al utilizar agua ozonizada a (5 min, 10 min, 15min), es por eso que decidí escoger el tiempo de inmersión en agua ozonizada durante 5 minutos ya que fue similar al hipoclorito al 3%, para el siguiente ensayo que es la influencia de la longitud de los segmentos nodales.

3.3 Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de *S. betaceum* sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav. utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

3.3.1 Porcentaje de contaminación *in vitro*.

No existieron diferencias significativas respecto a la longitud de los segmentos nodales sobre el porcentaje de contaminación utilizando el tiempo inmersión de 5 minutos y 3 ppm de agua ozonizada (tabla8).

Tabla 8. Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de *S. betaceum*. Cav sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	
	Media	Rangos
T1	100,00	A
T2	100,00	A
T3	100,00	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

3.3.2 Porcentaje de establecimiento *in vitro*.

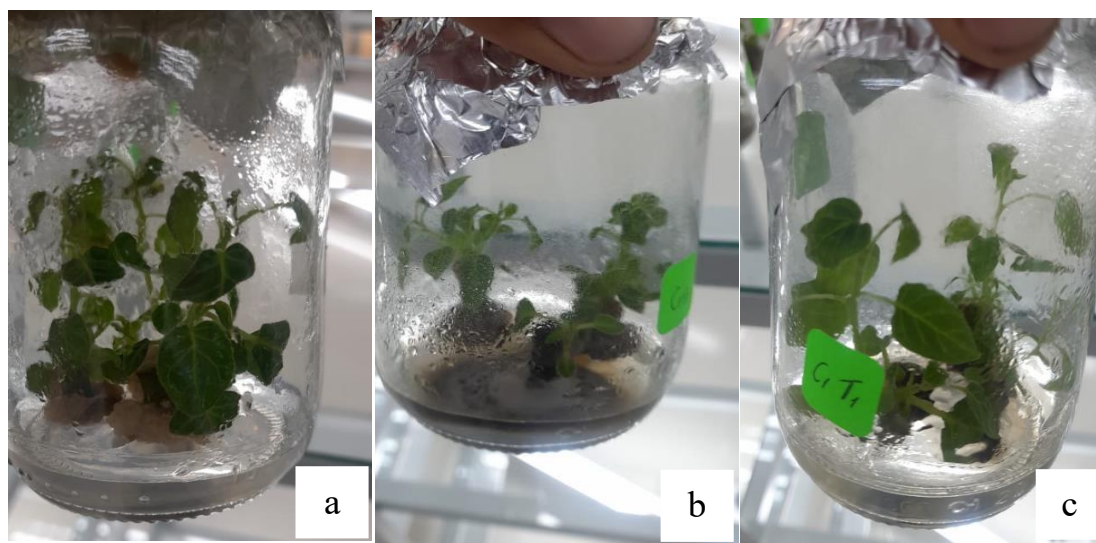
No existieron diferencias significativas entre las diferentes longitudes de los segmentos nodales respecto al porcentaje de establecimiento *in vitro* en el medio de cultivo MS (tabla 9).

Tabla 9. Influencia de la longitud de los segmentos nodales (1 cm, 1.5 cm y 2 cm) de *S. betaceum*. Cav. Sobre el porcentaje de establecimiento *in vitro* utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

Tratamientos	Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	
	Media	Rangos
T2	33,30	A
T1	26,65	A
T3	19,99	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

Ilustración 4. Segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav con diferentes longitudes a: 1.5cm hipoclorito 3%, b: 1.5cm agua ozonizada 3ppm y c: 2cm hipoclorito 3%.



Mediante el ensayo realizado se obtuvo los resultados que la longitud no influye en el porcentaje de contaminación ni de establecimiento, a la vez no existen investigaciones referentes para establecer comparaciones. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para determinar la longitud ideal y ésta, pueda aumentar la esterilidad y no causar daño tisular en los explantes (Delgado Haya et al., 2020).

A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, al utilizar agua ozonizada a 3ppm en explantes sumergidos durante 5 minutos, con las diferentes longitudes (1cm, 1,5 cm, 2cm), decidí escoger la longitud de 1,5 cm para el siguiente ensayo como es la influencia del grosor de segmentos nodales en *S. betaceum*, ya se no mostraba daños a los explantes ya que pude observar que los brotes se mostraban mas vigorosos y se establecieron de mejor manera, aunque si hubo contaminación en sus medios de cultivos.

3.4 Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de *S. betaceum*. Cav sobre el porcentaje de contaminación y establecimiento *in vitro* utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

3.4.1 Porcentaje de contaminación *in vitro*.

No se observó diferencias significativas entre los diferentes grosores de los segmentos nodales y el porcentaje de contaminación *in vitro* (tabla 10).

Tabla 10. Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de *S. betaceum*. Cav, sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

Tratamientos	Porcentaje de contaminación <i>in vitro</i>	
	Media	Rangos
T1	100	A
T2	100	A
T3	100	A

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

3.4.2 Porcentaje de establecimiento *in vitro*.

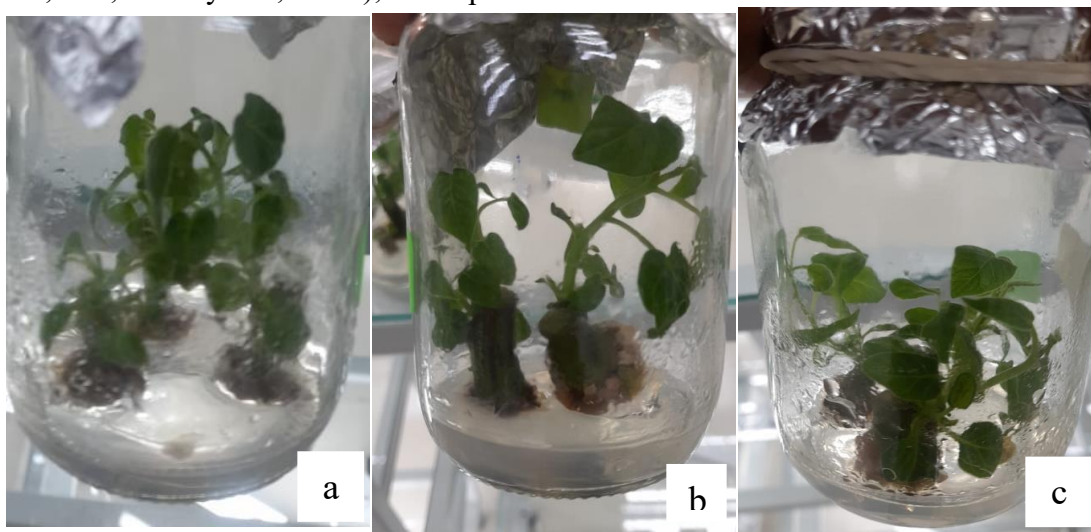
Tampoco el grosor de los segmentos nodales no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de establecimiento *in vitro* (tabla11).

Tabla 11. Influencia del grosor de segmentos nodales (0,5 cm, 0,75 cm y 1,00 cm) de *S. betaceum*. Cav sobre el porcentaje de contaminación utilizando inmersión de 5 minutos en 3 ppm de agua ozonizada.

Tratamientos	Porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i>	
	Media	Rangos promedios
T1	6,67	8,50
T2	6,67	8,50
T3	0	7,00

Rangos promedios que en una misma columna compartan letras comunes no difieren según la prueba H de Kruskal Wallis para $< 0,05$.

Ilustración 5. Segmentos nodales de *S. betaceum*. Cav con diferentes grosores (a: 0,5 cm, b: 0,75 cm y c: 1,00 cm), con hipoclorito al 3%.



Con los resultados obtenidos se pudo observar que el efecto del grosor no influye en el porcentaje de contaminación y del porcentaje de establecimiento *in vitro* en la fase de establecimiento. Por consiguiente, es necesario continuar realizando investigaciones en este ámbito.

A pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, decidí escoger el grosor de 0,75 cm ya que pude observar que los brotes se mostraban más vigorosos y se establecieron de mejor manera, aunque si hubo contaminación en sus medios de cultivos.

Conclusiones

- No se observó efecto positivo de las diferentes concentraciones de agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *S. betaceum*.
- Los tiempos de inmersión de los segmentos nodales en agua ozonizada no influyeron en el porcentaje de contaminación en fase de establecimiento *in vitro*.
- La longitud y el grosor del explante no influyeron en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Recomendaciones

- Probar el uso de ozono gaseoso en cámaras herméticamente cerradas y evaluar su efecto sobre el porcentaje de establecimiento *in vitro* y de contaminación.
- Identificar las especies microbianas contaminantes de los segmentos nodales que fueron resistentes a los tratamientos con agua ozonizada.
- Establecer un banco de plantas donantes *in vitro* para la toma de segmentos nodales.

Bibliografía

- Arahuana, V., Antonio, R, C. V, Maria, L., & Torres, P. (2010). *Vista de Propagación de tomate de árbol (Solanum betaceum) vía embriogénesis somática*. Propagacion de tomate de arbol(solanum betaceum).
<https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/avances/article/view/28/30>
- Basail Pérez, M., Efraín González, J., Ventura Chavez, V., González Vazquez, R. E., & Portal, O. (2022). Water-dissolved Ozone Mediates Optimization of Biotechnological Seed Production of Colocasia esculenta (L.) Schott. *Ozone: Science and Engineering*, 44(6), 536-544.
<https://doi.org/10.1080/01919512.2021.1984207>
- Berrerril, R., Encalada, A., & Feican, M. (2020). DESCRIPCIÓN AGRONÓMICA DEL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL (Solanum betaceum Cav.). *Revista agro productividad.*, 2, 86.
- Borgues, M. (2014). Desinfección de Dioscorea alata L. *Using different disinfection*

- treatments on in vitro cultures of the “caraqueño” Dioscorea alata L. clone*, 10.
- Cabrera Jova, M., & González, J. E. (2014). Ozone as an Alternative for Disinfection of Explants during In Vitro Mass Plant Propagation. *Ozone: Science and Engineering*, 36(5), 435-439. <https://doi.org/10.1080/01919512.2013.874940>
- Criollo, E. (2016). Regeneración in vitro de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252-261. <https://doi.org/10.17584/RCCH.2016V10I2.5750>
- Delgado Haya, H., Altamirano Salazar, A., Garate Navarro, M. A., Rodriguez García, J., & Leon Martinez, M. A. (2020). Control de la contaminación microbiana empleando bajas concentraciones de ozono e hipoclorito de sodio al interior de contenedores de polietileno empleados en biorreactores de inmersión temporal. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.25127/aps.20201.510>
- Estévez Fonseca, M. A. (2019). *Evaluación de diferentes medios de cultivo para la germinación in vitro de semilla de cultivares de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. Quito: UCE.
- Galindo, L. (2006). Ozonoterapia, una opción para el sector agropecuario. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VII(10), 1-16.
- González Ramírez, J. E., Cabrera Jova, M., Robaina, A., Rodríguez Pérez, D., González Cadalso, A., & Portal, O. (2020). Water-Dissolved Ozone Mediates Potyvirus Sanitation during In Vitro Propagation of *Dioscorea Cayenensis* Subsp. *Rotundata* (Poir.) Miège. *Ozone: Science & Engineering*, 42(1), 89-94. <https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1598845>
- Guerra, D. G., Jova, M. C., García, Y. B., & Jiménez, A. R. (2013). *esculenta Schott* ‘INIVIT MC-2001’ In vitro establishment of axillary buds of *Colocasia esculenta Schott*. 13(2), 107-112.
- Guo, Z., Wang, Z., Li, Y., & Wang, Q. (2019). Effect of Different Concentrations of Ozone on in Vitro Plant Pathogens Development, Tomato Yield and Quality, Photosynthetic Activity and Enzymatic Activities. *Ozone: Science & Engineering*, 41(6), 531-540. <https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1591268>

INIAP-Estación Experimental Santa Catalina. (s. f.).

Llerena Hidalgo, Á., & Castaño Oliva, R. (2019). Influencia del tipo de riego con agua ozonificada en el control del nivel de daño de la sigatoka negra en banano. *Alternativas*, 20(1). <https://doi.org/10.23878/alternativas.v20i1.245>

Pirata, M. S., Correia, S., & Canhoto, J. (2022). Ex Vitro Simultaneous Acclimatization and Rooting of In Vitro Propagated Tamarillo Plants (*Solanum betaceum* Cav.): Effect of the Substrate and Mineral Nutrition. *Agronomy*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy12051082>

Profile, S. E. E. (2017). *Uchuva: Cosecha y poscosecha*. April.

Ramírez, F., Grijalva, R., Navarrete, X., & Guerrero, R. (2015). NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS CON TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) EN LAS PROVINCIAS DE IMBABURA, PICHINCHA Y TUNGURAHUA, ECUADOR. *ECUADOR ES CALIDAD*, 2(1). <https://doi.org/10.36331/revista.v2i1.2>

Risoli, S., & Lauria, G. (2022). Ozonated water application as an innovative tool for elicitation of plant defense response: A minireview. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 28, 100375. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2022.100375>

Stanisavljević, A., Bošnjak, D., Štolfa, I., Vuković, R., Kujundžić, T., & Drenjančević, M. (2017). Sterilization of different explant types in micropropagation of CAB-6p and Gisela 6 cherry rootstock. *Poljoprivreda*, 23(2), 31-37. <https://doi.org/10.18047/POLJO.23.2.5>

Yuliana, T., Prihastanti, E., & Nurchayati, Y. (2020). *POTENTIAL OF AQUEOUS OZONE FOR THE IN VITRO STERILIZATION PROCEDURE OF SOLANACEAE*. 13, 2020. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i10.38945>

Anexos

Tema: Efecto del agua ozonizada sobre el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Solanum betaceum* Cav.

Numero	Descripción	Imagen
1	Conseguí la planta de tomate gigante amarillo. Plantas traídas de valle hermoso (Pelileo).	
2	Ocupamos 40 plantas por ensayo ya que en cada tratamiento utilizamos 3 explantes.	
3	Complementación del medio MS. Medio de cultivo: 2,22g Sacarosa: 10 g Agar: 3,5	

4 Medio ms 2,22g



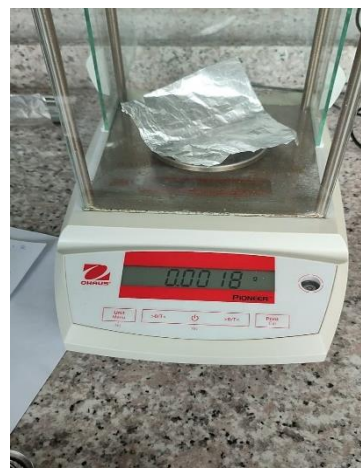
5 Sacarosa 10g.



6 Agar 3,5g.



7 Hormona 6 BAP:
0,0018g



8 Hormona AIA: 0,0006
g



9 Primero en 100 ml de agua desionizada estéril mezclamos las hormonas, después el medio MS Con 200 ml de agua desionizada estéril a continuación ponemos 450 ml de agua desionizada estéril y agregamos la sacarosa y por último agregamos el Agar y completamos 500ml y mezclamos.



-
- 10** **Medimos el pH que este específicamente en 5,9**



- 11** **Dispensamos en cada vasito 20 ml del medio de cultivo.**



- 12** **Auto clavamos todos los materiales y preparamos material para la siembra de explantes.**



-
- 13** **Preparamos nuestra
planta de tomate para
desprenderle los
explantes.**



- 14** **Cortamos nuestro
explante de tres cm.**



- 15** **Lavamos los explantes
1 vez.**



- 16** **Enjuagamos 3 veces**



-
- 17 **Tapamos los explantes
para no contaminarlos.**



- 18 **Preparamos la
maquina de ozono.**



- 19 **Preparamos el oxígeno.**



- 20 **Limpiamos la cámara
de flujo laminar con
alcohol.**



-
- 21 Una vez acomodado los materiales en la cámara de flujo laminar prendemos la cámara y la luz UV mínimo 30 minutos.



- 22 Para el testigo con el hipoclorito preparamos 15ml de hipoclorito en y 35 ml de agua desionizada estéril.



- 23 Realizamos la siembra del primer ensayo o primer tratamiento.



- 24 Llevamos los medios de cultivos ya sembrados y esperamos 7 a 8 días donde ya se pudo observar los primeros brotes.



25

**Los primeros brotes.
Pero con su medio de
cultivo contaminado.**



26

Los primeros callos.



En los primeros 5 días se lograron visualizar unas pequeñas raíces en el tratamiento con agua ozonizada con 3ppm.

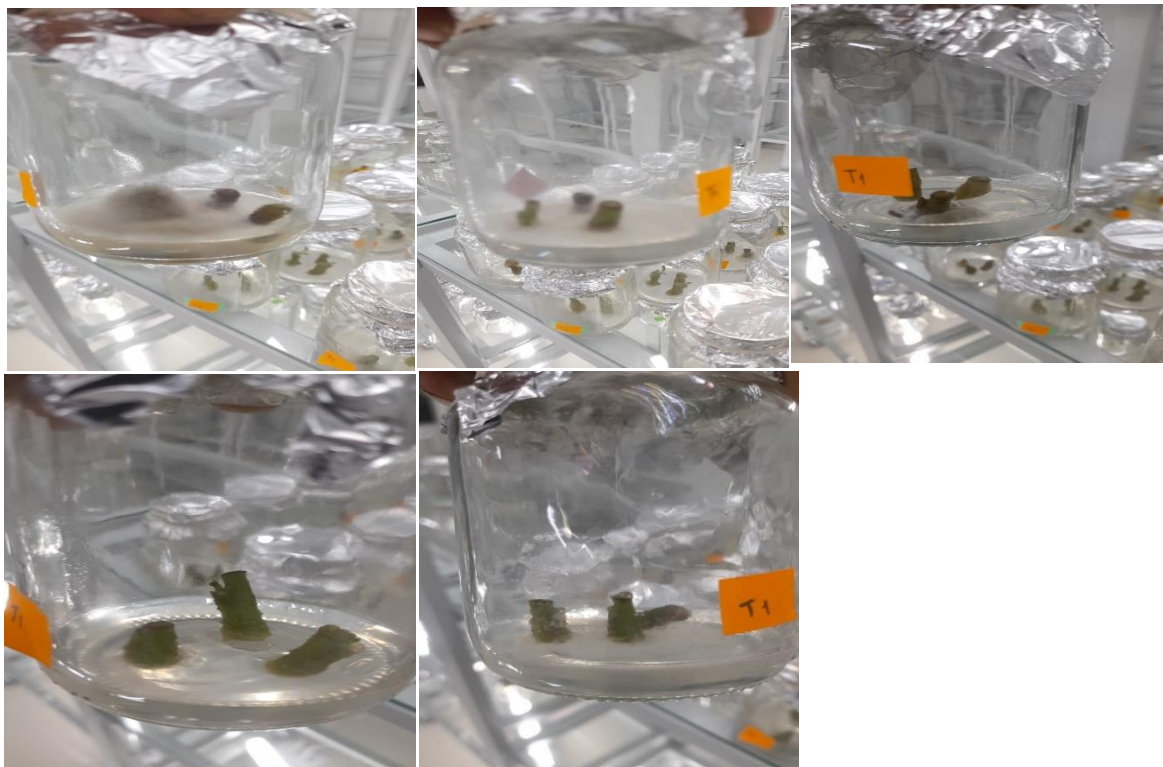


Raicillas.

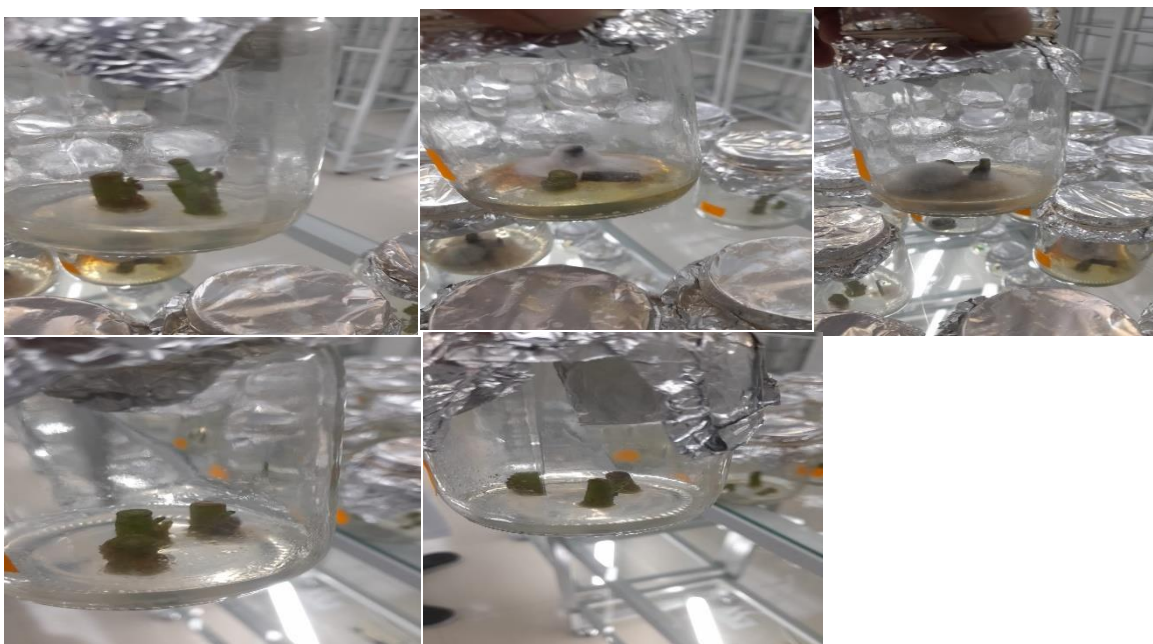


Todos los tratamientos a los primeros 7 días.

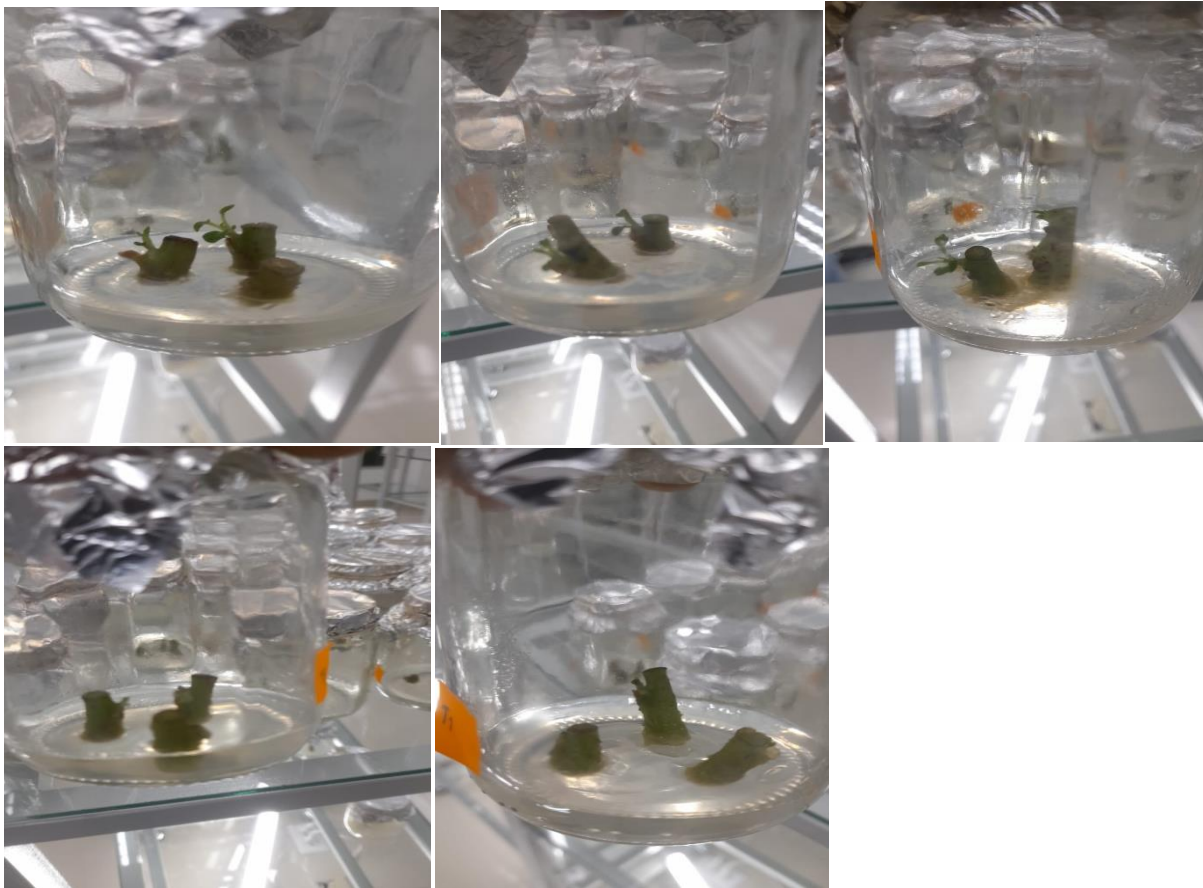
Tratamiento 1 (concentración 1 ppm).



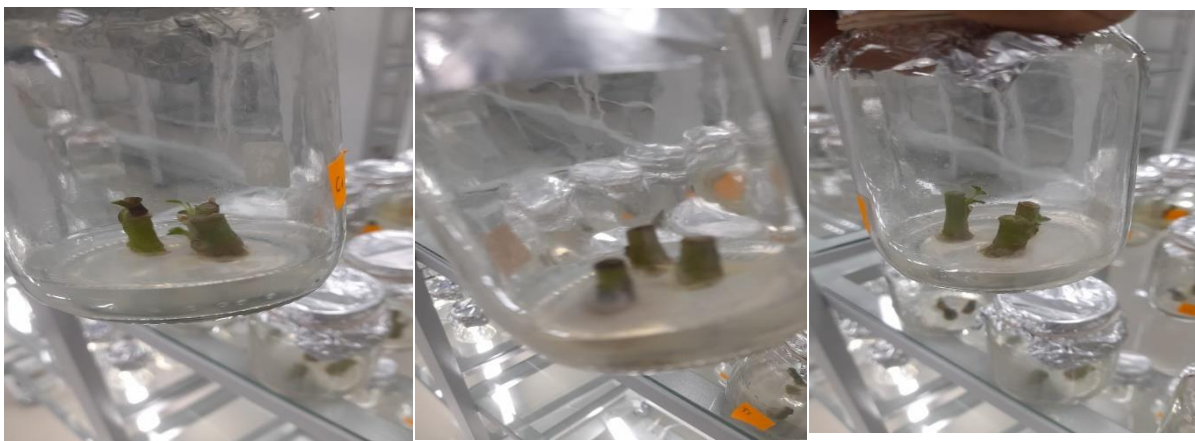
Tratamiento 2 (concentración 2ppm).



Tratamiento 3(concentración 3ppm).

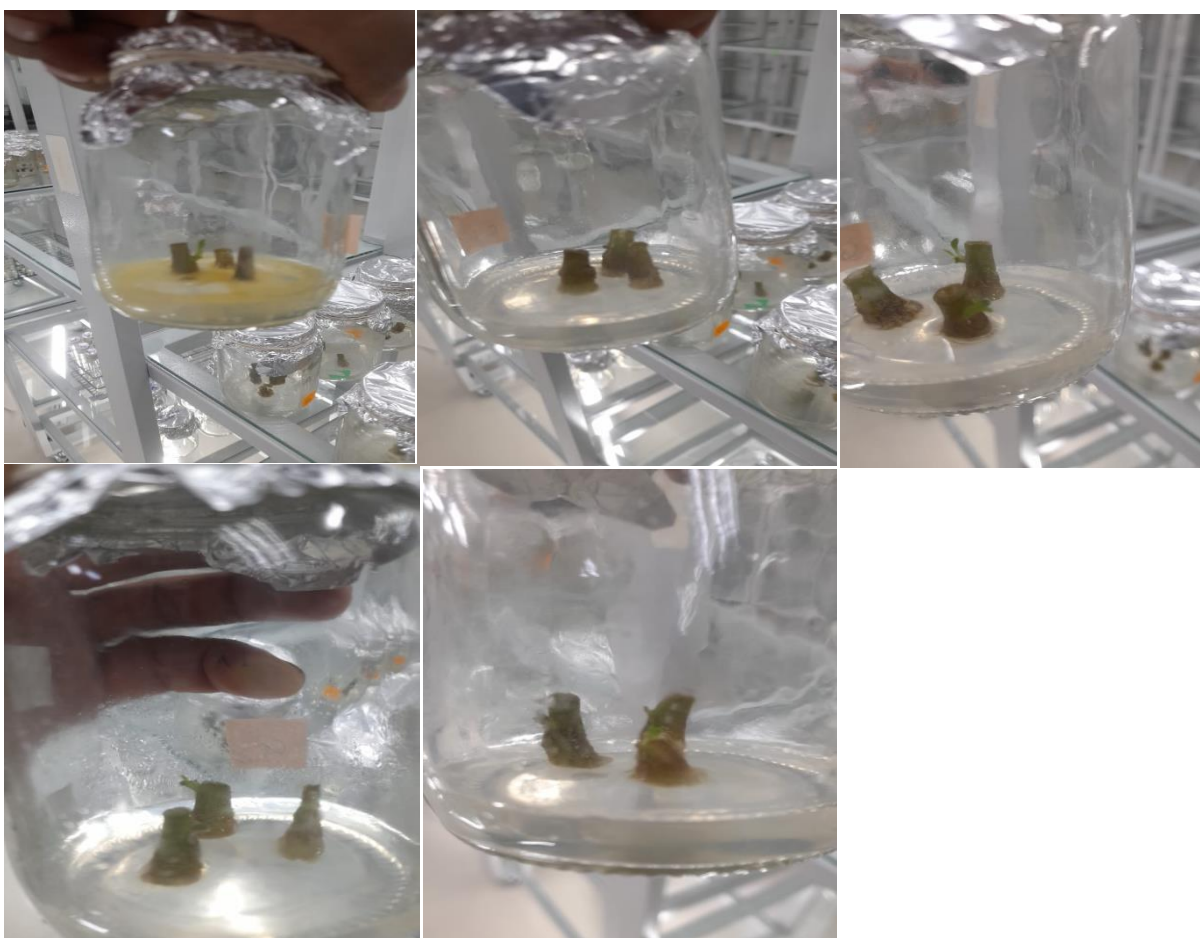


Clagua desionizada estéril.





C2 hipoclorito al 3%.

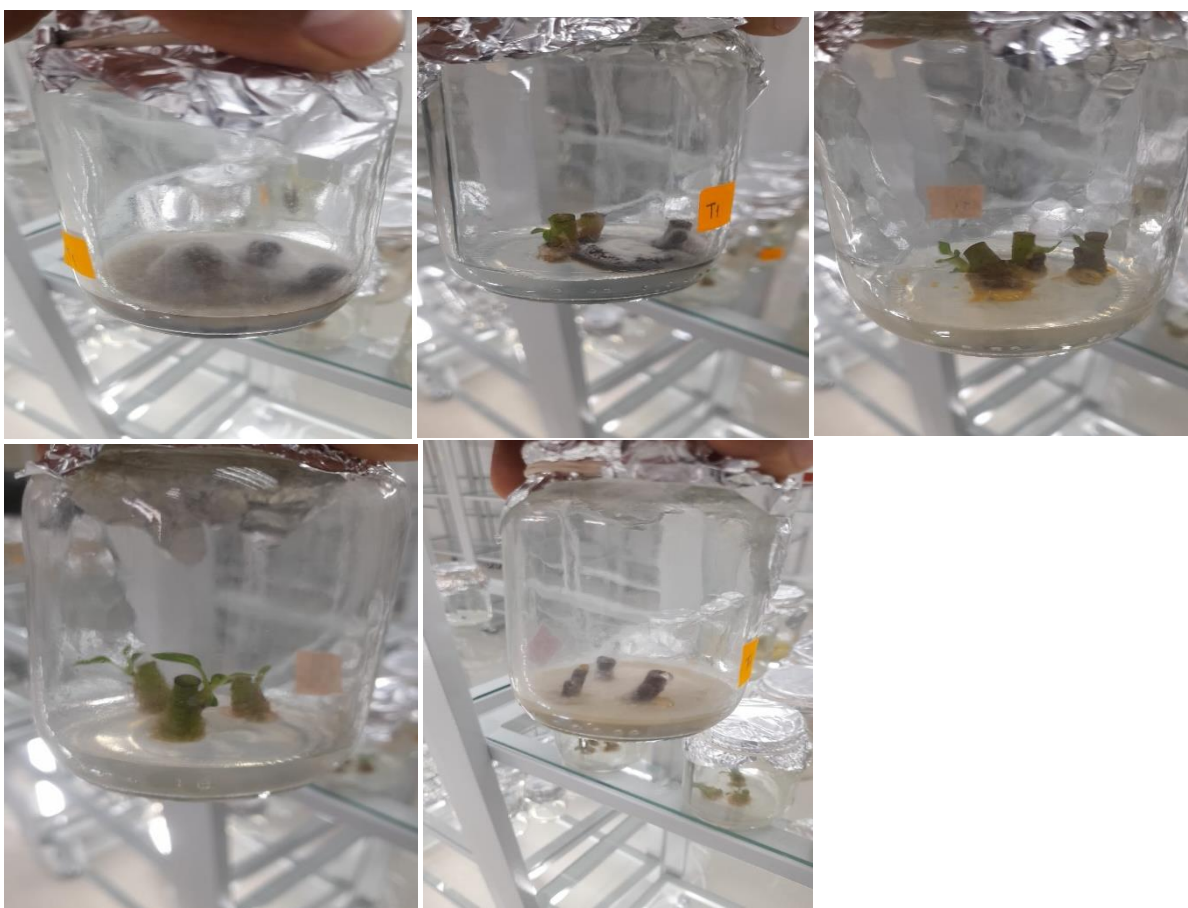


Presencia de callo.

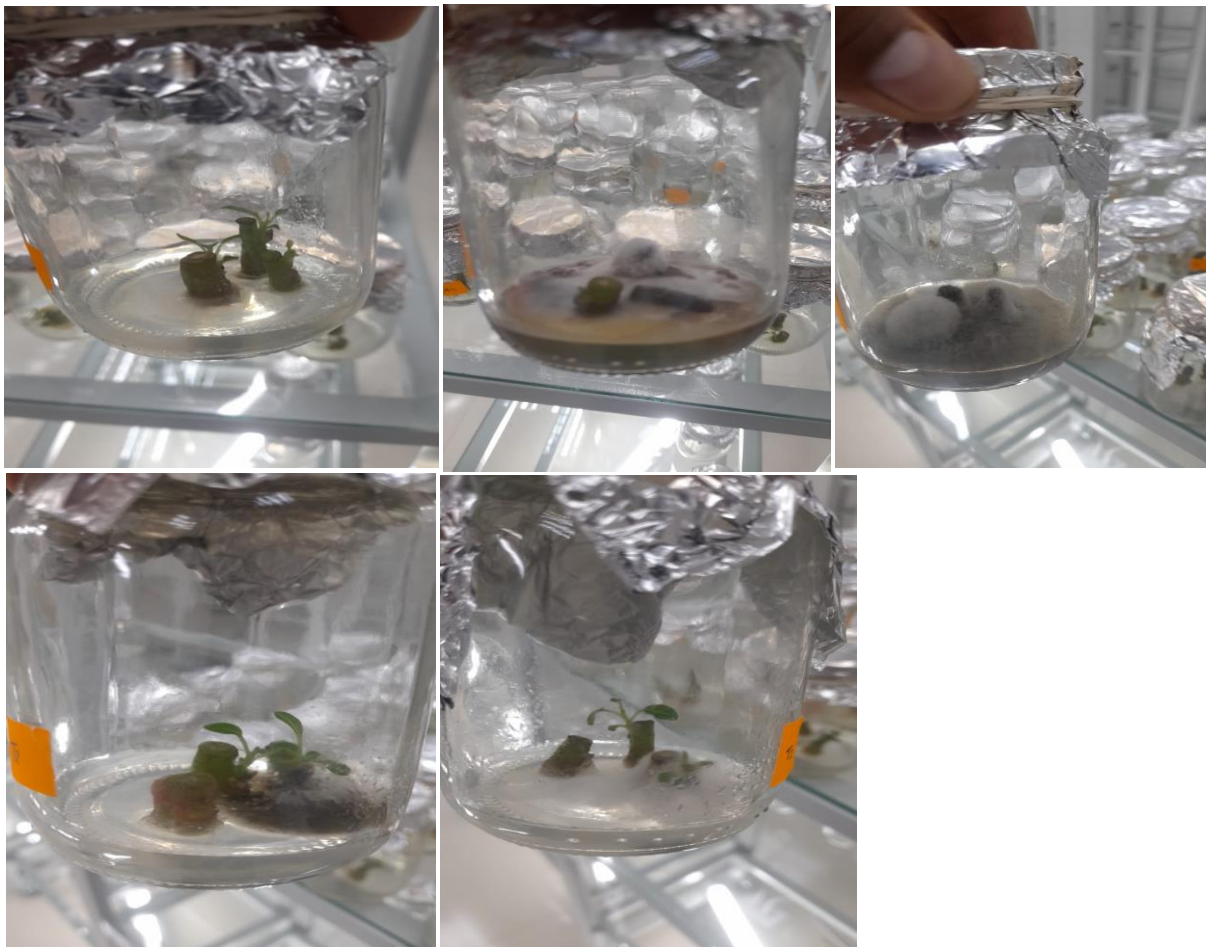


Fotografías a las 15 semanas de haber pasado el cultivo.

Tratamiento 1 (concentración 1ppm).



Tratamiento 2 (concentración 2ppm).

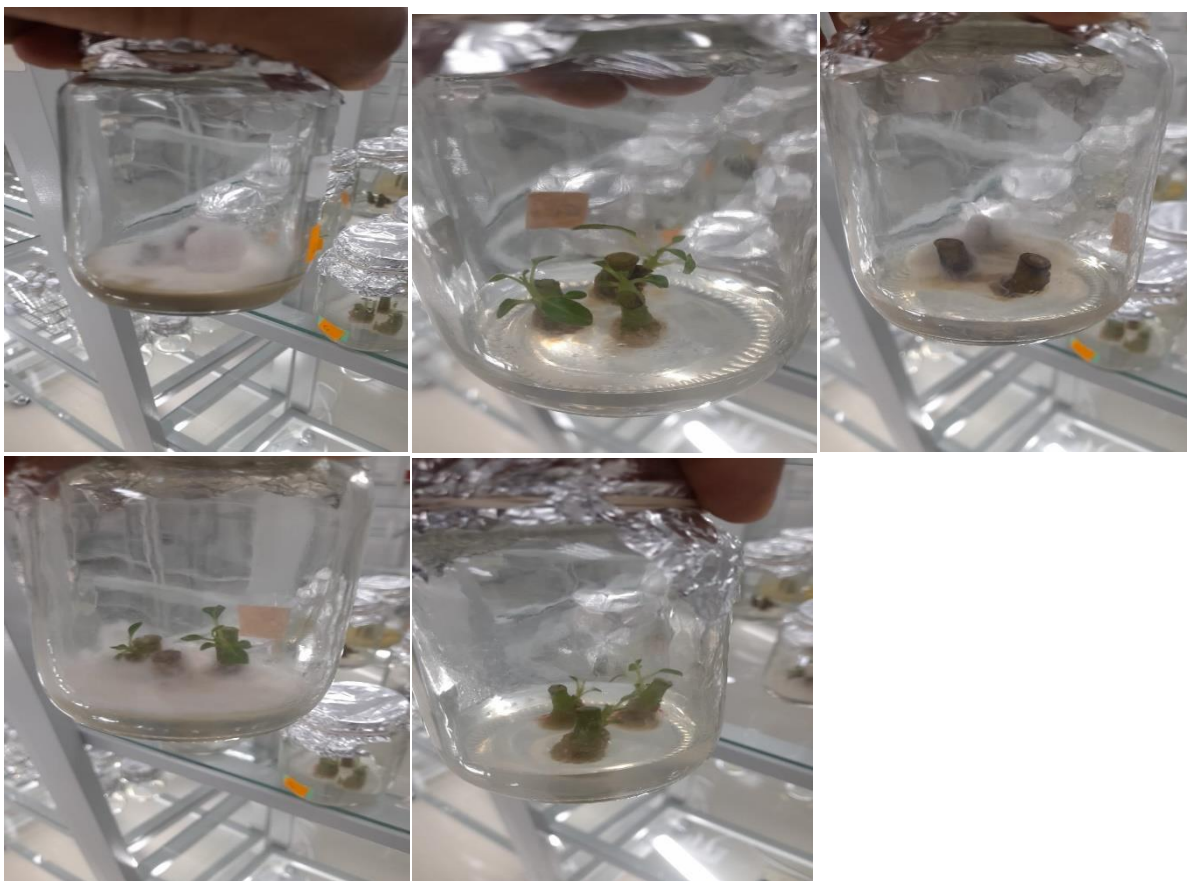


Tratamiento 3 (concentración 3ppm).

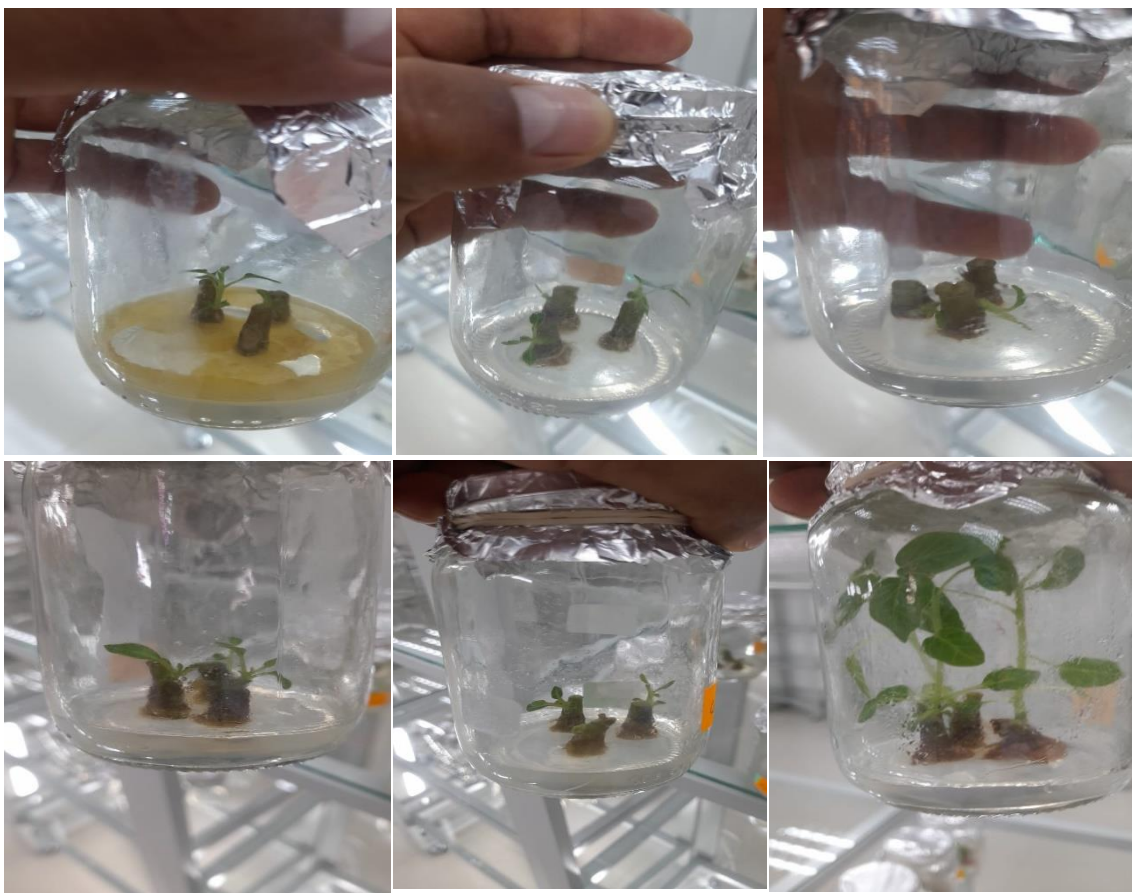




C1 agua desionizada estéril.

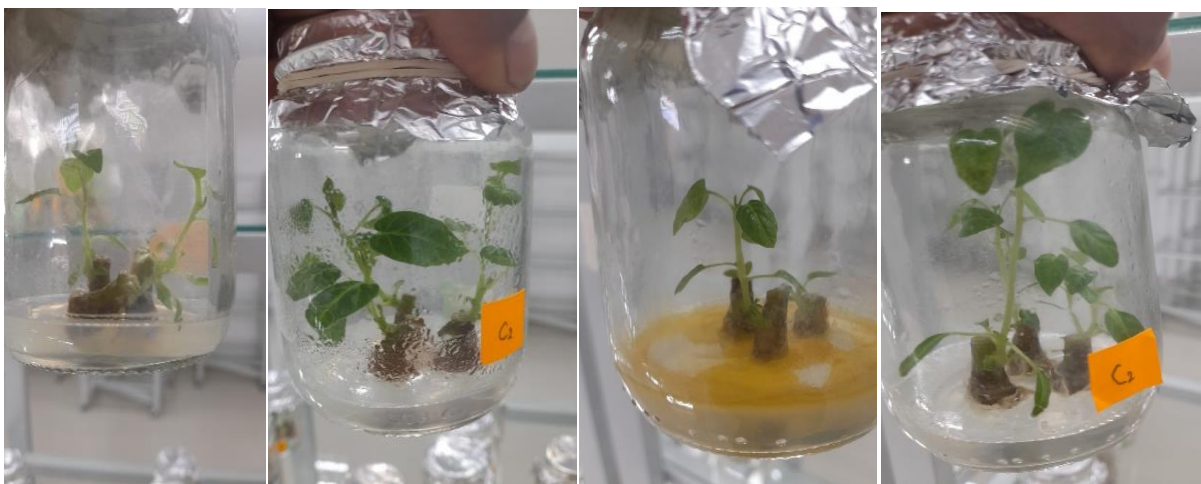


C2 hipoclorito al 3%.



Fotografías a los 21 días.

Testigo C2 hipoclorito al 3%.



C1 agua desionizada estéril.



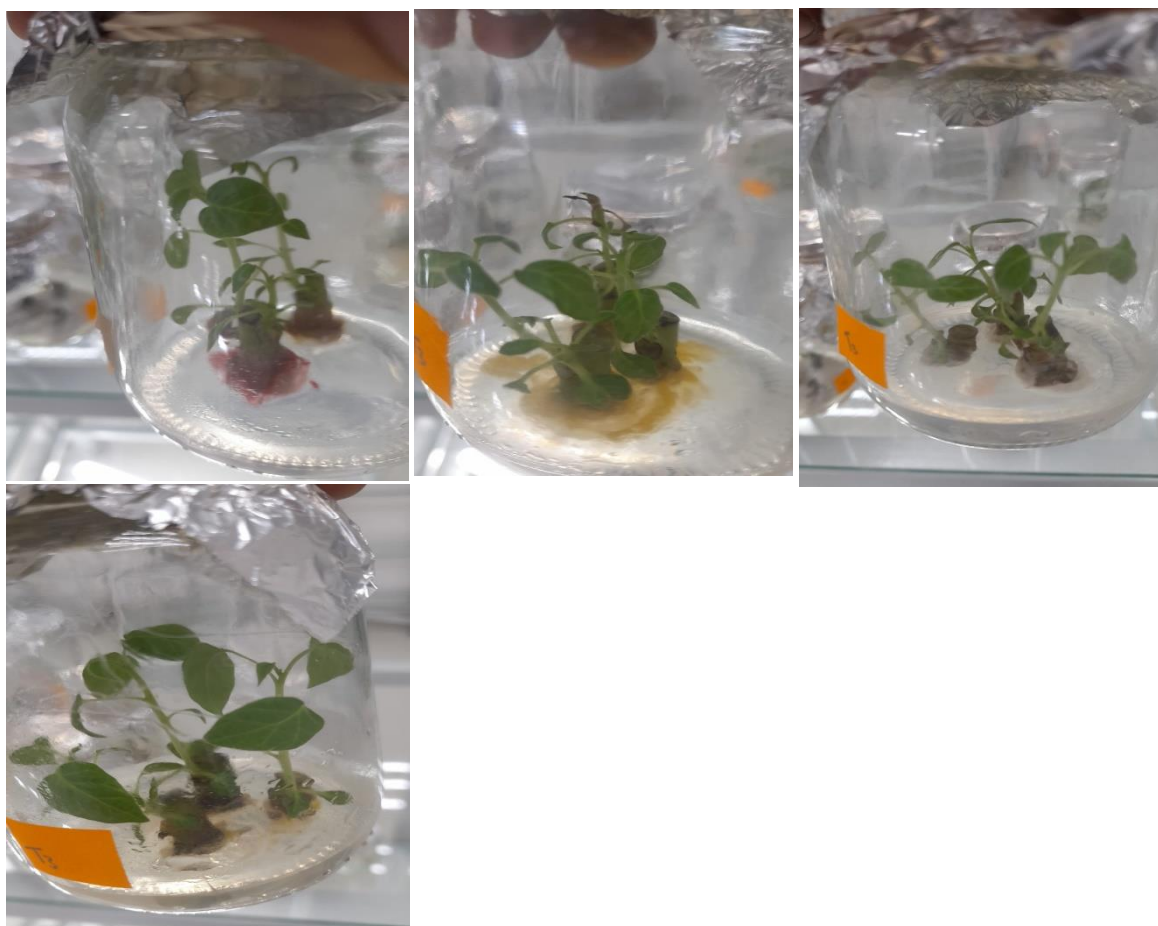
Tratamiento 1 (concentración 1 ppm).



Tratamiento 2 (concentración 2 ppm).



Tratamiento 3 (concentración 3ppm).



Fotografías a los 30 días.

C2 hipoclorito al 3%.



C1 agua desionizada estéril.



Tratamiento 1 (concentración 1ppm).



Tratamiento 2 (concentración 2ppm).



Tratamiento 3 (concentración 3ppm).



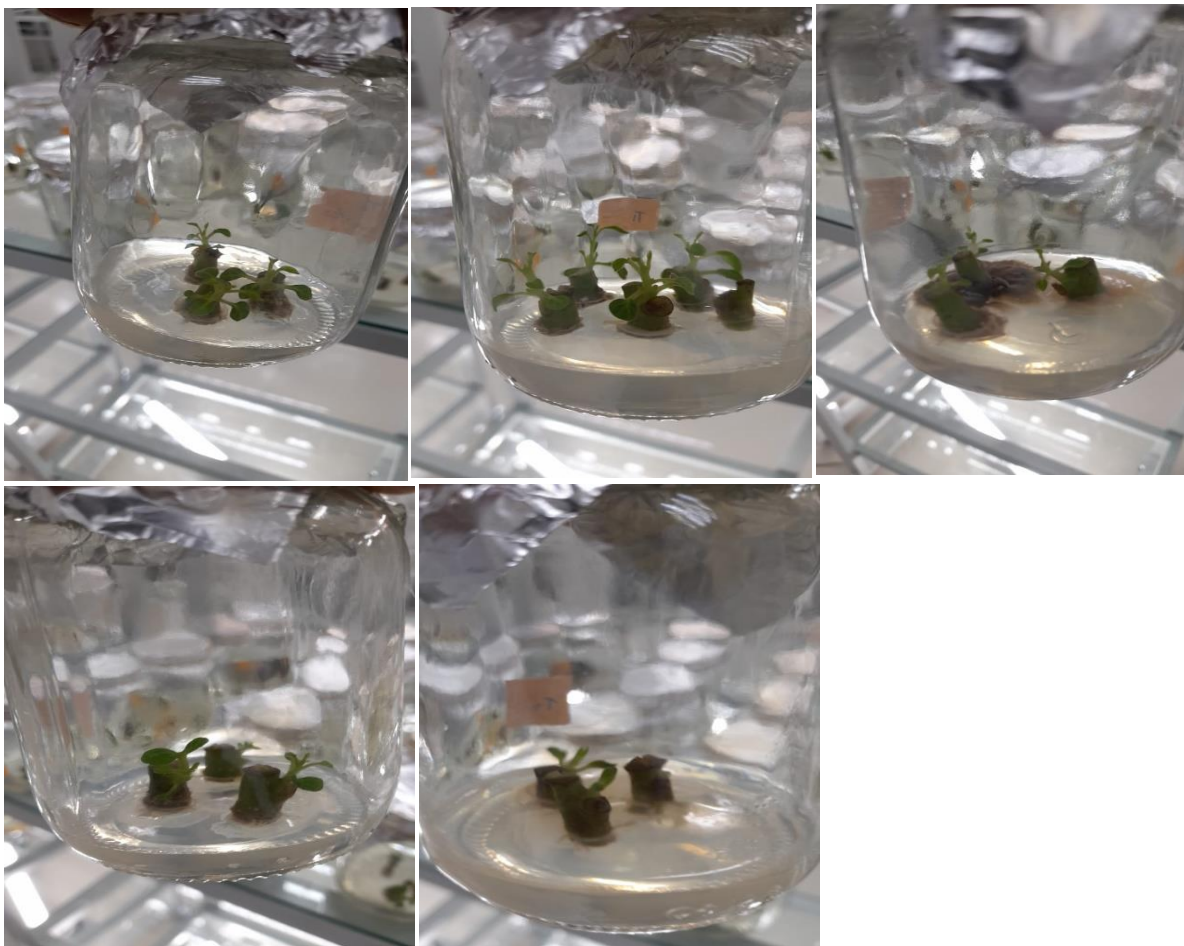
Fotos del tratamiento del hipoclorito al 3% a los 30 días lograron establecerse.



Segundo ensayo que evaluamos el tiempo de inmersión que tenemos 3 tratamientos con un testigo con hipoclorito al 3%.

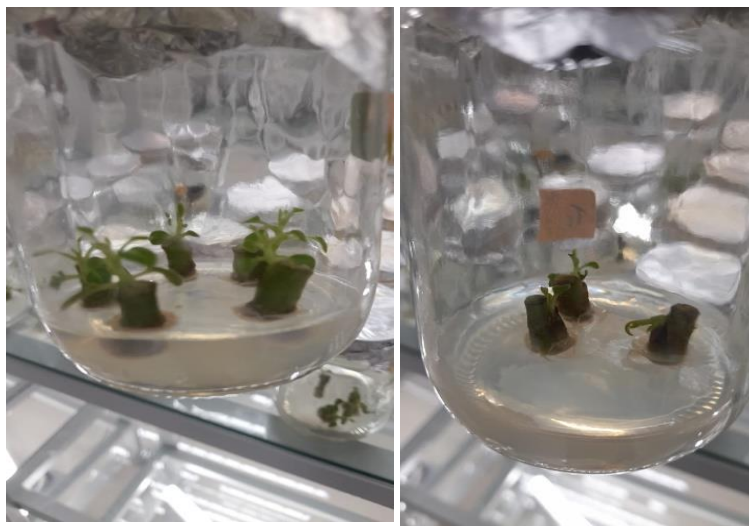
Fotografías a los 7 días.

Tratamiento 1 (tiempo de inmersión 5 minutos).

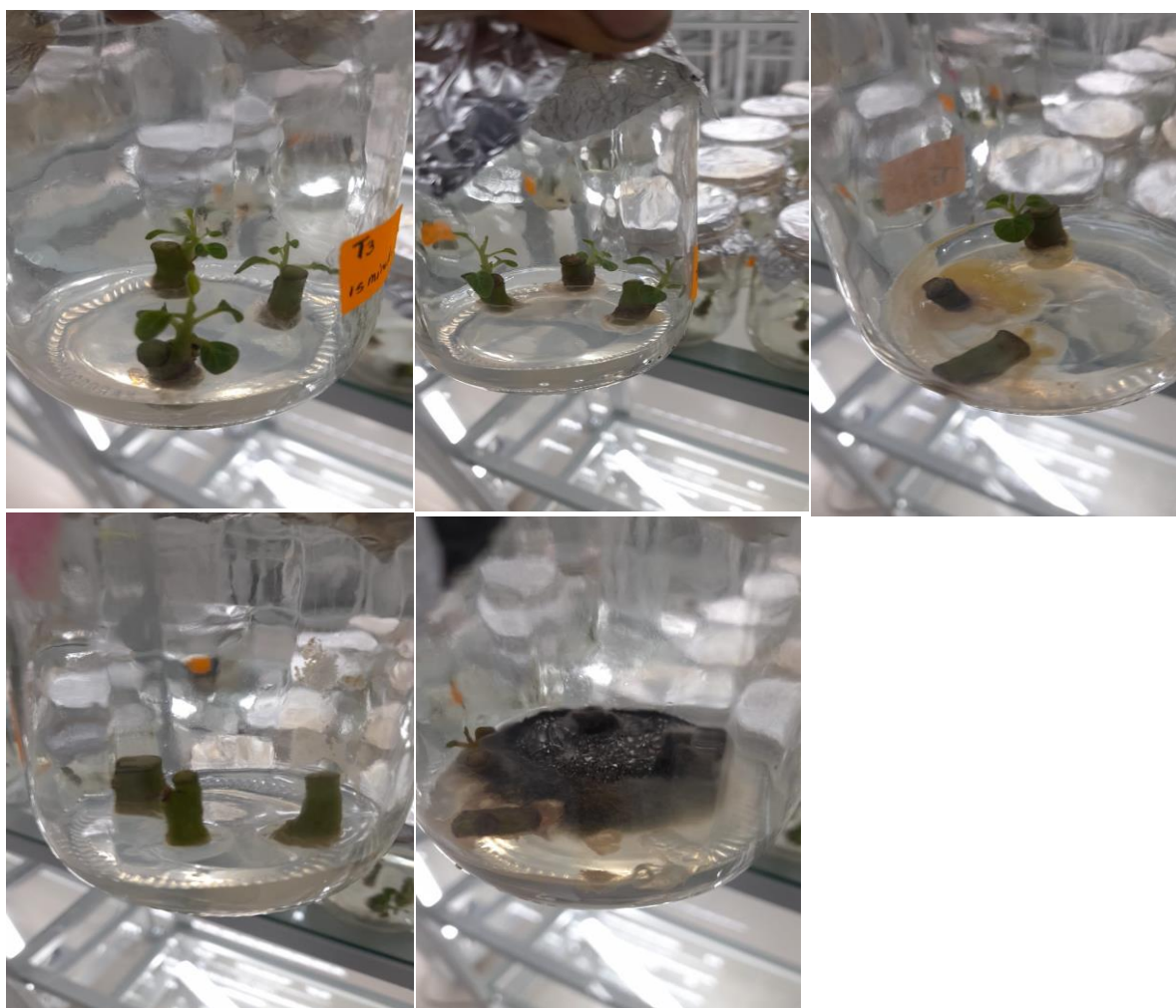


Tratamiento 2 (tiempo de inmersión 10 minutos).

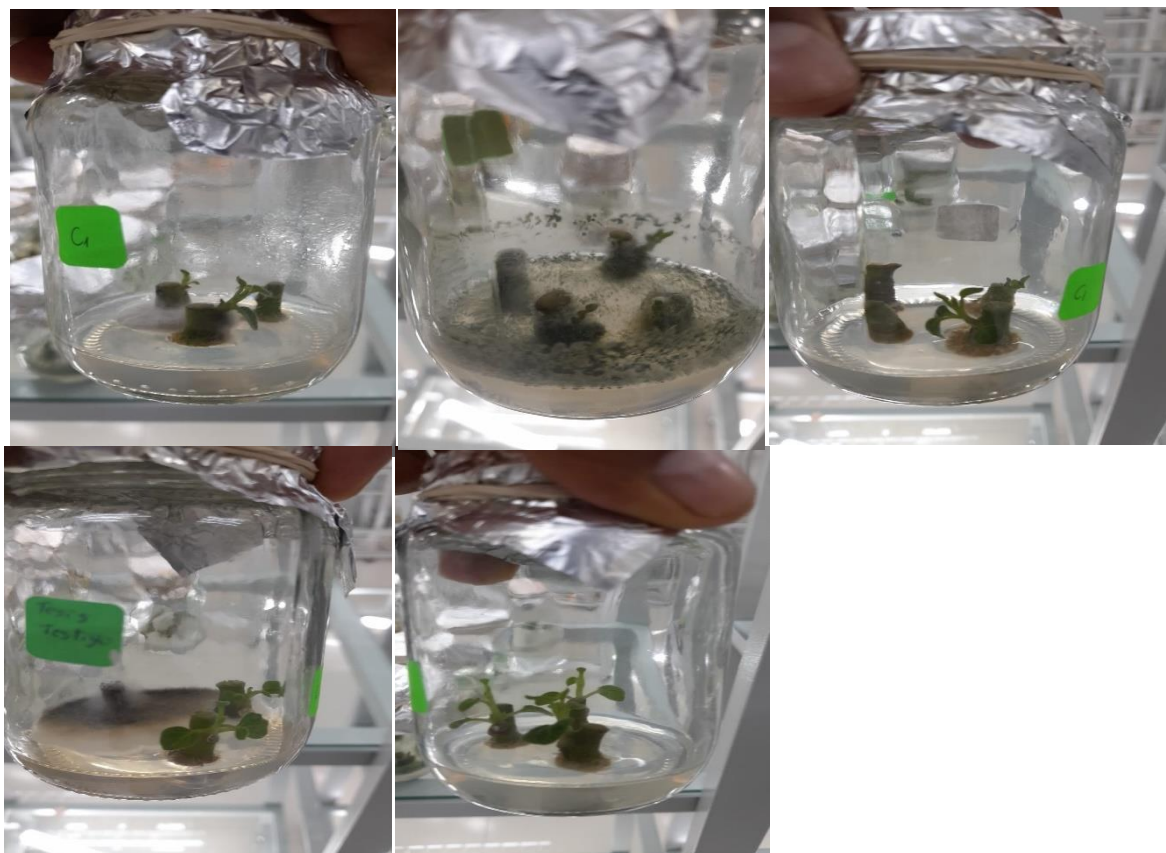




Tratamiento 3 (tiempo de inmersión 15 minutos).



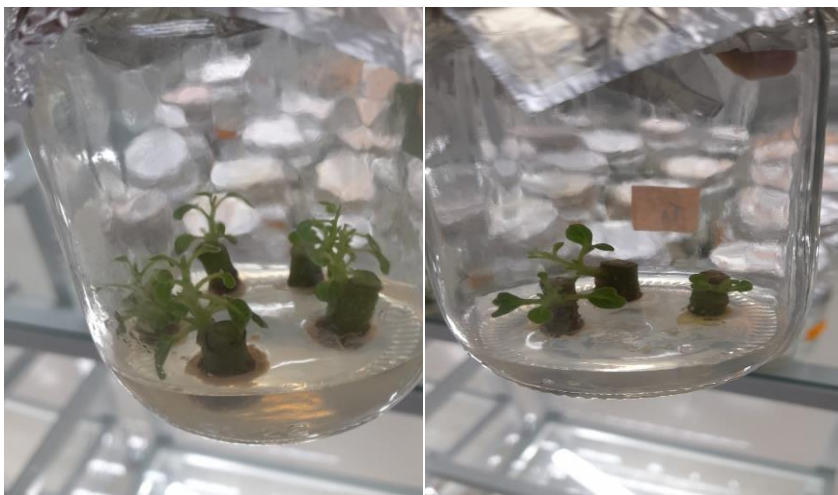
Testigo hipoclorito sin tiempo de inmersión.



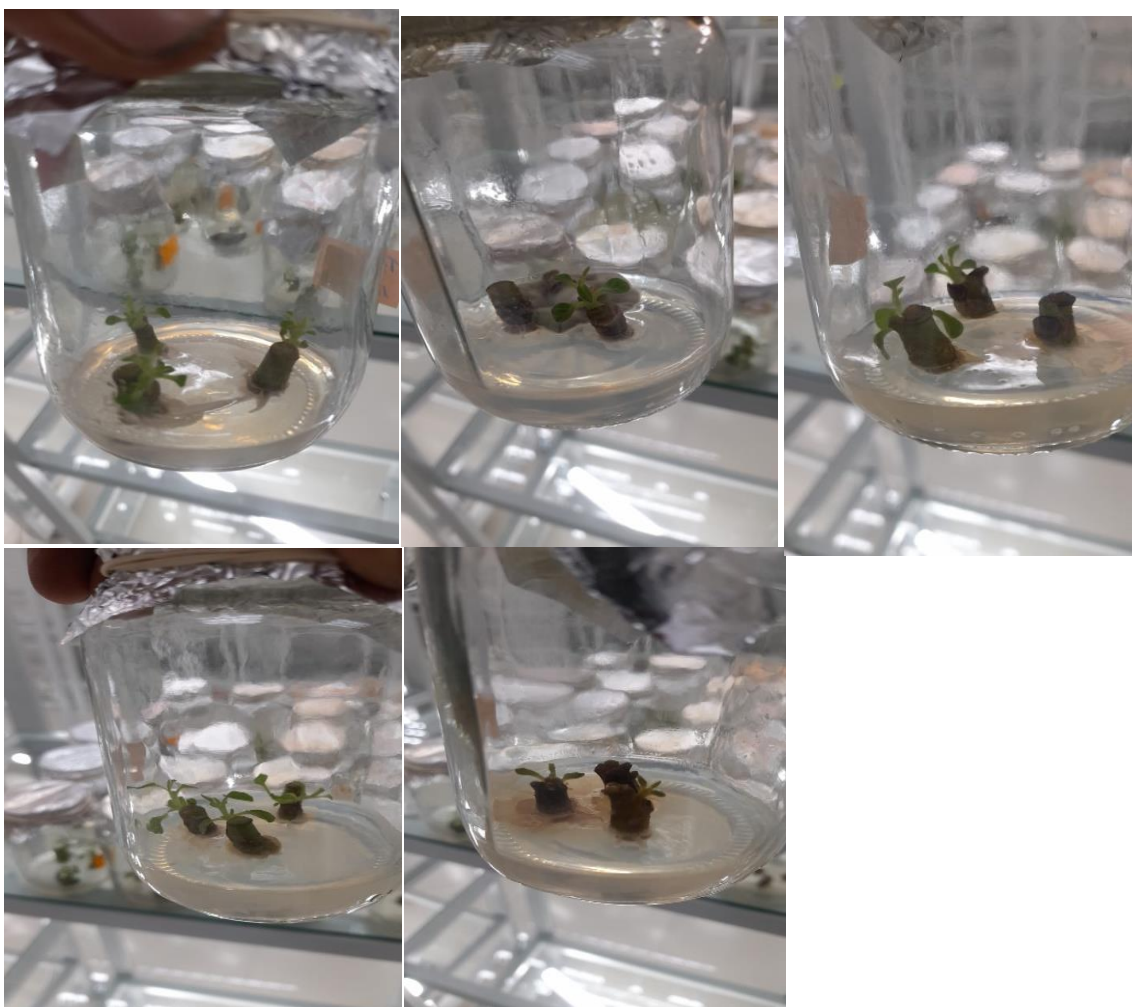
Fotografías a los 15 días.

Tratamiento 1 (tiempo de inmersión 5 minutos).





Tratamiento 2 (tiempo de inmersión 10 minutos).



Tratamiento 3 (tiempo de inmersión 15 minutos).

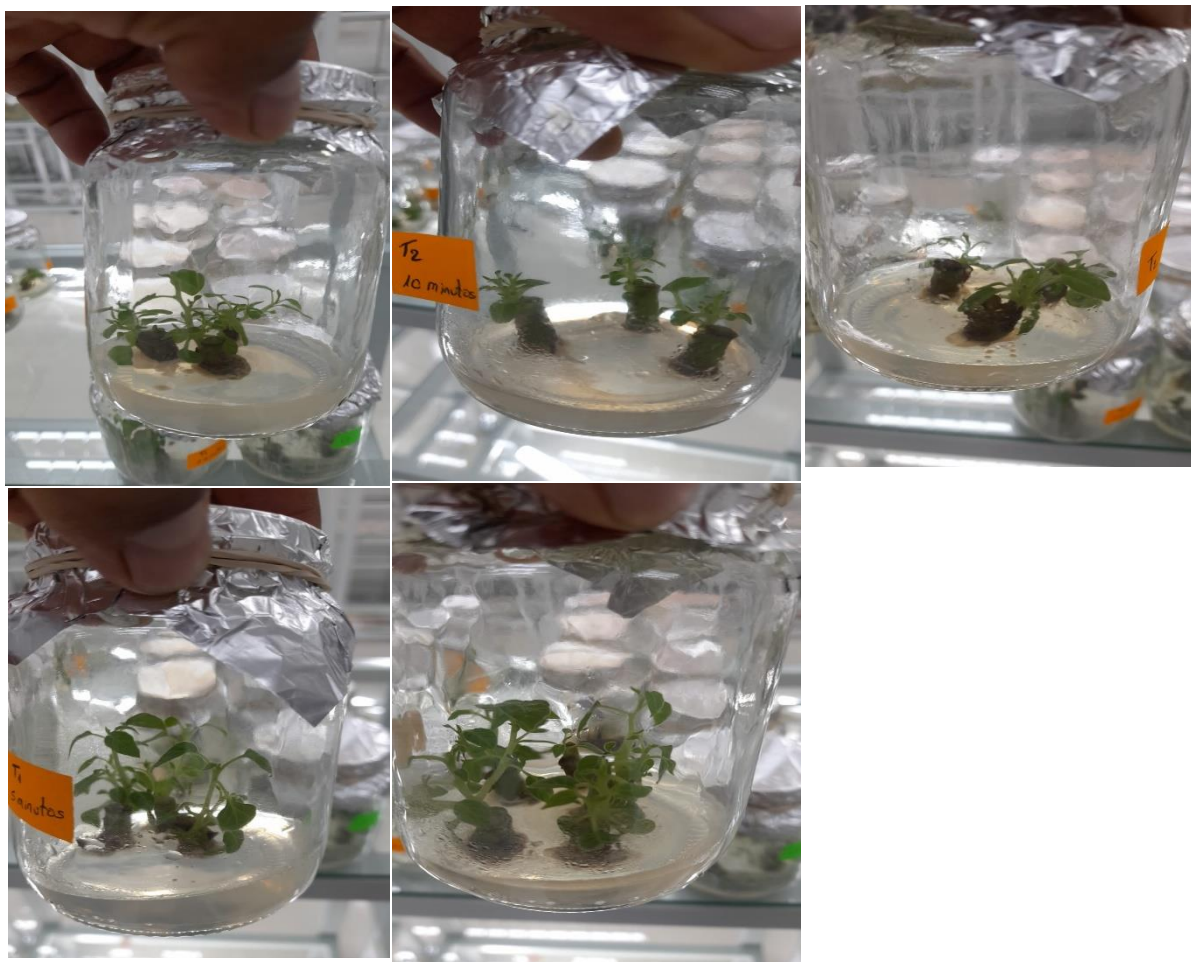


Fotografías a los 21 días

Tratamiento T1(5 minutos de inmersión)



Tratamiento 2 (10 minutos de inmersión).

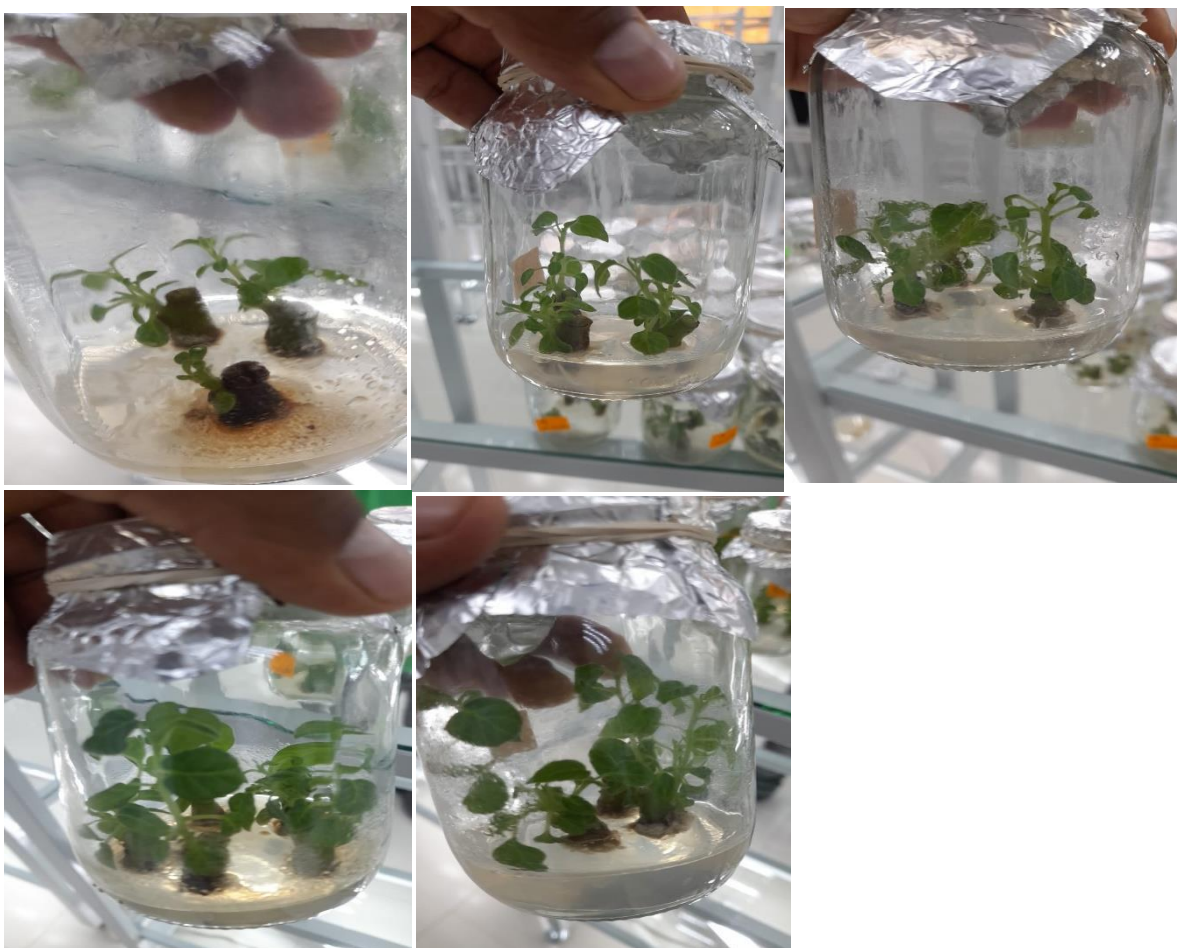


Tratamiento 3 (15 minutos de inmersión)



Fotografías a los 30 días.

Tratamiento 1(5 minutos de tiempo de inmersión).



Tratamiento 2(10 minutos de inmersión).



Tratamiento 3 (15 minutos de inmersión).



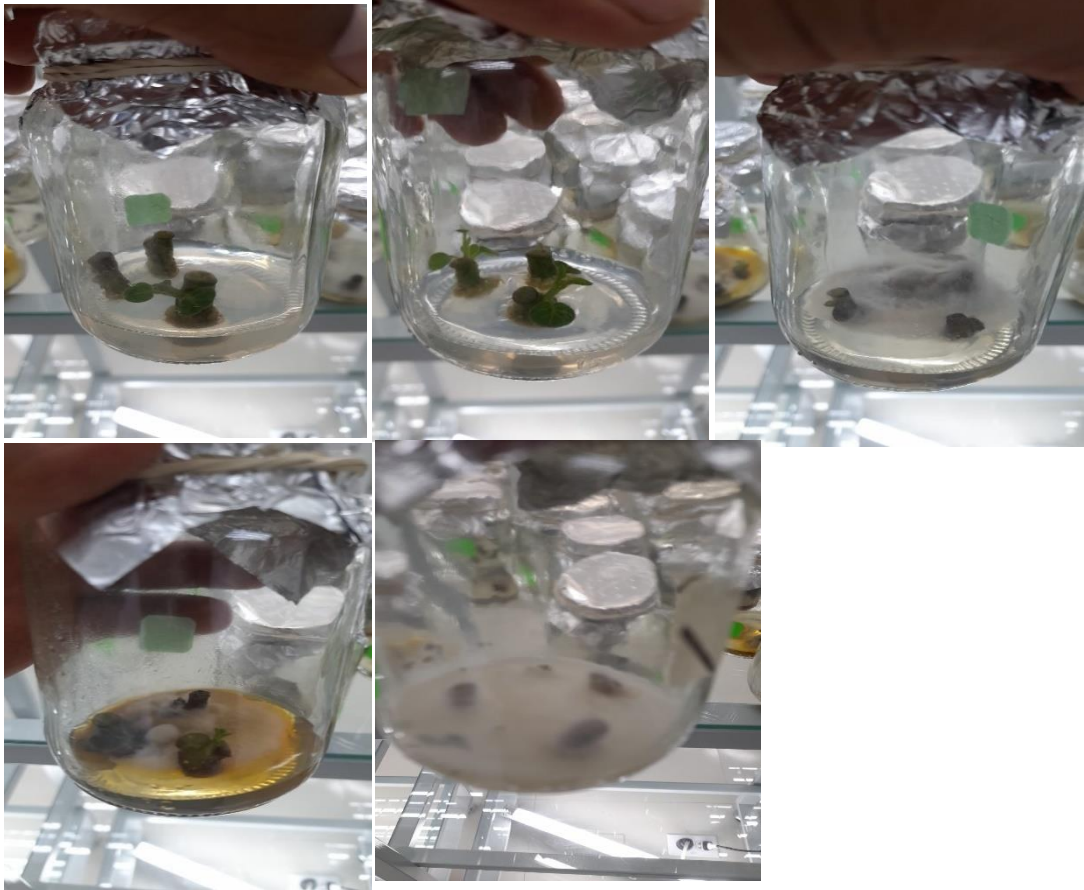
Testigo

A los 30 días.



Tercer ensayo evaluamos longitud.

Tratamiento 1 (1 cm de longitud).

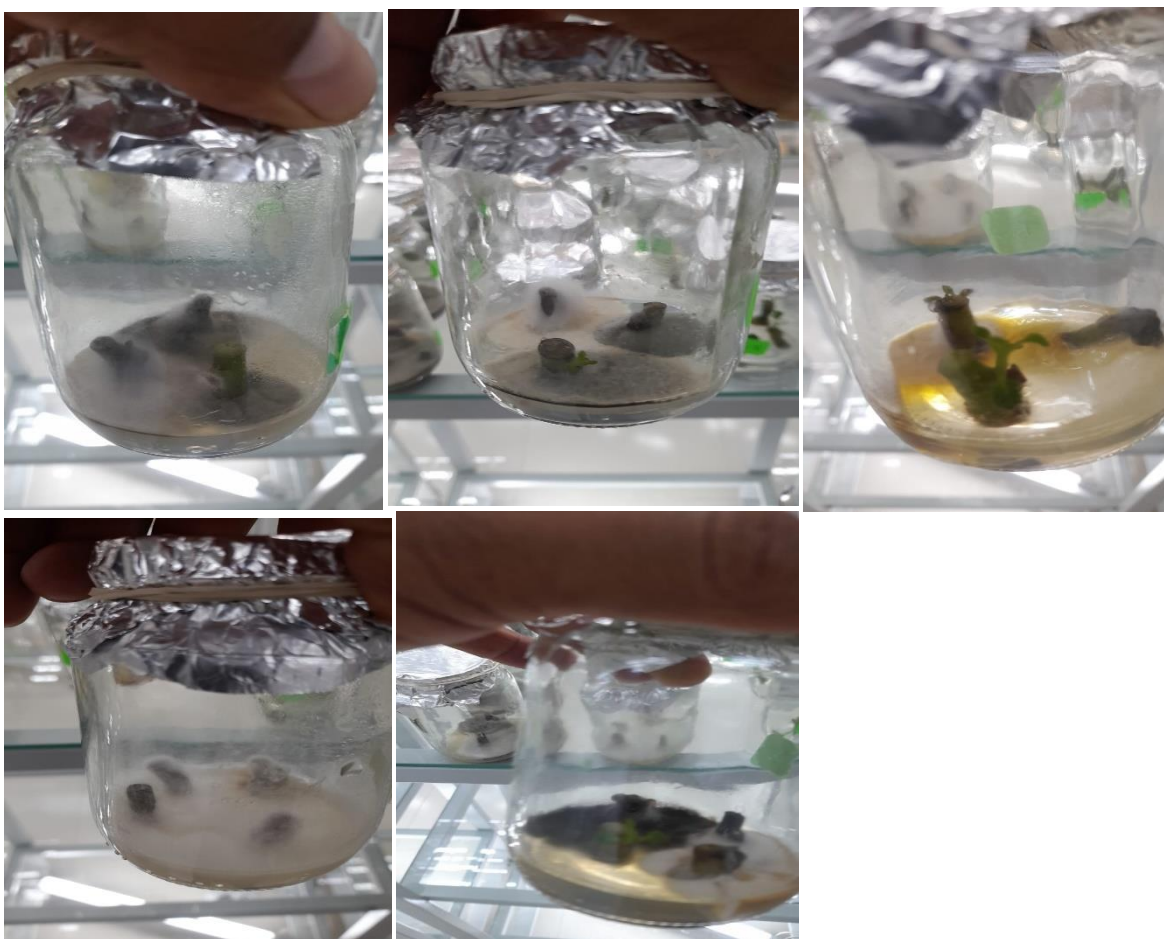


Tratamiento 2(1.5 cm longitud).

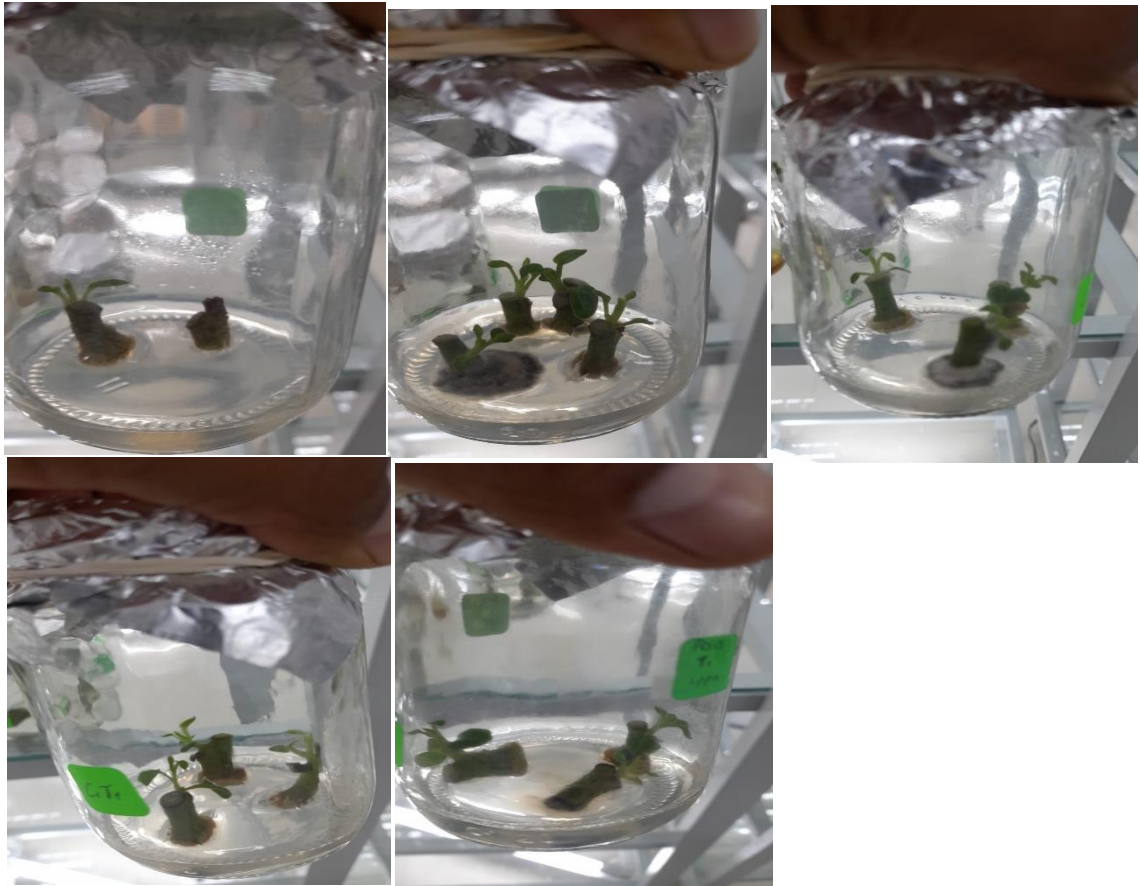




Tratamiento 3(2cm de longitud).



Testigo hipoclorito



A los 30 días solo lograron sobrevivir con hipoclorito 3%.

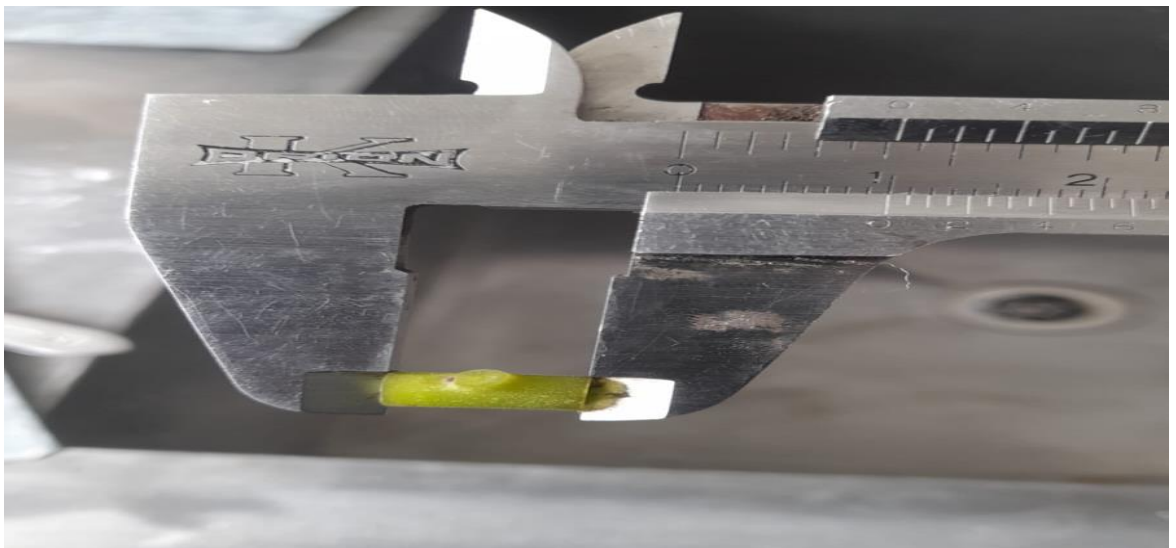




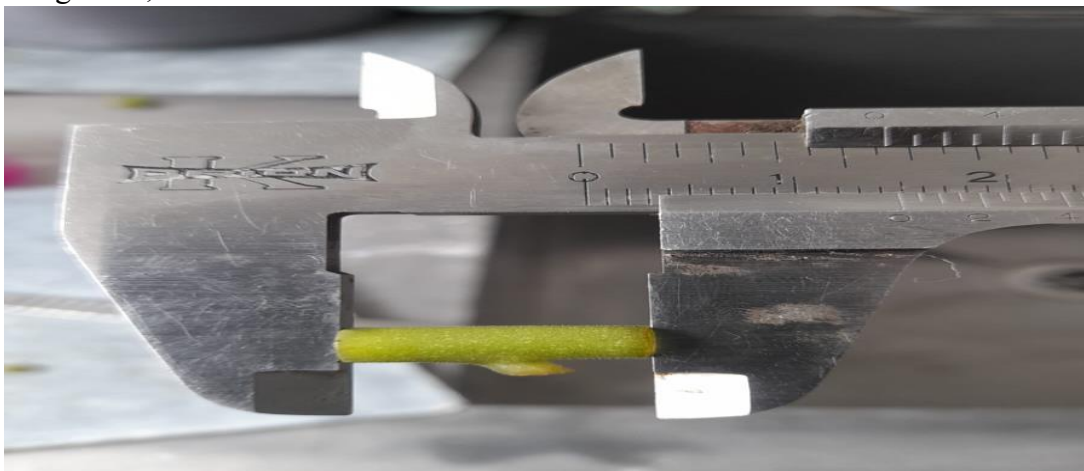
Evidencia:



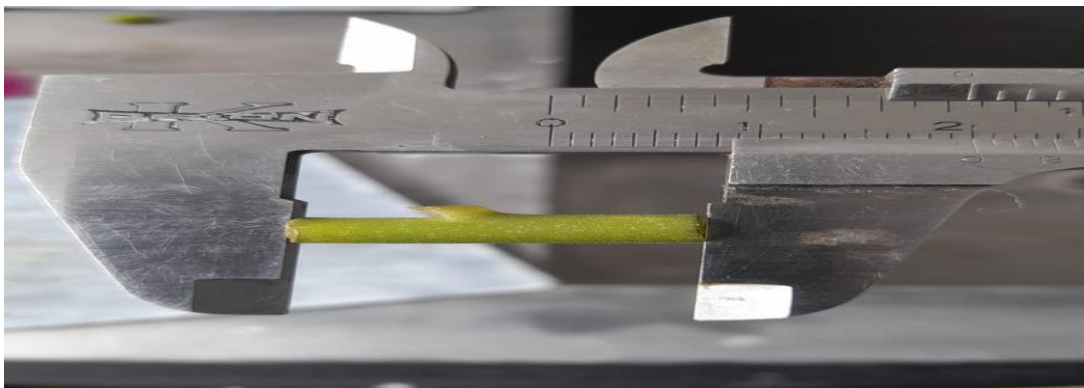
longitud 1cm



Longitud 1,5cm

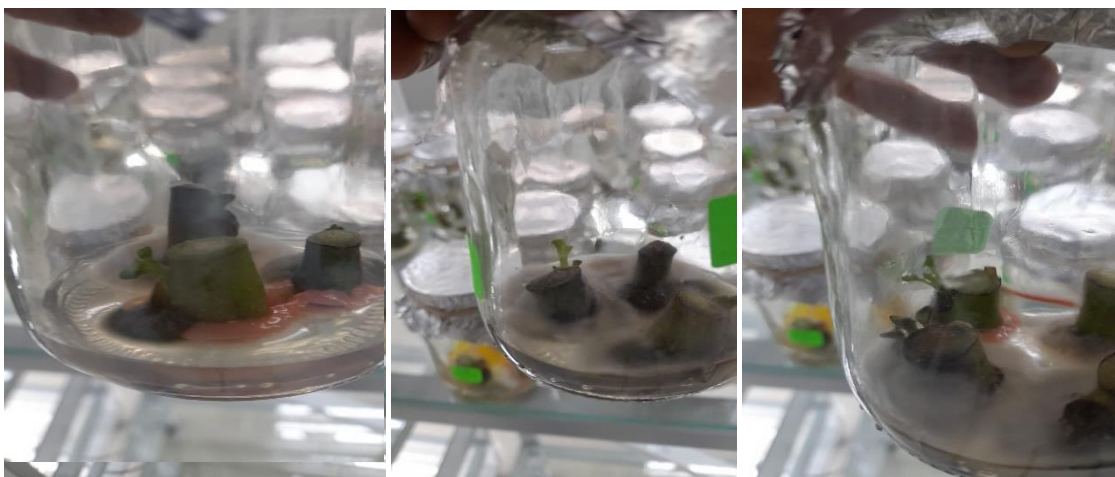


longitud 2cm



Cuarto ensayo grosor

Tratamiento 1 (1cm grosor).

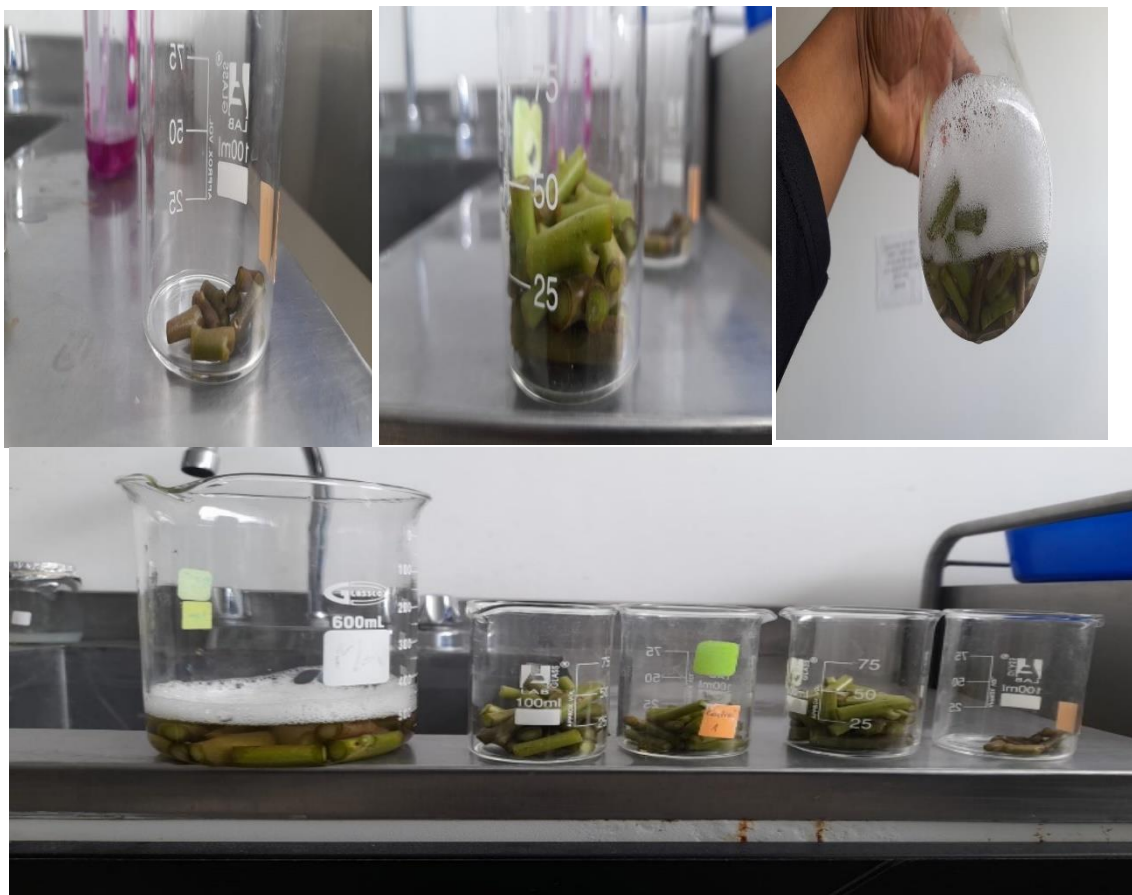




Todos los tratamientos son similares aquí tenemos los resultados de grosor a los 3 días.



Grosor



grosos de (0,5cm, 0,75cm, 1cm).

