

Universidad, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Efecto de Reguladores de Crecimiento 6-Bencilaminopurina y Ácido
naftaleneacético en la multiplicación in *Vitro* de Tabaco (*Nicotiana
tabacum L.*) Variedad Habana 2000**

Estudiante

Francisco Amilcar Zavala Hernandez

Asesores

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthya Martínez, MAE

Honduras, noviembre 2025

Autoridades

KEITH L. ANDREWS

Rector a.i.

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

JULIO NAVARRO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Anexos	6
Resumen.....	7
Abstract	8
Introducción	9
Materiales y Métodos	12
Localización del Estudio.....	12
Desinfección del Material Vegetal para el Establecimiento.....	12
Medio de Cultivo para la Etapa de Multiplicación	13
Incubación	14
Tratamientos	14
Variables Evaluadas.....	15
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	15
Resultados y Discusión	16
Conclusión	21
Recomendación.....	22
Referencias.....	23
Anexos.....	25

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la multiplicación in vitro tabaco (Nicotiana tabacum) variedad Habana 2000.....	14
Cuadro 2 Efecto de reguladores de crecimiento en el promedio de número de brotes por explante en vitroplantas de tabaco variedad Habana 2000 a los 15, 18 y 35 días después de transferencia, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en la Universidad Zamorano.	16

Índice de Figuras

Figura 1 Plántula de tabaco en fase de multiplicación que se usó para el experimento de evaluación del efecto de reguladores de crecimiento, en la Universidad Zamorano.	13
Figura 2 Brotes de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo suplementado con BAP y ANA a los 15 días, en la Universidad Zamorano.....	18
Figura 3 Brotes de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo suplementado con BAP + ANA a los 28 días, en la Universidad Zamorano.	19
Figura 4 Brotes de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo suplementado con BAP + ANA a los 35 días, en la Universidad Zamorano.	20

Índice de Anexos

Anexo A Cronograma de actividades25

Resumen

Este estudio evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 1-naftalenoacético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) variedad Habana 2000. El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Zamorano, Honduras, empleando el medio Murashige y Skoog (MS) modificado. Se probaron tres tratamientos: BAP 0.5 + ANA 0.05, BAP 1.0 + ANA 0.1 y BAP 2.0 + ANA 0.2 mg/L, con 50 repeticiones por tratamiento, bajo un diseño completamente al azar. Se cuantificó el número de brotes por explante a los 15, 28 y 35 días después de la siembra. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, siendo el tratamiento BAP 1.0 + ANA 0.1, el que mejor resultados dio, con un promedio de 5.05 brotes por explante al día 35. Este tratamiento superó las concentraciones menores y mayores, demostrando que el equilibrio adecuado entre citoquinina y auxina es determinante para la organogénesis y proliferación de brotes. Se concluye que el uso combinado de BAP 1.0 mg/L y ANA 0.1 mg/L optimiza la micropropagación del tabaco, mejorando la eficiencia del proceso y reduciendo los tiempos de multiplicación.

Palabras clave: ácido naftalenacético, 6-benziladenina, micropropagación, *Nicotiana tabacum*, reguladores de crecimiento vegetal.

Abstract

The study evaluated the effect of the growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA) on the in vitro multiplication of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Habana 2000. The experiment was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory of Zamorano University, Honduras, using a modified Murashige and Skoog (MS) medium. Three treatments were tested: BAP 0.5 + NAA 0.05, BAP 1.0 + NAA 0.1, and BAP 2.0 + NAA 0.2 mg/L, with 50 replicates per treatment under a completely randomized design. The number of shoots per explant was recorded at 15, 28, and 35 days after transfer. Significant differences ($p < 0.05$) were observed among treatments, with BAP 1.0 + NAA 0.1 showing the highest mean of 5.05 shoots per explant at 35 days. This combination outperformed lower and higher concentrations, confirming that a balanced cytokinin–auxin ratio is crucial for organogenesis and shoot proliferation. It is concluded that the combination of BAP 1.0 mg/L and NAA 0.1 mg/L optimizes tobacco micropropagation, enhancing efficiency and reducing multiplication time.

Keywords: benzylaminopurine, micropropagation, naphthylacetic acid, *Nicotiana tabacum*, plant growth regulators.

Introducción

El tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas. Su origen se ubica en la región andina principalmente en Bolivia, Perú y Ecuador; con una distribución geográfica en América Central, América del Norte y las Islas Canarias. El tabaco es una planta anual que en óptimas condiciones puede durar mucho tiempo, en este género existen diversas especies con diferencias entre sí; incluso dentro de la misma especie *N. tabacum L.*, se encuentra diversos tipos de tabaco y variedades con diferencias y es por lo que se considera una especie polimorfa (Castro Hurtado, 2021).

El cultivo del tabaco es altamente sensible a diversos factores que integran el medio donde se cultiva, estos factores edafoclimáticos son: clima, heliofanía, requerimiento hídrico, humedad y suelo. La temperatura óptima es entre 18°C y 28°C, es muy susceptible a la humedad el exceso de agua en el suelo puede afectar en su desarrollo. Los mejores suelos para la plantación de tabaco son arcillosos o francos, profundos, no encharcados y fértiles; el pH 6.5 - 7.0 para los tabacos de hoja clara, mientras para los tabacos de hoja oscura el pH 7.0 - 7.5; En cuanto a la luz, una alta intensidad solar disminuye el tamaño de las hojas y aumenta su grosor. La raíz de la planta es fibrosa y poca profunda encontrándose el 80% en los primeros 30 cm del suelo, aunque puede extenderse hasta los 50 cm. En las raicillas juveniles se sintetiza la nicotina, que luego se almacena en la hoja. El tallo es leñoso o herbáceo según la zona próxima al suelo, de forma delgada y erguida que puede alcanzar una altura de 1 a 3 m. Las hojas son enteras y sustitutivas y la morfología varía según su variedad (Arteaga Ledezma, 2023).

El número de hojas oscila entre 14 y 20 por planta, dependiendo tanto de la variedad como las condiciones del cultivo. Las hojas tienen un ancho de 0.25 m a 0.35 m y una longitud que va de 0.40 m a 0.55 m, también en función de la variedad. Para el año 2019 se reporta que los principales productores de tabaco en el mundo son China, seguido de India y Brasil. Este cultivo presenta un ciclo de vida que varía entre 55 y 78 días según la variedad (Castro Hurtado, 2021).

El tabaco es uno de los cultivos no alimentarios con mayor impacto económica a nivel global. Se siembra en superficies que varían desde pequeños lotes hasta grandes extensiones, siempre en suelos bien drenados y climas templados o tropicales. La planta produce hojas que, tras un proceso de curado, se emplean en la elaboración de múltiples productos de tabaco consumidos a nivel mundial. En Nicaragua, Honduras, República Dominicana y Estados Unidos, es un producto de mucha importancia desde la producción hasta su comercialización debido que este es generador de empleos directos e indirectos siendo beneficiados las familias del sector donde este rubro significa su principal medio de subsistencia (Sánchez Membreño, 2019).

La propagación del tabaco se realiza principalmente a través de semillas, comenzando con la siembra en semilleros flotantes o invernaderos controlados para optimizar la germinación, donde las semillas se colocan en bandejas con sustrato hidropónico o suelo fertilizado, manteniendo temperaturas entre 20-30°C y alta humedad para promover el brote en 7-10 días. Posteriormente, las plántulas se trasplantan al campo abierto una vez que alcanzan 10-15 cm de altura, espaciadas en filas para maximizar la exposición solar y el drenaje, con prácticas agronómicas que incluyen fertilización, control de malezas y riego para asegurar el desarrollo de hojas maduras en 3-4 meses, culminando en la cosecha manual o mecánica para usos industriales o comerciales (Michael Eriksen et al., 2015).

La micropropagación del tabaco implica el cultivo *in vitro* de explantes como hojas, cotiledones o segmentos nodales en medios nutritivos estériles, como Murashige y Skoog (MS) suplementado con reguladores de crecimiento, para inducir la formación de callos, brotes y raíces bajo condiciones controladas de luz (16/8 horas fotoperíodo), temperatura (25 ±2°C) y pH (5.7-5.8), permitiendo la regeneración de plantas completas en etapas secuenciales: establecimiento aséptico, proliferación de yemas, enraizamiento y aclimatación *ex vitro* (Taalat et al., 2021)

En tabaco esta herramienta biotecnológica es de gran importancia tanto en la investigación como en la producción comercial de esta especie. Esta técnica permite la propagación rápida y a gran escala de plantas genéticamente uniformes, aspecto esencial para garantizar la homogeneidad en

cultivares mejorados o modificados genéticamente. Además, facilita la multiplicación de líneas que presentan dificultades para propagarse mediante métodos convencionales, optimizando el uso del espacio y reduciendo significativamente los tiempos de producción (Sharry et al., 2015).

Entre los reguladores de crecimiento más empleados en la propagación *in vitro* del tabaco destacan las auxinas como el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolacético (AIA), que promueven la inducción de callos y el enraizamiento al estimular la división celular así como la elongación radicular (Sandhya Suhas Shinde et al., 2021). Estas hormonas actúan sinérgicamente para modular respuestas al estrés osmótico y antioxidante, mejorando la biomasa radicular en fases de aclimatación, y se combinan frecuentemente con sacarosa al 3% para optimizar el metabolismo secundario durante el desarrollo de plántulas (Yu et al., 2023).

También se usan citoquininas como la bencilaminopurina (BAP) y la kinetina (KIN) son ampliamente utilizadas para inducir la proliferación de brotes y la organogénesis en explantes de tabaco, con dosis de 1.0-3.0 mg/L en combinación con auxinas para generar hasta 21 brotes por explante, facilitando la multiplicación clonal rápida y uniforme (Taalat et al., 2021).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la combinación de los reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) en la inducción a organogénesis en explantes foliares de tabaco. La BAP, una citoquinina, promueve la división celular y la formación de brotes, mientras que el ANA, una auxina, estimula el desarrollo de raíces y el crecimiento celular (Ulloa C. y Sierra). Al estudiar su interacción, se busca optimizar las condiciones para la propagación y mejora de cultivos, incrementando la eficiencia en la producción de plantas de interés agrícola o comercial.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Universidad Zamorano, Honduras.

Desinfección del Material Vegetal para el Establecimiento

Para extraer los explantes foliares se usó plántulas de tabaco de la variedad Habana 2000 a los 35 días de germinación en bandeja múltiple. La desinfección del material vegetativo se inició con un lavado con agua y jabón suave, seguido de una inmersión en etano al 70% durante 30 segundos. A continuación, se sumergieron los explantes en una solución desinfectante compuesta de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% v/v (Ingrediente activo 4.72%), con 2 gotas/100 mL de Tween 80® por 20 minutos. Finalizado el tiempo de desinfección, los explantes fueron trasladados a la cámara de flujo laminar, donde se efectuaron tres lavados con agua destilada estéril con el fin de remover el NaOCl residual. Las porciones de lámina foliar fueron colocadas en medio de cultivo MS (Cuadro 1) suplementado con 2mg/L de BAP y 0.2mg/L de ANA. A los 28 días de establecidos los explantes pasaron a la etapa de multiplicación *in vitro* en la cual se desarrolló el experimento (Figura 1).

Figura 1

Plántula de tabaco en fase de multiplicación que se usó para el experimento de evaluación del efecto de reguladores de crecimiento, en la Universidad Zamorano.

**Medio de Cultivo para la Etapa de Multiplicación**

Se usó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la multiplicación de tabaco (Cuadro 1), se suplementó con reguladores de crecimiento según el tratamiento evaluado. Se ajustó el pH del medio a 5.8, todos los medios fueron gelificados usando 1.8 g/L de Phytigel®. Las condiciones de esterilización del medio en el autoclave fueron 1 kg/cm² a 121°C por 20 minutos.

Cuadro 1

Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la multiplicación in vitro tabaco

(Nicotiana tabacum) variedad Habana 2000.

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Hierro Sodio Etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes orgánicos		Inositol	100.000
		Tiamina- HCL	0.400
		Piridoxina	0.500
		Acido nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	30000

Nota. Tomado de (William Roca y Mroginski, 1991)

Incubación

Los explantes fueron incubados en el cuarto de crecimiento del laboratorio a 24 °C, 35% de humedad relativa y luz por 16 horas a 4kLux y 40 μmol/m²/s de radiación fotosintéticamente activa.

Tratamientos

Se evaluaron tres tratamientos combinando la citocinina BAP (bencilaminopurina) con la auxina ANA (Ácido naftalenacético). Las combinaciones y dosis evaluadas fueron las siguientes:

Tratamiento 1BAP + 0.1ANA: 1mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA

Tratamiento 2BAP + 0.2ANA: 2 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de ANA

Tratamiento 0.5BAP + 0.05ANA: 0.5mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA

Variables Evaluadas

Se contó el número de brotes por explante a los 15, 28, 35 días en el subcultivo 4. Al día 35 se refrescaron los medios de cultivo.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se uso un diseño completo al azar, con tres tratamientos. Se establecieron 70 repeticiones por tratamiento. Para un total de 210 unidades experimentales. Los datos colectados se evaluaron mediante análisis de varianza y separación de medias por el método de Tukey con probabilidad <0.05 .

Resultados y Discusión

A los 15 días se observó que los mejores tratamientos fueron el de BAP 0.5 + ANA 0.05 y BAP 1 + ANA 0.1, obteniendo diferencias significativas con un valor p de <0.0001 . Este resultado sugiere que la combinación en ambos tratamientos a estas concentraciones promueve y optimiza el desarrollo de los explantes ya que al hacer la evaluación a los 15 días estos mostraron los valores más altos en cuanto al número brotes por explante. Esto nos permite entender como la relación auxina: citocinina afecta la diferenciación celular, las citoquininas rompen la dominancia apical y promueven la división celular y la formación de brotes, las auxinas en combinación con las citoquininas promueven al desarrollo de los brotes, un balance no adecuado en la relación auxina: citocinina provoca que los tejidos desarrollen tejido callogénico o raíces (Astudillo Robles, 2013).

A los 15 días después de transferir los explantes a los tratamientos se pudo observar que los mejores resultados se obtuvieron con el BAP 0.5 + ANA 0.05 y BAP 1 + ANA 0.1 ($p < 0.0001$). A los 28 y 35 días, se observó que el tratamiento con BAP 1 + ANA 0.1 presentó el mayor número de brotes por explante. Este incremento en la respuesta organogénica fue estadísticamente significativo, con un valor de $p = 0.0007$, lo que confirma la superioridad de este tratamiento frente a los demás evaluados (Cuadro 2).

Cuadro 2

Efecto de reguladores de crecimiento en el promedio de número de brotes por explante en vitroplantas de tabaco variedad Habana 2000 a los 15, 18 y 35 días después de transferencia, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en la Universidad Zamorano.

Tratamiento (mg/L)	n	Número de brotes \pm DE ⁵		
		15 días	28 días	35 días
BAP 0.5 + ANA 0.05	60	2.72 a \pm 1.11	3.48 b \pm 1.84	3.97 b \pm 1.81
BAP 1.0 + ANA 0.10	40	2.73 a \pm 1.30	4.38 a \pm 1.88	5.05 a \pm 1.84
BAP 2.0 + ANA 0.20	62	1.82 b \pm 1.42	2.89 b \pm 1.96	3.76 b \pm 2.16
Coefficiente de variación		5.17	6.99	6.96
Probabilidad		<0.0001	0.0007	0.0054

Nota. ⁵ DE desviación Estándar

Cabe destacar que estos valores superan de manera considerable los reportados por (Núñez Núñez et al., 2017), quienes, aunque también identificaron al tratamiento BAP 1 mg/L + ANA 0.1 mg/L como el más eficaz para la multiplicación de brotes, solo obtuvieron una tasa de 2.88 brotes por explante después de 60 días de cultivo. Esta comparación sugiere que, bajo las condiciones del presente estudio, la combinación de reguladores evaluada incrementa de forma notable la tasa de multiplicación en un periodo de tiempo más corto, lo que podría traducirse en una mayor eficiencia del protocolo de micropropagación.

En la Figura 2, se observa que los tratamientos con BAP 0.5 + ANA 0.05 y BAP 1 + ANA 0.1 obtuvieron el mejor número de brotes por explante al ser 2.72 y 2.73, este resultado nos demuestra que esta combinación de reguladores es la óptima, ya que la combinación que existe entre auxinas y citoquininas favoreció la iniciación, pero también la proliferación de brotes. Estos tratamientos superan al tratamiento con mayor concentración hormonal, lo que nos permite inferir que esta relación hormonal es la mejor. (Melnyk, 2023) nos menciona que sus resultados indicaron que pequeñas diferencias en las concentraciones hormonales podrían modificar el desarrollo y el crecimiento de los órganos, de igual forma, estos autores observaron que la auxina potenciaba la formación de raíces, mientras que la citoquinina la reprimía.

Figura 2

Brotos de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo

suplementado con BAP y ANA a los 15 días, en la Universidad Zamorano.



Como se puede observar, a los 28 días el mejor tratamiento fue el de BAP 1 + ANA 0.1 al mostrar el mayor número de brotes por explante el cual fue de 4.38 lo cual sugiere que estas concentraciones estimularon un desarrollo óptimo de los brotes al permitir una mayor proliferación de estos. Por otro lado, el tratamiento con BAP 2 + ANA 0.2 presentó la menor respuesta de los reguladores de crecimiento, evidenciada por la baja proporción de brotes por explante y por un desarrollo subóptimo de los mismos, de igual forma, se observan hojas algo gruesas y deformes, así como apariencia acuosa brillante en algunas partes de los brotes, lo que evidencia signos de hiperhidratación. Esto podría deberse, en primer lugar, a las altas concentraciones de BAP. Según (W. Roca y La Mroginski, 1991), el BAP es un compuesto muy activo que acelera el crecimiento, estimula la formación de múltiples brotes a partir de una yema axilar o apical y promueve la absorción de nutrientes como los aminoácidos. Sin embargo (Gutierrez-Rosati y Gonzales, 2019) determinaron que el uso de concentraciones elevadas de BAP produce brotes deformes, pequeños e hiperhidratados, por lo que se recomiendan bajas concentraciones. Por otra parte, (Uribe et al., 2012) especifican que

concentraciones elevadas de auxinas pueden inhibir el desarrollo del cultivo, ya que estimulan la formación de etileno.

Figura 3

Brotos de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo suplementado con BAP + ANA a los 28 días, en la Universidad



BAP0.5 + ANA0.05
Zamorano.



BAP1 + ANA0.1



BAP2 + ANA0.2

A continuación, se presentan los resultados obtenidos al día 35 donde se destaca que al realizar una comparativa entre tratamientos, el mejor fue el de BAP 1 + ANA 0.01 ya que presentó el mayor número de brotes por explantes, siendo este el mejor a los 15, 28 y 35 días. Para el tratamiento con una concentración de BAP 0.5 + ANA 0.05 (Figura 4), se observa un crecimiento limitado de los explantes, a pesar de que, según los datos mostrados en el Cuadro 2, este tratamiento generó el segundo mayor número de brotes por explante. Sin embargo, dichos brotes presentan un tamaño considerablemente menor. Esta respuesta puede explicarse por la baja concentración de auxinas, lo que mantiene una relación citoquinina: auxina relativamente alta. Dicha relación favorece la inducción y proliferación de brotes, pero no proporciona las condiciones necesarias para su crecimiento y elongación sostenida. Esto es respaldado por (Pasternak y Steinmacher, 2024), quienes mencionan

que las citoquininas tienen un efecto principal en la inducción de brotes principalmente cuando la relación citoquinina: auxina es relativamente alta. Por otra parte, tenemos el tratamiento con BAP 2 + ANA 0.02, que al igual que en las otras evaluaciones, presentó el menor número de brotes por explante y tuvo un crecimiento con deformidades en comparación a los demás tratamientos, lo que sugiere que el utilizar altas concentraciones de estos reguladores de crecimiento afecta el desarrollo de los explantes, ya que los produce en menor proporción y no garantiza un estado óptimo de los mismos al no darle las características deseadas de producción.

Figura 4

Brotos de tabaco variedad Habano 2000 en etapa de multiplicación en medio de cultivo suplementado con BAP + ANA a los 35 días, en la Universidad Zamorano.



BAP0.5 + ANA0.05



BAP1+ ANA0.1



BAP2 + ANA0.2

Se evidenció la importancia del balance de los reguladores de crecimiento en la diferenciación celular. Una relación óptima citoquinina/auxina permite el desarrollo de brotes, mientras que un desequilibrio podría conducir a formación de callo o raíces no deseadas. Por tanto, la elección adecuada de las concentraciones de BAP y ANA es clave para diseñar protocolos robustos de multiplicación *in vitro*.

Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que la combinación de reguladores de crecimiento BAP 1mg/L + ANA 0.1mg/L es la más eficaz para promover la multiplicación de brotes por explante. Este tratamiento no solo generó un mayor número de brotes por explante, sino que lo hizo en tiempos más cortos, comparado con estudios previos, lo que se logró optimizar el protocolo.

Recomendación

Se recomienda el uso del tratamiento BAP 1mg/L + ANA 0.1 mg/L en la micropropagación del cultivo del tabaco de la variedad Habana 2,000.

Referencias

- Arteaga Ledezma, M. J. (2023). *“Principales factores que influyen en la producción del cultivo de tabaco (Nicotiana tabacum L) en la Provincia de los Ríos”* [Tesis]. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/14025>
- Astudillo Robles, J. M. (2013). *Establecimiento y multiplicación in vitro de malanga coco (Colocasia esculenta L. Schott)* [Proyecto especial de graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Zamorano, Honduras.
- Castro Hurtado, J. C. (2021). *“Manejo agronómico del cultivo de tabaco (Nicotiana tabacum), y su valor agregado en el Ecuador”* [Tesis]. Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador. <https://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/10267>
- Gutierrez-Rosati, A. y Gonzales, P. (2019). Growth regulators for in vitro culture of three grapevine rootstocks (*Vitis vinifera* L.) used in the pisco industry. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 461–468. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.02>
- Melnyk, C. W. (2023). Quantitative regeneration: Skoog and Miller revisited. *Quantitative Plant Biology*, 4, e10. <https://doi.org/10.1017/qpb.2023.9>
- Michael Eriksen, Judith Mackay, Neil Schluger, Farhad Islami Gomeshtapeh y Jeffrey Drope. (2015). *The Tobacco Atlas: Fifth Edition*. https://www.researchgate.net/publication/274310434_The_Tobacco_Atlas_Fifth_Edition
- Núñez Núñez, J., Quiala, E., de Feria, M., Mestanza, S. y Teanga, S. (2017). Propagación in vitro de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz a partir de yemas axilares de árboles plus seleccionados. *Biotecnología Vegetal*, 17(2). https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/543?utm_source
- Pasternak, T. P. y Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
- Roca, W [W.] y La Mroginski. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. <https://cgspace.cgiar.org/items/2c684d6a-a61e-43f4-a11a-f9547c71b6dc>
- Roca, W [William] y Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura fundamentos y aplicaciones. *Centro Internacional De Agricultura Tropical (CIAT)*, Artículo 151. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf
- Sánchez Membreño, O. J. (2019). *Manejo agronómico del cultivo de tabaco (Nicotiana)* [Tesis]. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/3824>
- Sandhya Suhas Shinde, Sharad Bharat Sanap, Akshay Milind Patil, Nalini Arun Shinde, Abhijit Arun Daspute y Dipak Kachru Sarode (2021). In vitro regeneration of *Nicotiana tabacum* L. from callus culture. *The Pharma Innovation Journal*, 10(12S), 904–908. <https://www.thepharmajournal.com/special-issue?year=2021&vol=10&issue=12S&ArticleId=9578>

Sharry, S. E., Adema, M. y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
<https://doi.org/10.35537/10915/46738>

Taalat, K., Javed, M. A., Huyop, F. Z. y Kaya, Y. (2021). Plant tissue culture of *Nicotiana tabacum* cv. TAPM 26 and its minimum inhibition against herbicide-Dalapon. *MANAS Journal of Engineering*, 9(Special 1), 35–42. <https://doi.org/10.51354/mjen.839516>

Ulloa C., A. J. y Sierra, A. *Efecto de 6-bencil aminopurina y ácido naftalenacético en la producción in vitro de segmentos nodales de yuca (Manihot esculenta Crantz): Efecto de 6-bencil aminopurina y ácido naftalenacético en la producción in vitro de segmentos nodales de yuca (Manihot esculenta Crantz)* [, Zamorano, Escuela Agrícola Panamericano, 2017]. bdigital.zamorano.edu. <https://bdigital.zamorano.edu/items/6d3c735e-b6b6-4896-9f49-2e79319e2a91>

Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F. y Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105–112. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>

Yu, J., Wang, X., Yuan, Q., Shi, J., Cai, J., Li, Z. y Ma, H. (2023). Elucidating the impact of in vitro cultivation on *Nicotiana tabacum* metabolism through combined in silico modeling and multiomics analysis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1281348. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1281348>

Anexos

Anexo A

Cronograma de actividades

