



UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS
ENFASIS EN PRODUCCION DE CULTIVOS

EVALUACION DE LA ORGANOGENESIS INDUCIDA CON TRATAMIENTOS
HORMONALES EN TOMATE DE ARBOL (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.
UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES

TESIS DE GRADO presentada como requisito para optar al Título de Magister en
Ciencias Agrarias con énfasis en Producción de Cultivos

Autor: GERMAN ERNESTO CHAVES JURADO
Presidente de Tesis: HERNANDO CRIOLLO ESCOBAR

San Juan de Pasto
Departamento de Nariño
Republica de Colombia
Mayo 2012



**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS
ENFASIS EN PRODUCCION DE CULTIVOS**

“Esta Tesis de Grado fue aceptada por la Vicerrectoria de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño, Maestria en Ciencias Agrarias con énfasis en Producción de Cultivos como requisito parcial para optar al Título de MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS CON ENFASIS EN PRODUCCION DE CULTIVOS

Dr. HERNANDO CRIOLLO ESCOBAR I.A. MSc.
Director de Tesis

Dr. LUIS ALFREDO MOLINA VALERO I.A. M.Sc.
Jurado Delegado

Dra. MARTA SOFIA GONZALEZ Bióloga PhD.
Jurado

Dra. AIDA LUCIA PATIÑO Bióloga MSc.
Jurado

**MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS ENFASIS EN PRODUCCION DE
CULTIVOS**

GERMAN ERNESTO CHAVES JURADO I.A. Esp.
Candidato

**“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado es
responsabilidad exclusiva del autor”**

**Artículo 1º del Acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966 emanado del
Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.**

NOTA DE ACEPTACION

Dr. LUIS ALFREDO MOLINA VALERO I.A. M. Sc.
Jurado Delegado

Dra. MARTA SOFIA GONZALEZ Bióloga PhD.
Jurado

Dra. AIDA LUCIA PATIÑO Bióloga MSc.

Dr. HERNADO CRIOLLO ESCOBAR I.A. MSc.
Presidente

San Juan de Pasto, Mayo 2012

Dedico a

Mi Padre Bolivar (qepd)
Mi Madre Maruja

Mi esposa Maria Yolanda por sus ánimos, por su apoyo incondicional.
Mis hijas Angela Maria y Daniela que son el motor de mi vida.

Mis hermanos con cariño
Mis Familiares

Mis compañeros de estudios
Mis compañeros de trabajo
Mis profesores, colegas y amigos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme estar vivo.

A mi Universidad de Nariño

Al Doctor Hernando Criollo Escobar I.A. MSc.

Al Doctor Jorge Velez I.AF. MSc.

A Juan Carlos Delgado Químico.

Todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
I. INTRODUCCIÓN	22
II. MARCO TEORICO.....	24
2.1 Clasificación taxonómica.....	24
2.2 Generalidades.....	24
2.3 Propagación.....	29
2.4 Cultivo de Tejidos.....	32
2.5 Micropropagación.....	33
2.6 Organogénesis.....	33
2.7 Explante	34
2.8 Inducción de Callos.....	36
2.9 Embriogénesis Somática.....	36
2.10 Medio de cultivo	37
2.11 Efecto de los reguladores de crecimiento	38
2.12 Contaminación.....	40
2.13 Hiperhidricidad (Vitrificación)	41
III. MATERIALES Y METODOS	43
3.1 Localización.....	43
3.2 Material Vegetal.....	43
3.2.1 Semilla Sexual.....	43
3.2.2 Prueba de Viabilidad.....	43
3.2.3 Prueba de Germinación en Cámara Húmeda	45
3.3 Preparación del Medio de Cultivo	48
3.4 Obtención de semillas y siembra en medio de cultivo.....	48
3.5 Obtención de explantes a partir de semilla sexual germinada.....	49
3.5.1 Obtención de Explantes – SEGMENTOS DE HOJA.....	49
3.5.1.1 Diseño Experimental.....	51
3.5.2 Explante - HIPOCOTILO	52
3.5.2.1 Diseño Experimental.....	53

3.5.3	Explante - HOJAS COTILEDONARES	56
3.5.3.1	Diseño Experimental.....	57
3.6	EVALUACIONES.....	58
3.6.1	Evaluaciones Explantes – Segmentos de Hoja	58
3.6.1.1	Oxidación Fenólica del explante – Segmentos de Hoja.....	58
3.6.1.2	Mortalidad de explante - Segmentos de Hoja	59
3.6.1.3	Sobrevivencia explante – Segmentos de Hoja	59
3.6.1.4	Formación de Callo explante - Segmentos de Hoja.....	60
3.6.2	Evaluaciones Explante - HIPOCOTILO.....	61
3.6.2.1	Oxidación Fenólica del explante – Hipocótilo.....	61
3.6.2.2	Mortalidad de explante - Hipocótilo	62
3.6.2.3	Sobrevivencia de explante - Hipocótilo	63
3.6.2.4	Formación de callo explante - Hipocótilo.....	63
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1	EXPLANTES - SEGMENTOS DE HOJA.....	65
4.1.1	Oxidación Fenólica Explante – Segmentos de Hoja.....	65
4.1.2	Mortalidad Explante – Segmentos de Hoja.....	72
4.1.3	Sobrevivencia Explante – Segmentos de Hoja	78
4.1.4	Formacion de Callo explante – Segmentos de Hoja	81
4.2	EXPLANTE HIPOCOTILO	88
4.2.1	Oxidación Fenólica explante - Hipocótilo	88
4.2.2	Mortalidad explante – Hipocótilo	93
4.2.3	Sobrevivencia explante – Hipocótilo	98
4.2.4	Formación de Callo explante - Hipocótilo.....	102
4.3	HOJAS COTILEDONARES	106
	CONCLUSIONES.....	108
	RECOMENDACIONES	110

BIBLIOGRAFIA 111

ANEXOS I

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Hiperhidricidad o Vitrificación en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth Cav. en medio de cultivo (MS -62) en condiciones <i>in vitro</i>	42
Figura 2.	Secuencia de la Prueba de TZ: A) Semillas imbibidas por 24 horas; B) Semillas seccionadas mostrando posición del embrión; C) Embrión aislado de la envoltura; D) Embriones teñidos después de la prueba de TZ (Escala 1-9).....	44
Figura 3.	Montaje de Cámara Húmeda con semillas de tomate de árbol	45
Figura 4.	Proceso de Germinación de semillas de tomate de árbol: A) Emergencia de Radícula. B) Desarrollo de Radícula. C) Desarrollo de Radícula – Desarrollo de Hipocótilo. D) Proceso general de Germinación	46
Figura 5.	Semillas de tomate de árbol en proceso de germinación en Bandejas de Germinación.	47
Figura 6.	Observaciones del Proceso de germinación. A) 25 dds. B) 26 dds. C) 27 dds. D) 28 dds. E) 29 dds. F) 32 dds.	48
Figura 7	Contenedores con semillas germinadas y plántulas para la obtención de Segmentos de Hoja.....	50
Figura 8	A-1; A-2) Primordios foliares y primer par de hojas. B) Segmentos de Hojas para siembra en medio de cultivo C) y D) Siembra de Segmentos de Hoja E) Distribución de contenedores en cuarto de incubación.....	51
Figura 9 A)	Semillas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav). germinadas en bandeja de germinación. B) Aislamiento de plántulas para disección de Hipocótilo.	52
Figura 10	Semillas en proceso de germinación con la diferenciación del hipocótilo	53
Figura 11	Hipocótilos para proceso de disección	53
Figura 12	Plántulas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) a las cuales se les retiró la cubierta y se diseccionó la raíz para la obtención de explantes – Hojas Cotiledonares.	56
Figura 13	Hojas Cotiledonares sembradas en el contenedor en medio de cultivo según el tratamiento asignado.	56
Figura 14.	Distribucion de contenedores con explantes – Hojas Cotiledonares teniendo en cuenta los tratamientos en el cuarto de incubación.	57
Figura 15	Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav). sembrados en medio de cultivo	58

Figura 16	Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) en proceso de Oxidación Fenólica la cual conduce a la muerte del explante.	59
Figura 17	Sobrevivencia de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Senth) Cav.) como respuesta al medio de cultivo y a la relación hormonal durante los periodos de evaluación.	60
Figura 18.	Detalle de la formación nodular con zonas verdes embriogénicas en hojas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.)	60
Figura 19	Oxidación de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Senth) Cav.: A) Primera siembra en MS con las relaciones hormonales propuestas inicialmente. B) Tercera siembra en MS modificado, cambio hormonal y relación hormonal.	61
Figura 20	Explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) necrosado por Oxidación Fenólica en proceso de Mortalidad	62
Figura 21	Explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) mostrando respuesta de Sobrevivencia al medio de cultivo modificado.....	63
Figura 22	Hipocótilos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) en Formación de Callo.	64
Figura 23	Oxidación Fenólica en los bordes y en contacto con el medio de cultivo y otros, sobre la superficie del explante – Segmento de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) (25 a 30 dds).....	65
Figura 24.	Distribución de los compuestos fenólicos en la superficie del cultivo y en el interior del mismo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) sembrados <i>in vitro</i> en medio MS (62).	68
Figura 25	Oxidación Fenólica en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) en el área de contacto con el medio de cultivo.....	71
Figura 26	Mortalidad de explantes después de Oxidación Fenólica en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) en el área de contacto con el medio de cultivo.....	77
Figura 27	Sobrevivencia de explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 130 días que posteriormente sufrieron Oxidación Fenólica, necrosamiento y finalmente murieron.	81
Figura 28	Formación de callo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	83
Figura 29	Formación de Callo el cual se originó desde las nerviaciones hacia el margen en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum</i>	

	<i>betaceum Cav. Senth</i>) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 130 días que posteriormente sufrieron Oxidación Fenólica, necrosamiento y finalmente murieron.	85
Figura 30.	Respuesta del explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) en algunos de los tratamientos durante el periodo de evaluación en que permanecieron verdes y formaron callo.	88
Figura 31.	Hipocótilos de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) los cuales presentan A) Contaminación con hongos y bacterias B) Comienzos de Oxidación Fenólica C) Sin respuesta o principios de Formación de Callo.	89
Figura 32.	Respuesta del explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) a las modificaciones del medio de cultivo, hormonas y concentraciones hormonales: A) Explantes contaminados con bacterias y/o hongos, B) Explantes con inicio de oxidación y C) Explante con solamenta callos	92
Figura 33.	Explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) iniciando proceso de oscurecimiento del tejido a los 60 días y su posterior muerte.....	95
Figura 34.	Sobrevivencia de explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) durante los 60 días del periodo de evaluación.....	101
Figura 35.	Formación de Callo en explante – Hipocótilo en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días. (Pertenece a uno de los contenedores que permanecieron por un tiempo, de la primera siembra).....	104
Figura 36.	Formacion de Callo en explantes – Hipocótilo en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) en el T9 que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días.....	105
Figura 37.	Formación de Callo en explantes – Hipocótilo en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días, los cuales se originaron en ambos extremos y posteriormente se extendió a la totalidad del explante.	106

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Tratamientos hormonales empleados para los explantes correspondientes a Segmentos de Hojas de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.).....	51
Cuadro 2	Tratamientos hormonales según diseño experimental para Explante Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.).....	54
Cuadro 3.	Tratamientos hormonales con cambio de auxina según diseño experimental para explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> . (Senth) Cav.).....	55
Cuadro 4.	Tratamientos según diseño experimental con medio modificado para explante - Hipocótilo con cambio en hormonas, concentraciones hormonales y dilución de M-S (62) en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav)..	55
Cuadro 5	Tratamientos según diseño experimental con medio de cultivo MS(62) para explante - Hojas Cotiledonares en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.).....	57
Cuadro 6.	Análisis de Varianza de la variable Oxidación Fenólica del explante-Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> .(Senth) Cav.) cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.....	66
Cuadro 7	Análisis de Varianza de la variable Mortalidad de explantes de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> . (Senth) Cav)cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.....	73
Cuadro 8	Análisis de Varianza de la variable Supervivencia de explantes de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.....	78
Cuadro 9	Análisis de Varianza de la variable Formación de Callo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth) cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.....	81
Cuadro 10.	Análisis de Varianza de la variable Oxidación Fenólica de explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth) cultivados en medio de cultivo MS (62) modificado con diversos niveles hormonales.....	89

Cuadro 11	Análisis de Varianza de la variable Mortalidad en explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) cultivados en medio de cultivo MS(62) modificado con diversos niveles hormonales.	93
Cuadro 12	Análisis de Varianza de la variable Sobrevivencia de explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) cultivados en medio de cultivo MS(62) modificado con diversos niveles hormonales.	99
Cuadro 13	Analisis de Varianza de la variable Formacion de Callo de explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Senth</i>) cultivados en medio de cultivo MS (62) modificado con diversos niveles hormonales.	102

LISTA DE GRÁFICAS

	Pag.
Gráfica 1. Porcentaje de explantes – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.) que presentaron Oxidación Fenólica según los tratamientos.....	66
Gráfica 2. Porcentaje de explantes que presentaron Mortalidad según los tratamientos en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> (Senth) Cav.).....	73
Gráfica 3. Porcentaje de explantes que Sobrevivieron según los tratamientos en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	79
Gráfica 4. Porcentaje de explantes que Formaron Callo según los tratamientos en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	82
Graáfica 5. Porcentaje de explantes – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth) que presentaron Oxidación Fenólica según los tratamientos.....	90
Gráfica 6. Porcentaje de explantes que presentaron Mortalidad según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	94
Gráfica 7. Distribución porcentual de explantes que Sobrevivieron según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	100
Gráfica 8. Porcentaje de explantes que Formaron Callo según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i> Cav. Senth).....	103

ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Composición del Medio de Cultivo Murashige – Skoog (62)	II
Anexo B. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Oxidación Fenólica en explante - Segmentos de Hoja en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	III
Anexo C. Porcentaje de Oxidación Fenólica de explantes – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>) presentado en los diferentes tratamientos	III
Anexo D. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Mortalidad en explante - Segmentos de Hoja en tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	IV
Anexo E. Porcentaje de Mortalidad de explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>) presentada en los diferentes tratamientos.	IV
Anexo F. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Supervivencia en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	V
Anexo G. Porcentaje de Supervivencia presentada en los diferentes tratamientos explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	V
Anexo H. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Formación de Callo en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	VI
Anexo I. Porcentaje de Formación de Callo presentado en los diferentes tratamientos en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	VI
Anexo J. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Oxidación Fenólica en explante - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	VII
Anexo K. Porcentaje de Oxidación Fenólica de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>) presentado en los diferentes tratamientos.	VII
Anexo L. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Mortalidad en explante - Hipocotilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).	VIII

Anexo M.	Porcentaje de Mortalidad de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>) presentada en los diferentes tratamientos	VIII
Anexo N.	Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Supervivencia en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).....	IX
Anexo O.	Porcentaje de Supervivencia de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>) presentada en los diferentes tratamientos.	IX
Anexo P.	Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Formacion de Callo en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum Cav. Sendth</i>).....	X
Anexo Q.	Porcentaje de Formacion de Callo de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (<i>Solanum betaceum (Sendth) Cav.</i>) presentada en los diferentes tratamientos	X

RESUMEN

Con el fin de estandarizar una metodología en la formación de plantas inducidas por diferentes relaciones hormonales en el medio de cultivo y determinar el efecto de esas relaciones hormonales en explantes – Segmentos de Hoja, Hipocótilos y Hojas Cotiledonares que garanticen la regeneración y producción masiva de plántulas de tomate de árbol y de estimular su siembra como planta de interés agrícola, se realizaron varios ensayos para su propagación clonal. Estos fueron cultivados *in vitro* a partir de plántulas germinadas *in vitro* en medio de cultivo de MS (62), con la adición de: inositol 100, ácido nicotínico 1.0, tiamina 10, piridoxina 1.0, sacarosa 30.000 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), a un pH de 5.7; para solidificar el medio nutritivo se añadió agar al 0.6%.

Para la multiplicación a partir de Hipocótilos se trabajó con el medio de cultivo MS (62), el cual fué modificado en tres ocasiones utilizando finalmente el medio completo y las diluciones $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{2}$.

Los inductores de la organogénesis para Segmentos de Hoja fueron: Acido Indol Acético (AIA) (0.6-0.8-1.0 ppm), 6-Bencil Amino Purina (BAP) (1.0ppm) y Cinetina (CIN) (1.5-2.0-2.5 ppm). Se utilizó como comparador un testigo al cual no se le adicionó hormonas.

Los inductores de la organogénesis para Hipocótilos fueron: Acido Indol Acético (AIA) (0.6-0.8 1.0 ppm), 6 Bencil Amino Purina (BAP) (1.0 ppm) y Cinetina (CIN) (1.5-2.0-2.5 ppm). Posteriormente se modificó la relación hormonal utilizando 2,4D (1.5-2.0-2.5 ppm) BAP (1.0 ppm) y CIN (2.0 ppm) y finalmente se decidió utilizar como relación hormonal y el medio de cultivo modificado, MS completo + AIA (0.2 ppm), BAP (1.0-2.0-3.0 ppm); para $\frac{3}{4}$ MS + AIA (0.2 ppm) + BAP (1.0-2.0-3.0 ppm) y para el medio $\frac{1}{2}$ MS + AIA (2.0 ppm) + CIN (1.0-2.0-3.0 ppm). Se utilizó un testigo al cual se le adicionó AIA a una concentración de 2.0 ppm.

Al utilizar Hojas Cotiledonares, se tuvo en cuenta los mismos tratamientos que se utilizaron para Segmentos de Hoja, pero al no tener respuesta se procedió a descartar este ensayo, debido a que se presentó alta mortalidad por oxidación fenólica, ennegrecimiento, necrosamiento y contaminación desde el inicio del cultivo.

Para el análisis estadístico se empleó un Diseño Irrestringidamente al Azar (DIA), donde para un total de 10 tratamientos por explante, con 10 repeticiones cada una correspondiente a un contenedor con 5 explantes para Segmentos de Hoja y Hojas Cotiledonares y 3 para Hipocótilos.

En todos los análisis se utilizó el programa de computación *Statistical Analysis System* (SAS), *release* 8.01, año 2000.

Los cultivos fueron incubados a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y luz continua (750-2.000 lux). A los 130 días después de la siembra, se pudo evaluar la Oxidación Fenólica en los Segmentos de Hoja, la

cual se presenta en todos los tratamientos, independientemente de que en el medio de cultivo se utilice o no hormonas (auxinas, citocininas, etc) presentando el mayor valor el T2, con un 45% correspondiente a la incorporación de 0.8 ppm de AIA y 58.57% (0.8 ppm) para la variable Mortalidad; 63% para el T1 (0.6 ppm de AIA) el cual alcanza la mayor Supervivencia durante el periodo de evaluación. El T5 (0.8 ppm de AIA+ 1.0 ppm de BAP) fue el que obtuvo mayor Formación de Callo (29%) con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T4 y T6 que tuvieron menores valores y T1, T2 , T3 y T10, los que no formaron callo, indicativo de respuesta pero en un bajo porcentaje.

A los 60 días después de la siembra, periodo hasta donde se pudo realizar las evaluaciones del explante - Hipocótilo, se pudo determinar que a partir de este periodo, la Oxidación Fenólica se agudizó en todos los tratamientos inhibiendo el desarrollo y causando Mortalidad en todos los explantes, hayan o no formado callo, los que hasta este periodo de tiempo permanecieron verdes y como consecuencia de la Oxidación Fenólica comenzaron a presentar pardeamiento. T10 fue el que presentó mayor grado de Oxidación Fenólica con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T8, T1, T9, T2, T3, T7, T4, T5 y T6, con un valor del 21.66%; mayor Mortalidad con un valor del 23.33%. El T9 con un valor de 89.99% para Supervivencia y con un valor del 40% en la Formación de Callo respecto a los demás tratamientos.

La eficiencia en la micropropagación por sí sola, no asegura que las plantas regeneradas sean normales, haya o no respuesta o se obstaculice por factores endógenos; en algunos casos solo se obtienen estructuras rudimentarias que no llegan a desarrollarse en plantas (Liu, *et al.*, 1990; Arroyo y Revilla, 1991).

Palabras Clave: Micropropagación, reguladores de crecimiento, oxidación fenólica, formación de callo.

ABSTRACT

With the purpose to standardize a methodology in the formation of induced plants for different hormonal relationship in the middle of farming and to determine the effect of those hormonal relationship in explants – Segments of Leaf, Hypocotyls and Cotyledonary Leaves that guarantee their generation and massive production of seedling of tomato tree and to stimulate its sowing as plant of farming interest, it realized several testing for its clonal spreading which were farmed *in vitro* to start of germinated seedling *in vitro* in the middle of the farming of MS (62) with addition of: Inositol 100, Nicotinic Acid 1.0, Thiamine 10, Pyridoxine 1.0; sucrosa 30.000. (mg*1) to a pH of 5.7 to solidify the nutritious mean it added agar the 0.6 %.

For multiplication to start of Hypocotyls it worked with the mean of farming MS(62) which were modified in three occasions using finally complete mean of farming and dissolutions of $\frac{3}{4}$ and $\frac{1}{2}$.

The inductors of organogenesis for Segments of Leaf were: Indole Acetic Acid (IAA) (0.6-0.8-1.0 ppm). 6- Benzyl Amino Purine (BAP) (1.0ppm) + and Cinetina (CIN) (1.5-2.0-2.5 ppm). It used as comparator a core sample which it didn't add hormones.

The inductors of organogenesis for Hypocotyls were: Indole Acetic Acid (IAA) (0.6-0.8-1.0 ppm). 6- Benzyl Amino Purine (BAP) (1.0ppm) + and Cinetina (CIN) (1.5-2.0-2.5 ppm). Later it modified the hormonal relation using 2,4 D (1.5-2.0-2.5 ppm), BAP (1.0 ppm) y Cin (2.0 ppm) and finally it decided to use as hormonal relation and the mean of farming modified. MS complete + IAA (0.2 ppm), BAP (1.0-2.0-3.0 ppm): for $\frac{3}{4}$ MS + IAA(0.2 ppm) + BAP (1.0-2.0-3.0 ppm) and for the mean $\frac{1}{2}$ MS +IAA (2.0 ppm) + CIN (1.0-2.0-3.0 ppm). It used a core sample which it added IAA a concentration of 2.0 ppm. To used Cotyledonay Leaves it took account the same treatment that it used for Segments of Leaf, but it doesn't have answer it procedure to discard this testing, where it presented the biggest Mortality for Phenolic Oxidation, blackening, necrosis and contamination.

For the Statistical Analysis it used a design unrestrictedly of random ((DIA) for a total of 10 treatments y 10 repetitions each one corresponding to a container with 5 explant for Segments of Leaf and Cotyledonary Leaves and 3 for Hypocotyls.

The crops were incubated to 27+ 2° C and continue light (750 – 2000 lux). 130 days after of the sowing it could to evaluate the Phenolic Oxidations in the Segments of Leaf which it presents in all the treatments, independently of what in the middle of cultivation it uses or it doesn't hormones (auxins, cytokinins, etc) presenting the biggest value the T2, with a 45% corresponding to the incorporation of 0.8 ppm de IAA and 58.57% (0.8ppm of IAA) for Mortality variable: 63.00% for the T1 (0.6ppm of IAA) which reaches the biggest Surviving during of period of evaluation. T5 (0.8ppm of IAA + 1.0ppm of BAP) was which had the biggest formation of corn, (29%) with significant differences when it

compared with the treatments T4 and T6 that had the less values and T1, T2, T3, and T10 which didn't form corn, indicative of answer but in a less percentage.

60 days after of the sowing, period until where it could to realize the evaluations of Hypocotyl explant. It could to determine that to start of this period, Phenolic Oxidation, it sharpened in all the treatments inhibiting development and causing Mortality in all explants, which had formed or hadn't corn, which that until this period of time remained green and as a consequence of the Phenolic Oxidation begin to present browning. T10 was which presented the biggest grade of Phenolic Oxidation with significant differences when it compared with the treatments T8, T1, T9, T2, T3, T7, T4, T5 and T6, with a value of 21.66%; biggest Mortality with a value of 23.33%. The T9 with a value of 89.99% for Surviving and with a value of the 40% in the formation of corn with respect to other treatments.

Efficiency of micropropagation for itself, it doesn't assure that regenerative plants appear normal: in some cases only it obtains rudimentary structures that they don't reach to develop in plants (Liu, *et al.*.1990: Arroyo y Revilla. 1991)

Key Words: Micropropagation, regulators of growing, Phenolic Oxidation, formation of c

I. INTRODUCCION

A pesar de ser el tomate de árbol originario de los Andes en America Latina, solamente es cultivado de manera extensiva en Ecuador y Colombia; junto con estos países suramericanos, países como Nueva Zelanda, Kenia, Sri Lanka e India, son los principales productores mundiales (Pringle y Murria, 1991).

Se caracteriza por ser un frutal exótico, con alto potencial como alternativa para los agricultores de la zona andina (Bernal y Diaz, 2006; Lobo, 2004), por ésta razón, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, lo incluye dentro de la apuesta Exportadora Agropecuaria 2006-2020 como uno de los frutales de alta potencialidad en el País (MADR, 2008b)

Durante los últimos años, ha adquirido gran importancia en la fruticultura colombiana y como cultivo comercial, para mercadeo nacional e internacional, situación que se refleja en su aceptación por parte de los consumidores. Su potencial está determinado por la variabilidad genética y su adaptación a condiciones tropicales. Sin embargo, éste gran potencial se ve afectado por la condición semisilvestre de la especie y por la falta de soporte tecnológico, dado que el desarrollo de esta especie como cultivo, ha sido fundamentalmente sobre el conocimiento empírico, fruto del esfuerzo de los agricultores (MADR, 2008a).

Deriva de una serie de aspectos, como la presencia de amplia variabilidad genética, la existencia de nichos ecológicos apropiados para su siembra, la aceptación del fruto de esta especie por parte de los consumidores locales y de otras regiones del país y del mundo, las posibilidades agroindustriales y el potencial de producir desarrollo económico con los pequeños productores.

Tiene limitaciones importantes que restringen su cultivo, como son la susceptibilidad a enfermedades y plagas, falta de identificación de cultivares, ausencia de técnicas de cultivo a nivel comercial y de manejo de las plantas, cultivo limitado a huertos familiares, problema de deterioro en la poscosecha, heterogeneidad en la calidad de la fruta y una disponibilidad limitada de material élite libre de patógenos.

En el Departamento de Nariño, el tomate de árbol tiene amplia distribución, siendo el frutal de mayor aceptación por los agricultores, sin embargo, el área cultivada tiende a reducirse por la presencia de problemas fitosanitarios severos y al desestímulo ocasionado por los precios bajos de la fruta, debido a la entrada de grandes volúmenes desde centros productores del norte del país y de zonas productoras del Ecuador, por razones de tipo económico y por la insuficiencia de conocimientos disponibles..

Actualmente la actividad productora en Colombia se encuentra afectada por el atraso de las técnicas usadas para la reproducción. Esto se debe a que la información genética aportada por métodos convencionales de obtención de nuevas plantas es altamente variable, ocasionando heterogeneidad de los frutos.

En los métodos tradicionales de reproducción sexual (semillas) o asexual, se tienen en cuenta características de interés como el buen desarrollo, sanidad vegetal del fruto, cantidad y calidad de producción de plantas; los anteriores fenómenos no son estudiados ni con profundidad, ni técnicamente por el agricultor, sino que tan solo son analizados mediante la observación, hecho que no garantiza el posterior desarrollo de la planta que produzca frutos con características, tales como tamaño, sabor, apariencia externa, textura de la pulpa y forma, adecuadas para el cumplimiento satisfactorio de los requerimientos que hacen consumidores e intermediarios.

Adicionalmente, estos procedimientos (métodos tradicionales de reproducción, sexuales y asexuales), no tienen éxito en todos los casos, debido a que las estructuras vegetativas o semillas seleccionadas para la reproducción, no se logran adaptar a las condiciones ambientales, o son atacadas por enfermedades que impiden el desarrollo de la planta ocasionando la pérdida de tiempo y de la inversión realizada por el agricultor.

El desarrollo de nuevas variedades se ve afectado por el tiempo necesario que se requiere para programas de fitomejoramiento, limitante que puede ser complementada con la propagación masiva (micropropagación a través de técnicas por cultivo de tejidos *in vitro*) de materiales élite y la ingeniería genética.

Utilizando técnicas biotecnológicas, como la selección somaclonal *in vitro*, se pueden obtener materiales a partir de explantes, llámese secciones de hojas en formación (primordios foliares), hipocótilos, cotiledones y radículas para regeneración y posterior multiplicación de materiales los que posteriormente serían utilizados en diferentes bioensayos de hibridación, cruzamiento o en la búsqueda de resistencia y/o tolerancia a las diferentes enfermedades causadas por hongos, virus, viroides, bacterias y micoplasmas o al ataque de nemátodos y plagas.

Este proceso de propagación, podría acelerar el desarrollo de nuevos cultivos con características específicas, como la mejora de la arquitectura, recuperación de valiosos materiales con bajo potencial de germinación, larga vida en anaquel y calidad nutricional, dependiendo en gran medida del genotipo, fenotipo y naturaleza de los explantes utilizados.

Por lo descrito anteriormente, se realizó la presente investigación con el fin de estandarizar una metodología en la formación de plantas inducidas por diferentes relaciones hormonales en el medio de cultivo y determinar el efecto de esas relaciones hormonales en explantes - Segmentos de Hoja, Hipocótilos y Hojas Cotiledonares que garanticen la regeneración y producción masiva de plántulas de tomate de árbol, siendo la micropropagación, una herramienta de desarrollo para el sector agroindustrial con esta especie, como también a otras de interés comercial.

II. MARCO TEORICO

2.1 Clasificación taxonómica

Reino:	Vegetal
Clado:	Angiospermae
Clado:	Eudicotiledonea
Clado:	Lamida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<i>Solanum betaceum</i> <i>Solanum</i> (Senth) Cav.

(Jardin Botanico Missouri, 2012)

El nombre de este frutal varía según el país o región, así: Tomate de árbol (Ecuador, Colombia); Tree tomato (Inglaterra); Tomate francés (Portugal); Straiktomaad, Terong blanda (Holanda); Tomate dearbre (Francia); Tomatobaum (Alemania); Tomate de ají (España); Tamarillo (Nueva Zelanda y Estados Unidos).

Se le conoce popularmente con el nombre de "Tomate de Arbol" aunque recibe otros nombres, tales como "tomate cimarrón, tomate extranjero, granadilla y contragallinazo" en Centroamérica, "berenjena y tomate de palo" en México, "tomate de monte, tomate silvestre, pepino de monte y gallinazo panga" en Colombia y Perú, "chilto, sima, tomate de lima" en Bolivia, "tomate chimango, tomateiro da serra" en Brasil y "Tamarillo" en Nueva Zelanda, país en donde ha sido introducido. tomate de agua, tomate de castilla, tomate de la paz, tomate del serrano, tomate silvestre, berenjena, sachamote (Lobo, 2004, MADR, 2008a).

2.2 Generalidades

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.), es un arbusto semileñoso, que presenta un ciclo vegetativo perenne. Es una especie que puede alcanzar alturas de entre 2 a 3 metros de longitud; pertenece a la familia de las Solanáceas. Tiene cualidades físicas, nutritivas y organolépticas (alto contenido de proteína), similares a las mejores frutas que se consumen actualmente, pero pese a sus características sobresalientes no se le da la importancia que merece dentro de la alimentación humana. Esta fruta es rica en vitamina A y C, rica en minerales como calcio, hierro y fósforo y con bajos niveles de calorías. Su alto contenido de pepsina, acidez y sabor, hacen del tomate de árbol una fruta atractiva para el procesamiento agroindustrial (CRFG, 2007).

El tomate de árbol, es originario de los Andes Suramericanos (Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia, Argentina y se encuentra en forma silvestre desde Venezuela hasta la Argentina, cultivándose en climas templados y fríos (Hernández y León, 1992; Lobo, 2004).

Ha sido introducido en las regiones montañosas de América Central, Caribe, India, Malasia, Filipinas, África, así como en Florida, California, Nueva Zelanda y Australia (Geilfus, 1994)

Es una fruta tropical originaria de los bosques Andinos, principalmente de Perú, Chile, Ecuador, Bolivia y Argentina; sin embargo, su producción se ha expandido hasta zonas de Centro América y el Sureste Europeo. Nueva Zelanda es el principal país productor y exportador de este fruto, además de ser donde mayores avances se han hecho en el desarrollo y tecnificación del cultivo (Arahana, *et al.*, 2010).

Durante los últimos años, el tomate de árbol ha adquirido gran importancia en la fruticultura colombiana y como cultivo comercial, para mercadeo nacional e internacional, siendo las principales regiones productoras, Antioquia, Cundinamarca, Tolima, Caldas, Valle del Cauca, Santander, Nariño y Huila, registrándose una producción nacional para el año 2010 de 122.500 toneladas, cosechadas en un área sembrada a nivel nacional de 7.504 has⁻¹ y un rendimiento de 18.031 kg/ha (AGRONET, 2010).

En Colombia existen agroecosistemas óptimos para el cultivo del tomate de árbol, localizados entre los 1600 a 2600 msnm situación que se refleja en su aceptación por parte de los consumidores nacionales e internacionales. Su potencial está determinado por la variabilidad genética y su adaptación a condiciones tropicales. Sin embargo, éste gran potencial se ve afectado por la condición semisilvestre de la especie y por la falta de soporte tecnológico, dado que el desarrollo de esta especie como cultivo, ha sido fundamentalmente sobre el conocimiento empírico, fruto del esfuerzo de los agricultores (MADR, 2008a).

En el Departamento de Nariño, el tomate de árbol tiene amplia distribución, cultivándose desde los 1800 hasta los 2.800 metros sobre el nivel del mar, siendo el frutal de mayor aceptación por los agricultores de la zona triguera baja con un área cultivada de 609 has., una producción de 7.673 ton y un rendimiento de 12.599 kg/ha correspondiendo al 5.5% de la producción nacional (MADR, 2008 b). Sin embargo, el área cultivada tiende a reducirse por la presencia de problemas fitosanitarios severos y al desestímulo ocasionado por los precios bajos de la fruta, debido a la entrada de grandes volúmenes de tomate de árbol desde centros productores del norte del país y de zonas productoras del Ecuador

No obstante a lo anterior, es conveniente tener al tomate de árbol como un componente importante en el huerto misceláneo de frutales andinos, dada la familiarización con el frutal, la preferencia por el consumo y las posibilidades de obtener producciones de calidad en épocas de escasez, debido a las condiciones medioambientales favorables de la zona triguera baja. Es necesario cumplir con un manejo técnico condicionado a los factores de clima y suelo (Sañudo *et al.*, 2002).

Las variedades más comerciales de tomate de árbol son: Tomate común de forma alargada, color morado y anaranjado; Tomate redondo, colombiano de color anaranjado o rojizo;

tomate mora de Nueva Zelanda, forma oblonga y de color morado. El sabor de la fruta difiere en su mezcla de sabor dulce a agrio según la variedad (Espinosa, *et al.*, 2005).

Se ha detectado que esta especie no es muy estable en las características obtenidas por selección, como color, tamaño, dulzura de los frutos y rendimientos. Sin embargo, es necesario reconocer que aquellas características han sido detectadas en cultivares desarrollados fuera del área de dispersión natural (Nueva Zelanda) donde pueden haber influido factores ecológicos.

En consideración, el desarrollo de esta especie debe partir de una amplia base genética, a partir de los materiales sembrados por agricultores con los cuales se pueden plantear programas de mejoramiento dado el escaso o nulo desarrollo de producción de variedades en los países de la zona andina, señalando al tiempo, que aún es una especie en domesticación y que su variabilidad y diversidad no están adecuadamente colectadas y conservadas por lo que se debe recurrir a métodos de propagación vegetativa (clonación), como estacas, injertos, o mediante procedimientos de laboratorio utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que ofrece una base para el sistema de micropropagación y mejoramiento genético.

De no tecnificar los procesos productivos de especies promisorias (tomate de árbol), se seguirá en el atraso en que se encuentra la agricultura postergando o retardando así el crecimiento hacia el cual debe encaminarse toda economía que corresponde a países en vía de desarrollo.

Posee raíces profundas y ramificadas, cuando la propagación se hace por semilla y cuando se hace vía asexual son ramificadas y poco profundas,(axonomorfos) tallos suculentos, que alcanzan a los 8 y 10 meses de edad, una altura de 1.5m y 2.0m; hojas grandes de 20 a 35 cm de longitud y 15 a 20 cm de ancho, de consistencia coriácea de color verde oscuro en el haz y verde pálido en el envés, alternas, simples y enteras de forma cordada. (Albornoz, 1992).

El fruto es una baya ovoide, de cáscara gruesa en tonos rojos, anaranjados y amarillos, según la variedad. El fruto puede consumirse crudo, cocido como vegetal, en sopas, salsas, ensaladas, etc., como fruta en dulces, mermeladas entre otros. El fruto es rico en Vitamina B (B₁, B₆) y C, niacina y fósforo (Hernández y León, 1992; Geilfus, 1994).

El mesocarpio (pulpa) es amarillo, rojo, rosado o morado y es la parte utilizable. Las variedades con frutos que presentan pulpa rojo-oscura y semillas negras, se prefieren a las de pulpa rosada y semillas claras. Los frutos se forman a los 20 meses del trasplante y 6 u 8 meses, después maduran. Existen dos variedades, correspondiendo a aquellas de frutos amarillos naranja y frutos rojos (Bernal,1995).

Las semillas son pequeñas circulares o reniformes, planas, lisas de color amarillo o verde oscuro, cubiertas por un arilo de diferente color dependiendo de la variedad, su peso varía entre 5 y 6 mg con dimensiones que van de 4 a 5 mm de longitud y 3 a 4 mm de anchura y

densamente pubescentes. La semilla fresca presenta buena germinación, la que inicia entre los 10 a 15 días después de la siembra (Bernal, 1995).

La propagación del tomate de árbol es generalmente por semilla, aunque también se puede utilizar la propagación asexual e *in vitro* (Bernal, 1995).

Es una planta de climas templados y fríos. Su temperatura está entre 13 a 24°C siendo la óptima entre 16 y 19°C. No necesita gran humedad atmosférica, razón por la cual, se cultiva frecuentemente en zonas altas de clima seco. La producción empieza al año y medio o dos años después de la siembra, siendo intensa solamente por 4 o 5 años (5 veces/ año) pudiendo durar de 10 a 12 años (Bernal, 1995).

Es una planta semisilvestre que se encuentra en los Andes Suramericanos (Ecuador, Perú, Chile y Bolivia), presentándose especies silvestres relacionadas, en las áreas de domesticación (Ecuador y Perú), (Morton, 1987). En Colombia y Ecuador, los principales productores americanos, no existen variedades comerciales, sino poblaciones locales, que se multiplican y seleccionan por parte de los cultivadores. En consecuencia este cultivo se caracteriza por la gran heterogeneidad en las formas y tamaños de las frutas entre y dentro de una misma plantación, resultado de las hibridaciones y de las mezclas del material genético a través del tiempo. Dicha variabilidad se presenta en una misma plantación y las variaciones difícilmente pueden fijarse por semilla sexual debido a que en el tomate de árbol se presenta una notable polinización cruzada (Lobo, 2004).

A largo plazo, esto puede detener una eventual expansión de las áreas cultivadas debido a la falta de genotipos que presenten buen comportamiento agronómico y una buena homogeneidad en la calidad de la fruta (Lobo, 2004; Albornoz, 1992). En el Ecuador se reconocen hasta 8 variedades de tomate de árbol que difieren por el color y el sabor de los frutos.

En Antioquia, el tomate de árbol se cultiva en explotaciones menores de 20 hectáreas en suelos ácidos, ricos en materia orgánica y derivados de cenizas volcánicas, que ocupan zonas comprendidas desde los 1800 hasta los 2600 metros sobre el nivel del mar, con temperatura media entre 16 y 20 grados centígrados y humedad relativa entre 70 y 80%. En altitudes inferiores a 1000 msnm no fructifica bien porque durante la noche la temperatura no es lo suficientemente baja. La zona de concentración está en la región cafetera colombiana, la cual posee un clima templado y una altura de 1.200 y 2.200 msnm. (Bernal y Diaz, 2006)

La explotación de tomate de árbol comenzó hace aproximadamente 30 años en el Oriente Antioqueño y casi al mismo tiempo de su expansión, los problemas de enfermedades causaron severas pérdidas en la producción. En los últimos 20 años, se ha desarrollado como cultivo comercial en el Altiplano Norte y más recientemente en la zona del Municipio de Urrao, al punto que hoy es reconocido como uno de los renglones agrícolas de mayor importancia económica del Departamento, debido a la creciente demanda interna y en la

última década, a la venta como fruta de exportación hacia diferentes países de Europa (Bernal y Diaz, 2006).

En Colombia, particularmente en Nariño y Putumayo, no existe material de siembra certificado, ni variedades comerciales. Los cultivos presentan frutos heterogéneos en tamaño color y forma, aún dentro de una misma plantación. Algunos de los materiales de siembra empleados por los agricultores del valle de Sibundoy exhiben características de resistencia a la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, y al tizón tardío. mildiu, gota, peronospora cuyo agente causal es el Hongo *Phytophthora infestans*.

Poblaciones de los genotipos tomate amarillo y rojo han sido evaluados en hojas, por su resistencia a *Phytophthora infestans* mostrando diferencias significativas en los parámetros de patogenicidad evaluados. Además, en esta región (Sibundoy, Putumayo) se ha detectado un linaje clonal distinto al reportado para esta especie (Mideros, 2008). Por otra parte en esta región es posible encontrar especies silvestres relacionadas con *Cyphomandra betacea*, específicamente *Cyphomandra sibundoyensis*.

Las plantaciones efectuadas se han logrado en áreas donde por efecto del precio se ha sustituido papa y frijol por tomate de árbol, lo que ha permitido considerar como alternativa en la diversificación de cultivos en áreas donde se siembran cultivos ilícitos, principalmente amapola (Sañudo, *et al.*, 2002)

La cosecha se efectúa manualmente, cuando el fruto se encuentra morado. La maduración completa se logra cuando el fruto pasa a un color rojo brillante; se conserva bien a temperaturas de 8°C durante máximo un mes. Colombia es el único país que produce todo el año. En Nueva Zelanda, la temporada es escalonada, de fines de Marzo a principios de Octubre con un periodo máximo entre Junio y Julio.

En Colombia se ha venido incrementando el cultivo de tomate de árbol durante la última década. Los cultivos se encuentran en toda la zona Andina de los Departamentos de Nariño, Cauca, Huila, Tolima, Valle, Caldas, Quindío, Antioquia, Cundinamarca y Boyacá; esto como consecuencia del aumento de la demanda ocasionada por un mejoramiento en el hábito de consumo y por la ampliación del mercado internacional de esta especie; además de la buena calidad, la rápida producción y los precios bajos, en comparación con otras frutas utilizadas en la canasta familiar (Aristizabal, 1997; Tamayo *et. al.*, 1999 y Espinal *et. al.*, 2005).

Según el Acuerdo de Competitividad de Productos Hortofrutícolas Promisorios Exportables de Colombia (2001), el tomate de árbol es considerado un producto promisorio exportable de primera generación. En el 2003 del área sembrada destinada a los cinco frutales de exportación, el tomate de árbol participó aproximadamente con el 20,2%, con 7.686 Ha. creciendo en el periodo 1992-2003 a una tasa del 6.1% promedio anual. Esto implicó una mejora en los rendimientos aunque no muy significativa, pues en el mismo periodo solo

crecieron un 0.7% anual, con fluctuaciones entre los 16,9 TM/Ha. y 19.3 TM/Ha (Espinal, *et al.*, 2005).

En el año 2003, el tomate de árbol participó con el 4.1% de la producción de frutas frescas. Ocupa el cuarto puesto después de cítricos, piña y mango, con una producción de 140.228 TM. En el 2003, creciendo a una tasa de 6.1% anual en el periodo 1992-2003 (IICA - MINAGRICULTURA, 2003). En el periodo 2000 – 2006, este cultivo registró un máximo de exportación de US\$1.883.000 en el año 2001, sin que hayan registrado importaciones durante este periodo (MADR, 2008 b)

Una hectárea de tomate de árbol ocupa 277 jornales, representados en trabajo calificado y no calificado (Espinal, *et al.*, 2005). Estos valores son superiores a los cultivos tradicionales como el algodón, la caña de azúcar y la palma que ocupan 70, 82 y 90 jornales/ha/año, respectivamente (Toro, 2001).

La producción de tomate de árbol se adelanta por pequeños productores, generalmente en lotes de menos de una hectárea, con tecnología muy diversa, caracterizada por el uso intensivo de agroquímicos, con un nivel tecnológico muy bajo y sin asistencia técnica adecuada, dificultando tipificar una tecnología de producción y estandarizar una estructura de costos para el cultivo. En efecto los costos varían dependiendo del número de plantas por hectárea, la siembra de cultivos de ciclo corto que se utiliza para maximizar el uso del suelo en el periodo de levante de la plantación, el control sanitario que determina la vida útil del cultivo y las prácticas agrícolas (Quintero *et al.*, 2008)

Los agricultores, en general, utilizan distancias de siembra que van de 2 x 2 metros entre plantas que permiten una población de 2.500 plantas/Ha hasta 3.5 x 3.5 metros en triángulo, con poblaciones de cerca de 1.000 plantas /Ha.

En el departamento de Nariño, aun a pesar de los estudios realizados en tomate de árbol, el desarrollo de estos se ve limitado no sólo por razones de tipo económico, sino también por la insuficiencia de conocimientos disponibles.

2.3 Propagación

El medio más utilizado para propagar el tomate de árbol es por semilla. Además, hay varios sistemas vegetativos que también se pueden emplear como son las estacas, chupones e injertos, los que garantizan arbustos idénticos a la planta madre. (FEDECAFE, s.a).

Guimaraes *et al.*, (1988), citados por Lopes (2000), reportaron por primera vez éxito en la inducción de embriogénesis somática en el tomate de árbol, mediante el cultivo de embriones zigóticos maduros e hipocótilos de plántulas. En un reporte posterior, el mismo grupo de investigadores describieron la regeneración de plantas de tomate de árbol mediante organogénesis y embriogénesis somática empleando diferentes clases de explantes (hipocótilos, cotiledones, raíces y embriones zigóticos maduros a partir de protoplastos).

En la investigación desarrollada por Contreras y Almeida, (2003), se establecieron ensayos para su propagación *in vitro*, utilizando diferentes explantes, siempre a partir de plántulas provenientes de semillas, obtenidas de frutos obtenidos de tomate de árbol silvestre.

Cada ensayo consistió de 10 muestras (cotiledones e hipocótilos). Se realizaron observaciones periódicas y se registraron las respuestas morfológicas generadas por los explantes (Contreras y Almeida, 2003). Los reguladores BA ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) + AIA ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y Z ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) añadidos al medio de cultivo para la inducción de morfogénesis directa a partir de cotiledones e hipocótilos, fueron los que produjeron las mejores respuestas en términos de proliferación de vástagos.

Resultados similares fueron reportados por Christopher y Rajam, (1996), quienes indujeron la proliferación de vástagos en *Capsicum spp.*, también solanáceas, cuando añadieron al medio de cultivo BA ($4.4 - 177.5 \text{ iM}$) o Kinetina ($4.7 - 185.9 \text{ iM}$) en medio nutritivo MS.

Zheng *et al.*, 2005 citado por Scientia Horticulture, (2009) utilizaron brotes apicales de tres especies de *Lysimancha spp.*, segmentos nodales que fueron implantados en medio de cultivo de MS (62), complementado con BAP ($1.0 - 3.0 - 5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y ANA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) para inducir brotes múltiples, registrándose la regeneración de brotes después de 30 días de cultivo. También se utilizaron las dos primeras hojas como explantes cultivándose con el lado abaxial en contacto con el medio de cultivo MS (62) y suplementado con las hormonas anteriormente mencionadas.

Después de 30 días de cultivo, se obtuvo alargamiento de los brotes apicales ($1.0 - 3.0 \text{ cm}$), número de brotes apicales y brotes en la hoja cuando se cultivaron en medio de cultivo MS (62) $3.0 - 5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y BAP $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, siendo mayores que los otros tratamientos utilizados en la especie *Lysimancha christinae*. Lo anterior posiblemente se debió al amplio rango de concentraciones de BAP ($1.0 - 5.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) así como la utilización de explantes de mayor vigor.

En melón “Egussi” (*Citrullus colocynthis* L.) desarrollado por Otang Ntui, *et al.*, (2008), en tres localidades, en el cual se utilizaron como explantes cotiledones e hipocótilos a partir de semilla sexual germinadas en medio de cultivo MS(62), suplementado con BA (1,2,3,5 o $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) solo o en combinación con ANA ($0.1 - 0.2$ ó $0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Después de 30 días de cultivo los brotes se transfirieron a MS suplementado con $0.1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BA para inducir alargamiento. El efecto de las diferentes concentraciones de BA se pudo observar en las tres localidades cuando se adicionó $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BA, disminuyendo cuando se utilizó concentraciones más altas ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Un factor importante que afecta la morfogénesis, es el tipo de explante y la edad del mismo. En este estudio, los segmentos de hipocótilos fueron incapaces de formar brotes en todos los cultivos evaluados, mientras que los cotiledones produjeron brotes de alta frecuencia, lo cual sugiere que los cotiledones jóvenes son fisiológicamente mas activos y son fácilmente afectados por factores ambientales y por las hormonas exógenas.

Raveendar, *et al.*, (2008), al utilizar semillas germinadas de caupí (*Vigna unguinata* (L) Walpen), en el medio de cultivo MSB5, eliminaron las radículas, colocaron nudos cotiledonares y se suplementó con BAP en un rango de concentración de 0.5 a 15 μM . Después de 6 días diseccionaron cotiledones y yemas axilares, transfiriéndolos a medio de cultivo fresco, obteniéndose el mejor tratamiento cuando se adicionó 13.3 μM de BAP, lo cual permitió la formación de brotes múltiples.

En relación con la regeneración directa de yemas de tomate de árbol a partir de hipocótilos, en un trabajo realizado por Contreras y Almeida, (2003) el análisis estadístico permitió inferir que el tratamiento con BA + AIA, fué mejor, con respecto a los hipocótilos cultivados en el medio nutritivo con Zeatina. Cuando se trató de inducir la multiplicación clonal de vástagos, se buscó optimizar ésta, sin embargo, no siempre el mayor número es el de más fácil manipulación cuando se trata de individualizar los vástagos para su alargamiento y posterior producción de raíces.

Selvaray, *et al.*, (2006), al utilizar cotiledones como explantes procedentes de semillas germinadas de pepino (*Cucumis sativum* L) en medio de cultivo de MS(62), suplementado con 2.4 D, ANA, AIA y en combinación con BA o Cinetina bajo condiciones de oscuridad formaron callos que posteriormente se cultivaron para inducir el desarrollo de brotes en un medio de cultivo con un suplemento de BA y diferentes concentraciones de AG₃ (0.58 a 2.89 μM) con lo cual se obtuvo un promedio de 36,2 brotes /cotiledón, lo cual indica la necesidad de utilizar la relación hormonal auxina y citocinina y bajo condiciones de oscuridad.

Los hipocótilos han mostrado ser explantes regenerativos de estructuras variadas, así ha sido reportado por Matsouka y Hinata (1979), trabajando con *Solanum melongena* (berenjena). Ellos encontraron tres respuestas diferentes cuando cultivaron los explantes, las cuales dependían de la concentración del ANA en el medio de cultivo. Cuando ésta era de 0.8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, solo formó callo, cuando fue disminuida a 0.016 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, se formaron callos que produjeron raíces adventicias y si la auxina no estaba presente se generaban vástagos adventicios. Al añadir BA al medio, se incrementó la formación de vástagos, pero se inhibió la de raíces y la producción de embriones somáticos.

El tomate de árbol, al igual que otras solanáceas, entre ellas el tabaco (Murashige y Skoog, 1962) y el tomate (Behki y Lesley, 1979), son especies que responden muy bien al ser cultivadas *in vitro*, en términos de regenerar yemas directa o indirectamente, embriones somáticos, plantas haploides, etc., lo cual facilita implementación de cualquier programa dirigido a la propagación clonal masiva y al mejoramiento genético con fines determinados.

En el trabajo desarrollado por Patiño, *et al.*, (2007), los explantes que se sometieron al proceso de selección *in vitro* consistieron en segmentos foliares provenientes de plántulas de tomate de árbol variedad común desarrolladas y conservadas *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación, segmentos de 25-35 mm^2 fueron tomados únicamente a partir de la primera y segunda hojas, contadas desde el extremo apical, las cuales previamente

demonstraron ser las más adecuadas para los procesos de morfogénesis y regeneración *in vitro*.

La propagación sexual del tomate de árbol partenocárpico no es posible, debido a que los frutos presentan muy poca o ninguna semilla, por lo tanto se debe recurrir a métodos de reproducción vegetativa como estacas, injertos, o mediante procedimientos de laboratorio como el cultivo de tejidos *in vitro* (Espinosa, *et al.*, 2005).

2.4 Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. Es importante no sólo porque es el área de la Biotecnología que tiene actualmente mayor aplicación práctica en la agricultura, sino por ser una herramienta versátil para el estudio de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto, el puente necesario para llevar las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo (Roca y Mroginski, 1993)

Comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal) se cultiva asépticamente en un medio de composición definida y se incuba en condiciones ambientalmente controladas. (Street, 1977a).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de Fisiología, Genética, Bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incrementos de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas y f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1993).

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido (Ochoa, 1990).

Al respecto, el mismo autor añade que, la respuesta obtenida con el cultivo *in vitro* de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es indudable que las respuestas, serán de gran valor práctico para estudios básicos, recalcando, que para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo *in vitro* debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras.

2.5 Micropropagación.

La Micropropagación es una técnica de cultivo de tejidos desarrollada en un recipiente de vidrio, el cual permite la manipulación adecuada del material vegetal y su transporte dentro y fuera del laboratorio. El objetivo principal es obtener en forma masiva plantas con idénticas características genéticas a las poseídas por la planta madre, proceso que comienza seleccionando una planta formada (adulta o plántula), la cual se secciona y se cultiva bajo condiciones controladas y asépticas en un medio nutritivo artificial (De la Peña y Rocha, 1992).

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981) y más recientemente en especies leñosas (Thorpe, 1983).

En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, los más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos. (Roca y Mroginski, 1993).

2.6 Organogénesis

Los cultivos de células y tejidos vegetales son capaces de diferenciarse y formar diversos órganos tales como tallos, raíces, hojas y flores. Es un hecho ampliamente demostrado que la formación de estos órganos se realiza totalmente *de novo* sin depender en absoluto de la preexistencia de meristemos iniciales de los mismos (Cornejo y Primo, 1984).

Según los mismos autores, la formación de los nuevos meristemos implica dos fases de crecimiento distintas. La primera de ellas consiste en la desdiferenciación del tejido original sometido a cultivo y que comienza con una aceleración de la división celular y la subsiguiente formación de una masa de tejido indiferenciado. En este proceso todas las células vivas, incluso algunas muy especializadas, son potencialmente capaces de revertir al estado meristemático. La segunda fase consiste en la diferenciación de células y tejidos especializados a partir de las anteriores masas celulares, lo cual demuestra claramente que los cultivos de tejidos son ejemplos excelentes de la persistencia de la totipotencia en las células vegetales.

La organogénesis en cotiledones de *Pinus radiata* es un modelo biológico que permite la formación de brotes a partir de cotiledones aislados de plántulas de 5 a 7 días de

germinación. Un interesante aspecto del modelo, es el hecho de que el proceso organogénico ocurre directamente sin pasar por una fase de callos. Estudios previos (Aitken *et al.*, 1981), indicaron que para que ocurriera la organogénesis, la citocinina era un requisito fundamental. En presencia de BA, los brotes se forman a todo lo largo del cotiledón en contacto con el medio de cultivo; estudiando la cinética del desarrollo de los brotes, fue factible demostrar que la BA interaccionaba con la luz para así poder estimular la formación de brotes después de los 21 días de cultivo (Biondi y Thorpe, 1982; Villalobos *et al.*, 1984).

Aún cuando fue evidente detectar cambios morfológicos en la superficie de los cotiledones, estudios histológicos demostraron que los cambios ocurrían durante las primeras 24 horas (Yeung *et al.*, 1981).

Una de las observaciones más importantes de este modelo, ha sido sin duda el descubrimiento de estructuras observadas sistemáticamente en las capas subepidérmicas de los cotiledones, las cuales presumiblemente tienen un origen en una sola célula. (Villalobos *et al.*, 1984).

2.7 Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. (Rey, H.Y y Mroginski, 1980).

Si el objetivo final es la producción de callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes, que cultivados en condiciones apropiadas, permiten la proliferación de callos. Cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos; por ejemplo, en el caso de numerosas dicotiledóneas herbáceas, se puede lograr la proliferación callosa con relativa facilidad mediante la utilización de explantes provenientes de diversas partes del vegetal. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, hipocotilo, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de frutos (Reinert y Yeoman, 1982).

En el caso de vegetales en los cuales la obtención de callos no esté limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación con microorganismos y rápida respuesta *in vitro*; es probable que en estos casos se opte por explantes provenientes de plantas jóvenes que crecen en invernaderos y una alternativa interesante sería utilizar los provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas (Roca y Mroginski, 1993).

No todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de plantas. La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies que pueden sumarse a *Nicotiana tabacum*, en su característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras (Roca y Mroginski 1993).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado. (Rey *et al.*, 1980).

Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos. La propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Bonga, 1980; Dodds, 1983); en plantas herbáceas, la regeneración de plantas a partir de hojas está limitada al empleo de explantes jóvenes (Mroginski, *et al.*, 1981).

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables. En general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Street 1977 b); otra alternativa es el cultivo de varios explantes en un mismo recipiente, en lugar de su incubación en forma individual.

Se debe tener en cuenta la incidencia de otros factores que a menudo pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados; entre estos factores, están la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o campo. Otro factor serían los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos. (Roca y Mroginski, 1993).

El cultivo de órganos es la modalidad más antigua e incluye el cultivo de raíces, hojas, embriones, anteras, meristemos y otros. Entre ellos el cultivo de anteras, embriones y meristemos revisten especial interés debido a su creciente utilización en la propagación y mejoramiento genético (Espinosa, *et al.*, 2005).

Cuando un órgano es cultivado en medios sintéticos, el patrón de desarrollo puede continuar de manera semejante al que tenía en la planta o cambiar totalmente. Por ejemplo, un embrión aislado de una semilla e inoculado en medio sintético, puede crecer y desarrollarse armónicamente hasta formar una planta completa; sin embargo, dependiendo de los reguladores de crecimiento presentes en el medio, podría favorecerse el desarrollo sólo de los primordios foliares o radiculares del embrión, con lo cual habría un crecimiento desproporcionado de una de las dos partes. Es posible, inclusive, que los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo pudieran inducir el crecimiento irregular y desordenado de las células del embrión, de tal manera que se obtuviera al final una masa amorfa de tejido sin una organización y especialización definida que se conoce como “callo” (Gamborg y Shyluk, 1981).

2.8 Inducción de Callos

Un tejido organizado puede ser completamente alterado para pasar a convertirse en una masa de células indiferenciadas (callo) en rápida proliferación, si se cultiva en un medio nutritivo adecuado que generalmente deberá contener determinadas hormonas de crecimiento específicas tales como Auxina (AIA, ANA, 2,4 D) o Citocininas (Kinetina, BAP...), siendo también importantes las condiciones de iluminación, humedad y temperatura a que se somete el cultivo (Cornejo y Primo, 1984). Generalmente la combinación de las auxinas y las citocininas aumenta fuertemente la inducción del callo, mientras que el efecto de las giberelinas es dudoso.

Los callos pueden mantenerse en crecimiento ya sea en un medio solidificado con agar o bien en un medio líquido con agitación, pudiendo mantenerse en crecimiento por un tiempo indefinido si se transfieren periódicamente a un medio renovado. Los callos de diferentes procedencias pueden aparecer con distinta textura, friabilidad y coloración. Los casos más frecuentes son los callos compactos de crecimiento lento a los friables de crecimiento rápido. En cuanto a la pigmentación pueden variar desde amarillo pálido, verdoso o albino pudiendo citarse también los casos de callos que presentan una pigmentación a causa de las antocianinas que producen (Constabel *et al.*, 1971).

Las células de un callo son inicialmente heterogéneas en cuanto a formas, tamaño, grado de vacuolación, grosor de pared, lignificación, etc. A medida que progresa el crecimiento, es frecuente la aparición progresiva de células diferenciadas en forma de traqueidas, elementos cribosos, células parenquimáticas, meristemáticas, etc., siendo frecuente la aparición de grupos de células de pequeñas dimensiones formando lo que se ha denominado meristemoides que constituyen centros de posterior proliferación celular.

Hoyos, (1996) logró obtener callos friables a partir de explantes de hojas crecidas *in vitro*, en un medio M&S (62), suplementado con 0.1 mg/l de 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y 0.05 mg/l de BAP (6 Bencilaminopurina), con el fin de producir las suspensiones embriogénicas necesarias para la regeneración de material resistente a la acción de toxinas producidas por el hongo *Collectotrichum acutatum* Penz, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.

2.9 Embriogénesis Somática

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979), son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales.

En ciertos aspectos, los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones zigóticos, sin embargo, tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ocurrir algunas anomalías en

el desarrollo, por ejemplo, la fasciación y la fusión de los cotiledones. (Roca y Mroginski, 1993).

La producción de embriones somáticos a partir de cultivos de células, tejidos u órganos puede tener lugar, bien directamente (sin una fase intermedia de callo), bien indirectamente tras alguna forma de cultivo de callo. La embriogénesis directa suele tener lugar, a partir de un explante mantenido en un medio de cultivo sólido y puede utilizarse para la micropropagación de una serie limitada de especies. Sin embargo, la embriogénesis indirecta a partir de suspensiones celulares líquidas resulta particularmente atractiva para la micropropagación, ya que permite mantener la estabilidad genética debido a que puede producirse un número potencialmente elevado de embriones somáticos en pequeños volúmenes de medio de cultivo de manera casi sincrónica y esto permite la mecanización parcial y reduce los costos laborales (Lindsey y Jones, 1992)

Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4 D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de 2.4 D (Halperin y Wetherell, 1964); en consecuencia hay que remover la auxina o usarla en concentraciones más bajas. Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estadios subsiguientes, dependen de la presencia de nitrógeno reducido.

Según Contreras y Almeida (2003), el tomate de árbol puede ser propagado por semillas y estacas, aunque también, reportan la inducción de la embriogénesis somática a partir de hojas de plántulas cultivadas en medio nutritivo MS con 2,4 D ($0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) o ácido Piclorámico ($5.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y sacarosa al 9%. Se obtuvieron callos con potencial embriogénico a los cuales se les realizó estudios histológicos y bioquímicos para seguir el proceso de desarrollo de los embriones somáticos.

En general, la capacidad embriogénica disminuye con el tiempo de cultivo o con los subcultivos continuados, siendo más aptos los tejidos aislados de la planta original o los inmediatamente derivados de los mismos. Las causas de este fenómeno son todavía objeto de controversia achacándose a pérdida de sustancias embriogénicas por las células en cultivo; aunque con los datos existentes hasta el momento parece evidente que se trata de un fenómeno más complejo (Espinosa *et al.*, 2005).

2.10 Medio de cultivo

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores. Los nutrientes orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de

sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Roca y Mrogisnki, 1993)

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

1. La constitución genética de la planta
2. Nutrientes: agua, macro y micro-elementos y azúcares
3. Factores físicos que influyen sobre el crecimiento: luz temperatura, pH, concentraciones de O₂ y CO₂
4. Algunas sustancias orgánicas: reguladores, vitaminas, etc. (Pierik, 1990).

2.11 Efecto de los reguladores de crecimiento

En los cultivos *in vitro*, la inducción de órganos por efecto de la citocininas (BAP), está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción alta con respecto a la auxina. De otro lado, el AIA es una auxina que interviene en el alargamiento y la división celular, estimulando la formación de brotes. En ausencia de citocininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Pero en presencia de la BAP, el efecto que se obtiene por la presencia de la auxina, es una división celular mediada por la citocinina. Sin embargo, un exceso de auxina puede suprimir la división celular y aún, el crecimiento celular. (Espinosa, *et al.*, 2005).

Varios estudios han demostrado que el nivel endógeno de citocininas decrece cuando las plantas están bajo la acción de algún factor de estrés (Hare, *et al*, 1997). Durante el cultivo de tejidos, las células individuales o los tejidos de los explantes se desdiferencian y luego se rediferencian nuevamente dando origen a nuevos tejidos. Esta reprogramación del genoma infringe a las células y/o tejidos una serie de experiencias traumáticas (Madlung y Comai, 2004); además, teniendo en cuenta que en los cultivos de tejidos, los explantes están expuestos a diferentes condiciones de tensión (desequilibrios osmóticos, lesiones causadas en el aislamiento de los tejidos de los explantes, niveles y calidades atmosféricas anormales, etc.) se puede prever que los mismos presentan una alteración en sus niveles de citocininas y posiblemente otros reguladores

Hoyos y Kafuri, (1998), encontraron que para tomate de árbol, un medio de cultivo empleando sales de M&S complementado con 0,1 mg/l de AIA, es adecuado para la propagación de microesquejes de nudo (con una yema).

Obando y Jordan (2001), evaluaron el potencial de regeneración *in vitro* de varios explantes de tomate de árbol y su relación con los cambios de proteínas solubles y fenoles a lo largo de la morfogénesis, habiendo encontrado que los explantes de hoja, en presencia de TDZ (Thiadiazurom), solo o combinado con AIA, inducían inicialmente callos y posteriormente brotes, los cuales se formaron en la superficie abaxial, 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. La mayor tasa de inducción de brotes se obtuvo utilizando TDZ solo (93.3%) y el número de brotes adventicios formados por explante fue el más alto (2,1 a 16.3). Se

observó pardeamiento en algunos de los explantes, los cuales se tornaron necróticos; este fenómeno ocurre en la lámina de la hoja, pero no en los brotes adventicios nuevos, los cuales permanecieron verdes.

Brotes de tomate de árbol subcultivados en presencia de 1.07 μ M ANA (Acido naftalenacético), 0.88 μ M BA y 0.58 μ M AG₃ (Acido giberélico) iniciaron la formación de raíces luego de otras cuatro semanas, obteniéndose plántulas que se desarrollaron rápidamente en un sustrato de suelo no estéril. La regeneración de plantas a partir de las yemas axilares fue del 67%, éstas desarrollaron nuevos brotes en presencia de 0.11 μ M de ANA y 11.41 μ M de Zeatina (Z) y posteriormente se enraizaron en un medio y tiempo similar a los anteriores. Los pecíolos, cotiledones y ovarios formaron directamente embriones somáticos, después de un período de aproximadamente 45 días (Obando y Jordan 2001).

Hoyos, *et al.*, (1998), encontraron que la presencia de BAP en el medio de cultivo, promovió la formación de brotes en los explantes foliares provenientes de hojas jóvenes de plántulas propagadas *in vitro* de las variedades de tomate de árbol común y tomate de árbol rojo o tomoro. La regeneración fue observada en la octava semana y el mayor porcentaje de regeneración (37.5%), se presentó con una concentración de BAP de 2.0 mg/l. Después de 12 semanas de cultivo en la misma concentración de BAP, se obtuvo el 53.83% de regeneración, en tanto que al mayor promedio de brotes/explante fue 4.49.

Espinosa *et al.*, (2005), con el fin de definir el medio de cultivo óptimo, para el establecimiento y desarrollo de segmentos de nudos de tomate de árbol partenocárpico, realizaron un ensayo en el cual se evaluaron 10 tratamientos empleando sales de M&S (62), que contenían 0.5mg/l de Piridoxina, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 2 mg/l de glicina, 20 % (w/v) de sacarosa. Además adicionaron dos reguladores de crecimiento: BAP, en concentraciones de 0.17 a 5.82 mg/l y AIA en concentraciones de 0.19 a 2.31 mg/l; agregaron además, una mezcla de tres antioxidantes (cisteína, ácido ascórbico y caseína hidrolizada), en dosis de 100 mg/l cada una y un pH de entre 5.6 y 5.7 y como agente gelificante Fitagel al 0.17%.

Los mejores resultados se obtuvieron de los nudos que diferenciaron yemas, sobrevivieron y formaron brotes múltiples, cuando se utilizaron reguladores de crecimiento en las combinaciones: 0,17mg/l BAP y 1.25 mg/l AIA – 1.0 mg/l BAP y 2.0 mg/l AIA – 1.0 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA – 5.0 mg/l BAP y 0.5 mg/l AIA – 5.0 mg/l BAP y 2.0 mg/l de AIA. Según Patiño, *et al.*, (2007), para la obtención y regeneración de variantes somaclonales de tomate de árbol con resistencia potencial a la antracnosis, se estudiaron los efectos de dos factores: concentración de la citocinina (BAP) y concentración de filtrado fitotóxico, en el cual utilizaron 4 niveles de concentración de BAP (0, 1, 2, y 3 mg/l⁻¹) en medio de cultivo de M&S (62) y tres niveles de concentración de filtrado con actividad fitotóxica.

Los autores, utilizaron el medio de cultivo MS (62), suplementado con, 3% de Sacarosa, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 0.5 mg/l de piridoxina, 2.0 mg/l de glicina y 0.8 % de agar,

con un pH 5.8. El mayor número de regenerantes por explante, se presentó en aquellos tratamientos en que se utilizó el medio de cultivo con BAP (1 mg/l) y sin filtrado fitotóxico.

2.12 Contaminación.

Las contaminaciones pueden causar pérdidas económicas muy importantes en la micropropagación. La contaminación más que matar a los explantes directamente invade el cultivo haciendo que el explante no sea apto para su micropropagación (Cassells, 1991).

La mayor parte de los contaminantes, en el cultivo de tejidos, proceden de la planta donadora. Al establecer los cultivos y dependiendo del explante que utilizemos, se pueden transmitir microorganismos de la superficie del explante o de su interior. Con el cultivo de meristemos y dependiendo del tamaño del mismo, se pueden eliminar la mayoría de los organismos pero, sin embargo, en el caso de hojas, peciolo y tallos casi todos los microorganismos en el tejido pueden transmitirse. Por lo tanto, es conveniente analizar las plantas de las que proceden los explantes en búsqueda de individuos limpios y rechazando aquellos que están contaminados fuertemente. La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo. (Alonso, 2002)

Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas (fitoplasmas, espiroplasmas y organismos relacionados). Muchos de estos microorganismos se pueden eliminar mediante esterilizaciones superficiales. Los microorganismos endófitos que se pueden desarrollar en las plantas pueden ser virus, viroides, bacterias, micoplasmas y hongos y pueden afectar de forma inter o intracelular. Los microorganismos intercelulares son generalmente transmitidos mediante vectores o mediante el contacto entre plantas sanas e infectadas. Los microorganismos endógenos tanto intercelulares como intracelulares no se pueden eliminar mediante esterilizaciones y pueden desarrollarse en el medio de cultivo de las plantas aunque el crecimiento de algunos puede ser inhibido mediante altas concentraciones de sal o azúcar y el pH. Algunos de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables como la transferencia de los explantes a un medio nuevo especialmente cuando se reduce la concentración de sales y de azúcar en el medio. (Alonso, 2002)

Se puede detectar la presencia de organismos cultivables mediante uso de medios específicos para hongos y bacterias. (Alonso, 2002)

Las plantas contaminadas pueden tratarse mediante termoterapia y/o cultivo de meristemos o también aplicando productos antifúngicos, antibióticos y antivíricos a las plantas aunque en ocasiones estos compuestos químicos pueden tener efectos bioestáticos más que biocidas. (Alonso, 2002)

Las contaminaciones posteriores pueden proceder de una técnica poco adecuada o procedimientos que pueden ser potencialmente controlados como las malas prácticas en el

laboratorio o infestación con insectos o ácaros. Las contaminaciones debidas a las técnicas o procedimientos de cultivo proceden del instrumental utilizado, como levaduras que pueden sobrevivir la esterilización mediante alcohol, esporas de bacterias resistentes al calor como *Bacillus sp* que pueden sobrevivir altas temperaturas o bacterias que provienen del micropropagador. Los microorganismos pueden proceder también de un fallo en la campana de flujo laminar y de una esterilización insuficiente del medio de cultivo o del equipo. (Alonso, 2002).

2.13 Hiperhidricidad (Vitrificación)

La hiperhidricidad se denomina también vitrificación, translucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad.

Produce la aparición de características atípicas en las plantas cultivadas *in vitro* a nivel anatómico, morfológico y fisiológico (George, 1996a). Las características de plantas vitrificadas son una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, una reducción en la producción de las ceras epicuticulares combinado con una gran pérdida de agua, una distorsión del movimiento de los estomas y una anatomía anormal de hojas, tallos y raíces. La baja tasa de supervivencia de las plantas vitrificadas se debe a una inestabilidad de los tallos, hojas cloróticas y retorcidas y una incontrolada pérdida de agua (Reuther, 1988).

Los brotes afectados presentan entrenudos cortos y los brotes apicales aparecen con fasciaciones. (La fasciación es una condición del crecimiento de una planta en la cual el meristema apical, que normalmente se concentra alrededor de un sólo punto y produce tejido más o menos cilíndrico, se alarga de forma perpendicular a la dirección de crecimiento). Esto produce tejidos aplanados, en forma de cintas, crestados o sinuosos. Este fenómeno puede ocurrir en el tallo, las hojas, la raíz, el fruto o las flores. (Debergh y Read, 1991).

La fasciación, también conocida como crestación o cristación, puede ser provocada por una mutación en las células meristemáticas, por una infección bacteriana, ataques de insectos o parásitos, o daño químico o mecánico. (Debergh y Read, 1991).

Normalmente los brotes aparecen hinchados, de color verde claro y las hojas son traslúcidas o acuosas o bien de un color verde más oscuro y más gruesas. Se puede producir también una reducción de la dominancia apical produciéndose grupos de brotes atrofiados. Las plantas afectadas no suelen sobrevivir *ex vitro* (George, 1996a). La hiperhidricidad es uno de los efectos fisiológicos que puede ocasionar plantas aberrantes.

La saturación de vapor de agua y la acumulación de etileno y CO₂ en recipientes de cultivo sellados se considera que tienen un efecto en el grado de vitrificación. Sin embargo, la composición y la consistencia del medio también influyen en las propiedades estructurales: un alto contenido en citocininas y un bajo contenido en agar en el medio sólido o el

crecimiento en medio líquido contribuyen al deterioro (Reuther, 1988). Una de las posibles causas de la hiperhidricidad es el fallo de la biosíntesis de lignina (George, 1996a).



Figura 1 Hiperhidricidad o Vitrificación en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth Cav. en medio de cultivo (MS -62) en condiciones *in vitro*.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en Laboratorio de Fisiología Vegetal, de la Universidad de Nariño los cuales se encuentran ubicados en la Sede Principal en Torobajo (San Juan de Pasto, Departamento de Nariño - Colombia) a una altitud de 2.600 msnm con una temperatura promedio interna de 35°C y 23°C, respectivamente, y una humedad relativa promedio de 85% y 30 %, respectivamente.

3.2 Material Vegetal.

3.2.1 Semilla Sexual.

Las plantas de tomate de árbol fueron seleccionadas en una zona apta para su cultivo, correspondiendo al Municipio de San Juan de Pasto, Corregimiento de la Caldera, Vereda La Campiña, Finca La Campiñita, la cual se encuentra a una altura de 1900 msnm con una temperatura promedio de 18°C y una humedad relativa del 70%.

La semilla sexual, se obtuvo a partir de frutos en estado de madurez de cosecha, seleccionados de plantas tomadas al azar, con las mejores características morfológicas, fisiológicas, de producción y sanidad.

Una vez los frutos se encontraban en el Laboratorio, se procedió a extraer las semillas, separándolas de la pulpa, utilizando una espátula y colocándola sobre papel absorbente, en condiciones de baja luminosidad y secadas al aire a una temperatura aproximada de 28°C y almacenadas a temperatura de 10°C hasta el momento de ser utilizadas.

Transcurrido un periodo de 15 días, se procedió a eliminar todo tipo de impurezas, lo que permitió determinar en 10 frutos, el promedio en longitud de 6.9 cm, en diámetro promedio de fruto 4.72cm, en peso promedio de fruto 144.088 g y con un número promedio de semillas de 239.1

De igual forma, se hizo conteos de semillas en grupos de 100 a los cuales se les determinó el peso fresco, obteniendo un promedio de 0.7283 gramos

Determinadas las anteriores características, se procedió a realizar la Prueba de Viabilidad con 2,3,5 Cloruro de Trifenil Tetrazolium

3.2.2 Prueba de Viabilidad.

El objetivo de la Prueba de Viabilidad con 2,3,5 Cloruro de Trifenil Tetrazolium, es suministrar una estimación del Porcentaje de Germinación, lo cual consistió en tomar indiscriminadamente 100 semillas, las que se sometieron al acondicionamiento para la

prueba, dejándolas en proceso de imbibición durante 24 horas a 30°C, para permitirles dar el color natural y la activación del embrión, al término del cual se procedió a seccionarlas longitudinalmente por la mitad, descartando la otra mitad, colocándolas enseguida en la solución. Antes de la interpretación se retiraron las cubiertas para facilitar el análisis.

Después de que la coloración progreso hasta la intensidad deseada (rojo brillante) se eliminó la solución y se lavó repetidas veces con agua destilada, dejándolas con el último lavado (si se dejan secar, se presentan colores anormales).

Como el Tetrazol se reduce lentamente a un pigmento rojo insoluble, bajo la acción de la luz, las semillas se colocaron a la oscuridad por 2 horas durante el periodo de coloración.

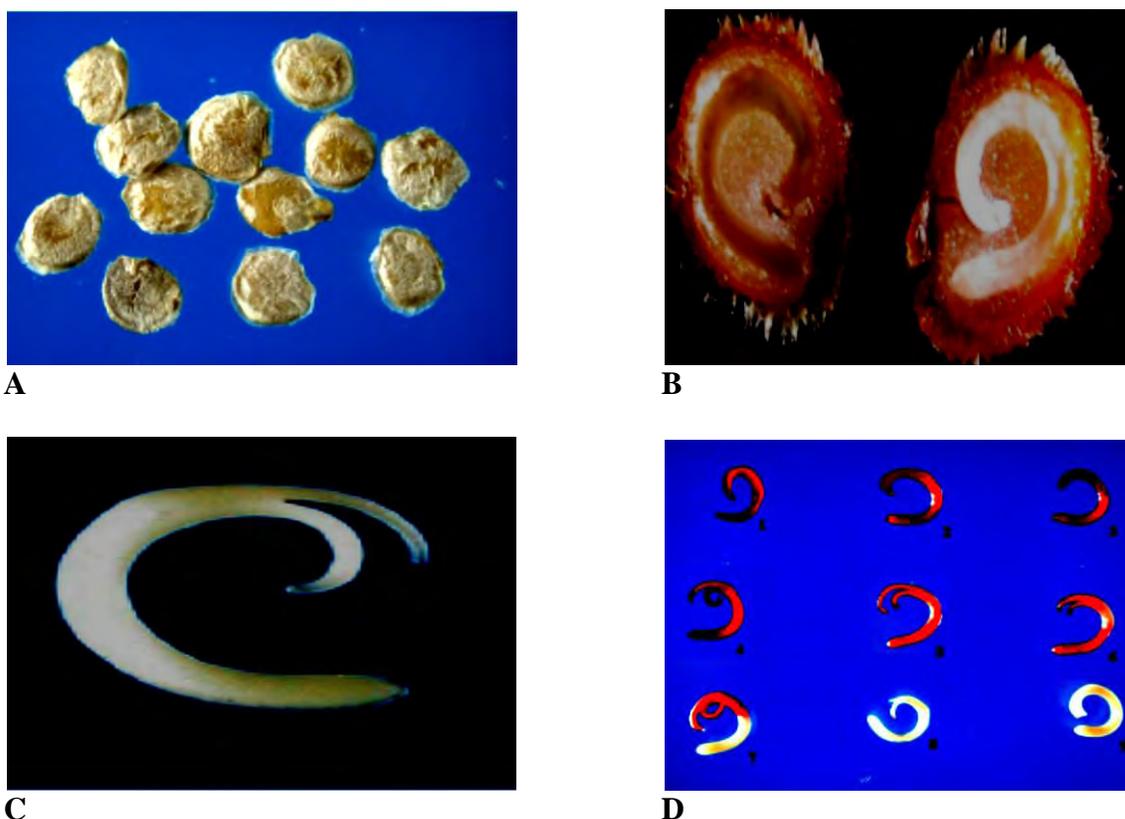


Figura 2. Secuencia de la Prueba de TZ: A) Semillas imbibidas por 24 horas; B) Semillas seccionadas mostrando posición del embrión; C) Embrión aislado de la envoltura; D) Embriones teñidos después de la prueba de TZ (Escala 1-9).

No todos los embriones de una prueba determinada, desarrollan simultáneamente la coloración rojo brillante más deseable para la interpretación. Algunas se tiñen rápidamente, otras lo hacen lentamente. Cuando el promedio de intensidad en la coloración ha alcanzado el punto óptimo, la prueba se da por terminada (Figura 2).

Terminada la prueba se pudo determinar según la tinción, en un escala de uno a nueve, que un 65% de los embriones presentaron tinción completa (1 a 6) las que se consideran normales y de 7 a 9 tinción incompleta o sin tinción, lo que representa que son embriones que presentan dificultades en el proceso de germinación, considerándose como anormales.. (Figura 1 D).

3.2.3 Prueba de Germinación en Cámara Húmeda

Para determinar Porcentaje de Germinación, se hizo el montaje de cámara húmeda que consistió en utilizar bandejas de germinación de vidrio las cuales se acondicionaron con una capa de papel absorbente humedecido en la base, sobre la cual se colocaron las semillas que previamente se sometieron a un proceso de desinfección con una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) - (Clorox) a una concentración del 2% durante 15 minutos, las que posteriormente se enjuagaron con agua destilada, haciendo 5 lavados; enseguida se colocaron a imbibición durante 24 horas en una solución de AG₃ a una concentración de 1000 ppm.

Al cabo de este tiempo se procedió a distribuir las semilla , colocando otra capa de papel absorbente humedecido sobre las mismas, tapando con un vidrio transparente la bandeja (Figura 3).

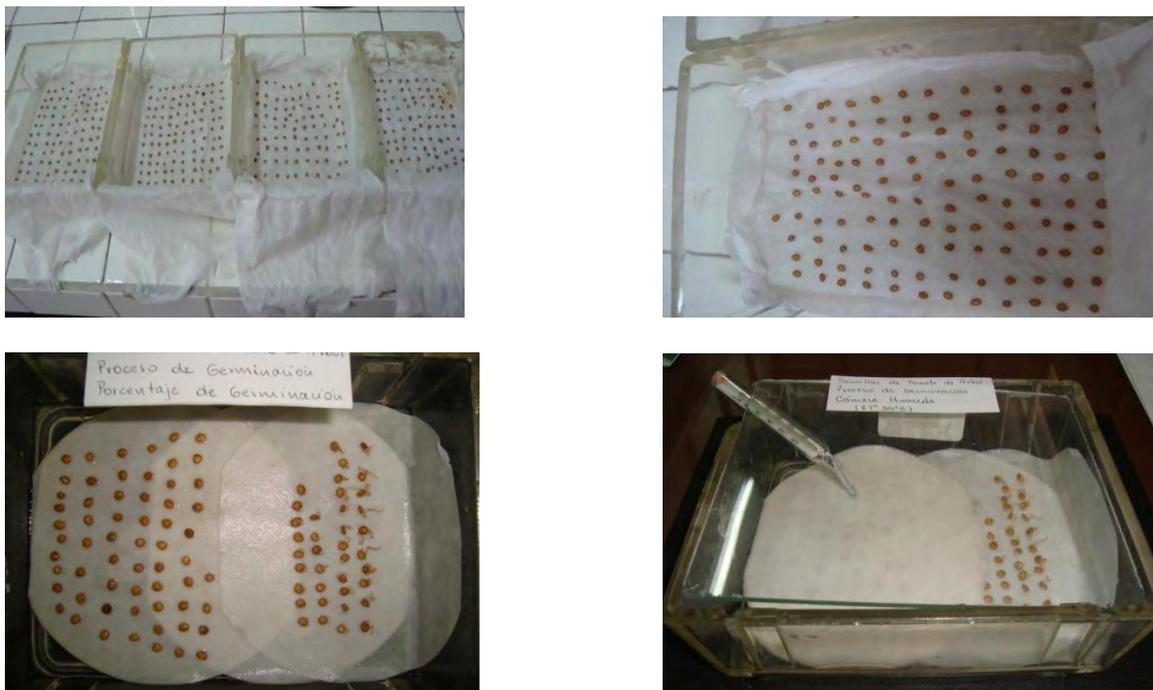


Figura 3. Montaje de Cámara Húmeda con semillas de tomate de árbol

Las bandejas se colocaron en condiciones de oscuridad por un periodo de 15 días en una estufa a 30°C, tiempo durante el cual se mantuvieron humedecidas. Al cabo del mismo, se

retiraron y se llevaron al Laboratorio de Cultivo de Tejidos, ahí permanecieron en condiciones de luz artificial (12 horas luz/día), a una temperatura de 24°C (\pm 2 °C), humedad relativa del 65%, y se mantuvieron humedecidas durante el periodo de la evaluación.

Después de 25 días de haber realizado la siembra, se procedió a evaluar el porcentaje de germinación, obteniendo un 52% de semillas germinadas

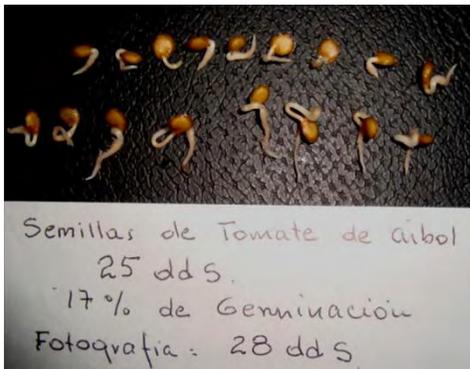


Figura 4. Proceso de Germinación de semillas de tomate de árbol: A) Emergencia de Radícula. B) Desarrollo de Radícula. C) Desarrollo de Radícula – Desarrollo de Hipocótilo. D) Proceso general de Germinación

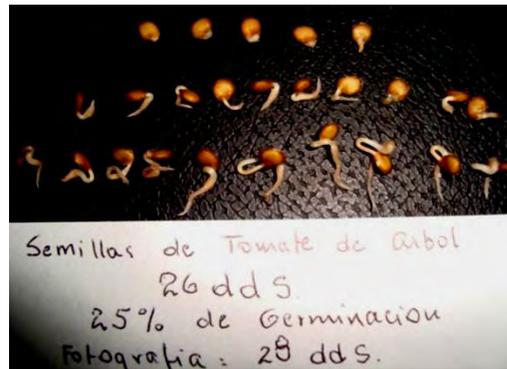
Realizadas las respectivas observaciones, se pudo determinar que hubo un 49% de semillas germinadas, lo que representa dentro de los estándares, un bajo porcentaje de germinación. (Figura 4 – Figura 5)



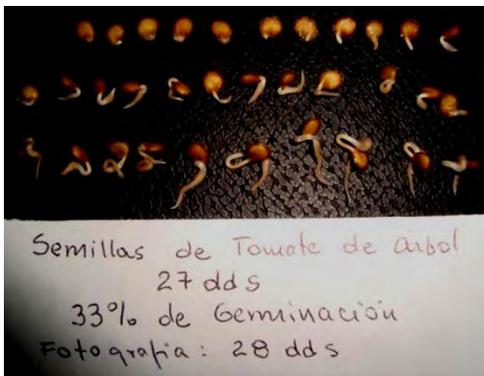
Figura 5. Semillas de tomate de árbol en proceso de germinación en Bandejas de Germinación.



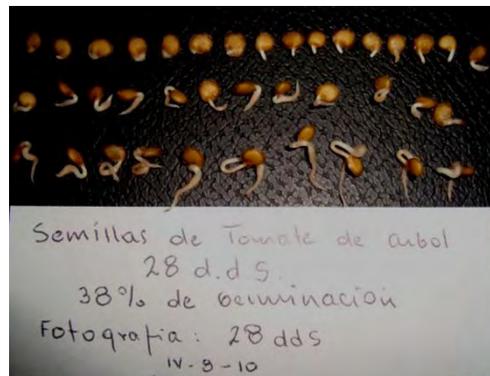
A



B



C



D

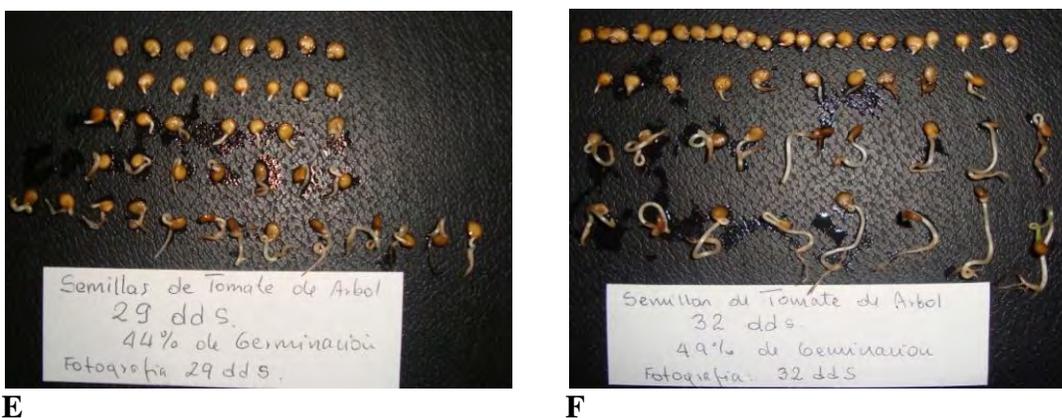


Figura 6. Observaciones del Proceso de germinación. A) 25 dds. B) 26 dds. C) 27 dds. D) 28 dds. E) 29 dds. F) 32 dds.

De acuerdo a lo descrito anteriormente se puede reportar, que las semillas de tomate de árbol realizan su proceso de germinación entre los 25 y 34 días (Figura 6).

3.3 Preparación del Medio de Cultivo

Para el medio de cultivo, se preparó soluciones concentradas, teniendo en cuenta, aquellas que proporcionan elementos mayores, elementos menores, y aquellas que por incompatibilidad deben prepararse por separado, principalmente la solución de hierro y EDTA y la de Yoduro de Potasio. (Anexo 1)

Estas soluciones se prepararon previamente y en el volumen necesario para posteriores preparaciones y en concentración de 20 ppm, las cuales se mantuvieron en recipientes de vidrio color ambar y bajo condiciones de refrigeración y a la oscuridad.

Al momento de preparar el medio de cultivo y realizados los respectivos cálculos para el medio de cada uno de los tratamientos y sus componentes, se procedió a hacer las diluciones para el volumen requerido, con las adiciones necesarias de los suplementos, llevando posteriormente a la toma de pH a 5.7 y seguido de la dosificación en cada uno de los contenedores.

Se esterilizó en un autoclave marca DRESS a una temperatura de 121 °C a 15 p.s.i. durante 20 minutos, al cabo de los cuales se dejó enfriar, quedando el medio en condiciones adecuadas para ser utilizado en la siembra.

3.4 Obtención de semillas y siembra en medio de cultivo

De frutos maduros, se obtuvieron las semillas mediante el proceso de fermentación en agua 48 horas eliminando completamente el mucílago (arilo) que cubre la semilla y su posterior secado con aire circulante a 25°C durante 24 horas.

Después del secado, se procedió a hacer desinfección con lavados a presión con agua de grifo, seguido de un lavado con jabón líquido hospitalario al 5% más dos gotas de Tween 20 durante diez minutos y cinco posteriores lavados para eliminar residuos de jabón.

Se preparó una solución de un producto comercial a base de gluconalato al 5% (Aseptibac) más dos gotas de Tween 20 para prevenir la infección por bacterias a la semilla, haciendo luego cinco lavados con agua destilada estéril y dejando las semillas con el último; posteriormente se procedió a hacer la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, utilizando hipoclorito de sodio (NaOCL) al 4% más dos gotas de Tween 20, durante cinco minutos, procediendo luego a hacer cinco lavados para eliminar residuos del producto.

Posteriormente se procedió a sembrar 15 semillas en cada contenedor (frascos de vidrio de 125 ml), los cuales contenían 12 mililitros de medio de cultivo basal (M-S 62), previamente esterilizado a 121 °C, a 15 p.s.i. durante 20 minutos. El medio de cultivo se preparó previamente, teniendo en cuenta el protocolo de preparación del mismo y siguiendo los esquemas de concentración como se presenta en el Cuadro 4:

La siembra se realizó bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar.

Una vez sembradas, se llevaron los contenedores al cuarto de incubación, el cual tiene condiciones de 24°C de temperatura en promedio, con un fotoperiodo de 16 horas luz, una intensidad lumínica de 2000 lux en estantería metálica con luz día y un humedad relativa del 65%.

A partir de la siembra en medio de cultivo y desde el momento en que fueron ubicados los contenedores en el cuarto de incubación, se hicieron observaciones y el registro del proceso de germinación, hasta obtener el suficiente material de semillas germinadas para proceder a hacer las respectivas disecciones, según lo establecido en el diseño experimental y según cada uno de los tratamientos.

Los explantes que fueron sometidos al proceso de cultivo in vitro procedieron de semilla sexual germinada en medio de cultivo y desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Institución.

Las semillas cultivadas en medio de cultivo, se consideraron germinadas, cuando hubo emergido la radícula o alcanzado una longitud entre 2 y 4 mm (Meza y Manzano, 2007).

3.5 Obtención de explantes a partir de semilla sexual germinada.

3.5.1 Obtención de Explantes – SEGMENTOS DE HOJA

Dichas estructuras vegetativas (explantes – Segmentos de Hoja), se obtuvieron de semillas germinadas y plántulas en formación (Figura 7).



Figura 7 Contenedores con semillas germinadas y plántulas para la obtención de Segmentos de Hoja

De las hojas formadas (primer par de hojas verdaderas o primordios foliares en formación) se segmentaron pequeños explantes, de los que se sembraron 5 por contenedor en medio de cultivo según el correspondiente tratamiento (Figura 8).



A-1



A-2



B



C



D



E

Figura 8 A-1; A-2) Primordios foliares y primer par de hojas. B) Segmentos de Hojas para siembra en medio de cultivo C) y D) Siembra de Segmentos de Hoja E) Distribución de contenedores en cuarto de incubación

El procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, en el área de siembra en condiciones de cámara de flujo laminar bajo estrictas normas de asepsia para evitar al máximo la contaminación por microorganismos patógenos.

3.5.1.1 Diseño Experimental.

La presente investigación se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio (Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Nariño), para la cual se utilizó un Diseño Irrestrictamente al Azar para cada uno de los explantes utilizados, con 10 tratamientos y 10 repeticiones donde:

Cuadro 1 Tratamientos hormonales empleados para los explantes correspondientes a Segmentos de Hojas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.).

Explante Hoja	Hormona/Relación Hormonal	Concentracion	Nº Tratamiento
HOJAS	AIA	0.6 ppm	1
		0.8 ppm	2
		1.0 ppm	3
	AIA + BAP	0.6 ppm + 1.0 ppm	4
		0.8 ppm + 1.0 ppm	5
		1.0 ppm + 1.0 ppm	6
	AIA + CIN	0.6 ppm + 1.5 ppm	7
		0.8 ppm + 2.0 ppm	8
		1.0 ppm + 2.5 ppm	9
	TESTIGO	0 HORMONAS	10

Además, la unidad experimental estuvo conformada por un contenedor de 125 ml., con 5 fragmentos de hoja (explantes).

3.5.2 Explante - HIPOCÓTILO

Los explantes utilizados (segmentos de 5 mm de hipocótilo), se obtuvieron de semillas germinadas en estado de emergencia (cuello de cisne)

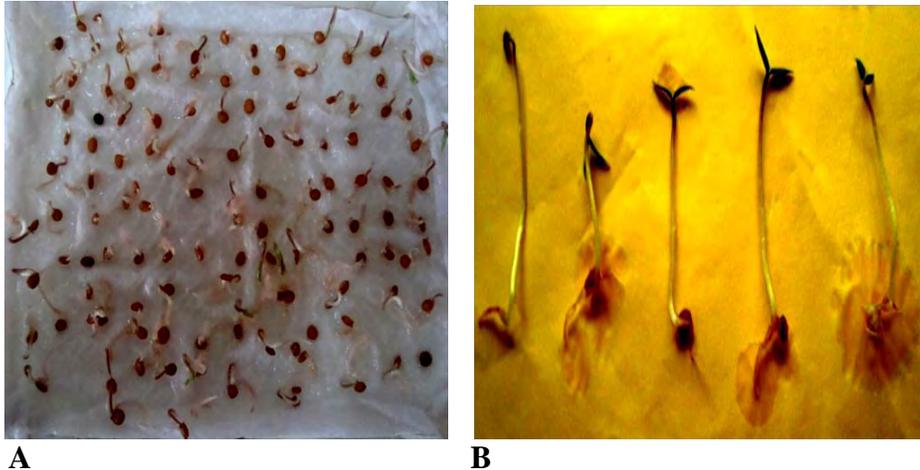


Figura 9 A) Semillas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav). germinadas en bandeja de germinación. B) Aislamiento de plántulas para disección de Hipocótilo.

Una vez germinadas las semillas en condiciones de bandeja de germinación se procedió a aislarlas, para su posterior disección en segmentos de 5 mm de hipocótilo (Figura 9).

Se considera que las plántulas bajo estas condiciones están expuestas a contaminación por el medio ambiente circundante a las bandejas, lo que significó que se presente alta contaminación por patógenos en el medio de cultivo, pese a un proceso de desinfección, tanto de la semilla antes de su siembra, como las plántulas previo el proceso de disección.

Con este antecedente, nuevamente se volvió a sembrar semillas de tomate de árbol, previa una desinfección, en condiciones de medio de cultivo (Figura 10 A y B)



Figura 10 Semillas en proceso de germinación con la diferenciación del hipocótilo

Germinadas las semillas en condiciones asepticas, nuevamente se procedió a diseccionar los hipocótilos y su posterior siembra.

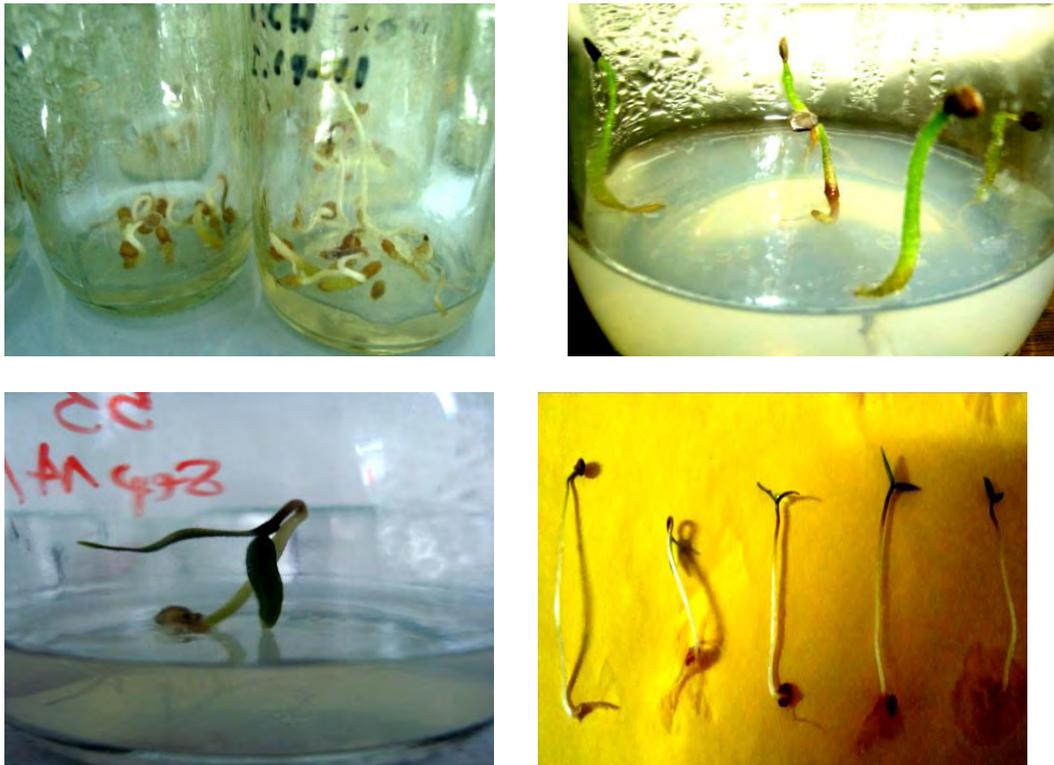


Figura 11 Hipocótilos para proceso de disección

3.5.2.1 Diseño Experimental.

La actividad de siembra de segmentos (5mm) de hipocótilos se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio (Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad

de Nariño), para la cual se utilizó un Diseño Irrestrictamente al Azar, con 10 tratamientos y 10 repeticiones donde:

Cuadro 2 Tratamientos hormonales según diseño experimental para Explante Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.).

Explante Hipocótilo	Hormona/Relación hormonal	Concentración	Nº Tratamiento
HIPOCOTILO	AIA	0.6 ppm	1
		0.8 ppm	2
		1.0 ppm	3
	AIA + BAP	0.6 ppm + 1.0 ppm	4
		0.8 ppm + 1.0 ppm	5
		1.0 ppm + 1.0 ppm	6
	AIA + CIN	0.6 ppm + 1.5 ppm	7
		0.8 ppm + 2.0 ppm	8
		1.0 ppm + 2.5 ppm	9
	TESTIGO	0 HORMONAS	10

Teniendo en cuenta el diseño experimental planteado se utilizaron 10 tratamientos, con 10 repeticiones, correspondiendo a una unidad experimental cada contenedor con 3 fragmentos de hipocótilo (explantes) .

Al realizar la siembra de los explantes en este medio de cultivo con modificación respecto a las concentraciones hormonales, después de un periodo de 2 meses no se pudo observar respuesta alguna, por lo que se tomó la decisión de hacer unos ajustes a las concentraciones hormonales y cambio de las mismas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos hormonales con cambio de auxina según diseño experimental para explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. (*Senth*) Cav.)

Explante Hipocótilo	Hormona/Relación Hormonal	Concentración	Nº Tratamiento
HIPOCOTILO	2,4 D	1.5 ppm	1
		2.0 ppm	2
		2.5 ppm	3
	2,4 D + BAP	1.5 ppm + 1.0 ppm	4
		2.0 ppm + 1.0 ppm	5
		2.5 ppm + 1.0 ppm	6
	2,4 D + CIN	1.5 ppm + 2.0 ppm	7
		2.0 ppm + 2.0 ppm	8
		2.5 ppm + 2.0 ppm	9
	TESTIGO	0 HORMONAS	10

Una vez fueron sembrados los segmentos de hipocotilo en este medio modificado, al igual que el anteriormente mencionado no se pudo observar respuestas, pero se visualizó que el tejido se necrosaba más rápidamente.

El no encontrar respuestas de los explantes, se procedió a hacer una nueva modificación del medio, como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos según diseño experimental con medio modificado para explante - Hipocótilo con cambio en hormonas, concentraciones hormonales y dilución de M-S (62) en tomate de árbol (*Solanum betaceum* (*Senth*) Cav)..

Explante Hipocótilo	Hormona/Relación Hormonal	Concentración	Nº Tratamiento
HIPOCOTILO	AIA + BAP	0.2 ppm + 1 ppm	1
		0.2 ppm + 2 ppm	2
		0.2 ppm + 3 ppm	3
	3/4 M.S AIA + BAP	0.2 ppm + 1.0 ppm	4
		0.2 ppm + 2.0 ppm	5
		0.2 ppm + 3.0 ppm	6
	1/2 M.S AIA + CIN	0.2 ppm + 1.0 ppm	7
		0.2 ppm + 2.0 ppm	8
		0.2 ppm + 3.0 ppm	9
	M.S. Completo TESTIGO AIA	2 ppm	10

3.5.3 Explante - HOJAS COTILEDONARES

Para la obtención de estos explantes se procedió a sembrar semillas de tomate de árbol en medio de cultivo sin hormonas, una vez estas germinaron se retiraron del contenedor, bajo condiciones de cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

Retiradas las plántulas del contenedor, se procedió a eliminarles la cubierta y diseccionar la raíz (Figura 12) para su posterior siembra en el medio de cultivo (Figura 13)



Figura 12 Plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) a las cuales se les retiró la cubierta y se diseccionó la raíz para la obtención de explantes – Hojas Cotiledonares.



Figura 13 Hojas Cotiledonares sembradas en el contenedor en medio de cultivo según el tratamiento asignado.

3.5.3.1 Diseño Experimental.

Se utilizó un Diseño Irrestrictamente al Azar para cada uno de los explantes utilizados, con 10 tratamientos y 10 repeticiones donde:

Cuadro 5 Tratamientos según diseño experimental con medio de cultivo MS(62) para explante - Hojas Cotiledonares en tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav).

EXPLANTE	Hormona/Relación Hormonal	Concentración	No. Tratamiento
COTILEDONES	AIA	0.6 ppm	1
		0.8 ppm	2
		1.0 ppm	3
	AIA + BAP	0.6 ppm + 1.0 ppm	4
		0.8 ppm + 1.0 ppm	5
		1.0 ppm + 1.0 ppm	6
	AIA + CIN	0.6 ppm + 1.5 ppm	7
		0.8 ppm + 2.0 ppm	8
		1.0 ppm + 2.5 ppm	9
	TESTIGO	O HORMONAS	10

Teniendo en cuenta el diseño experimental planteado se utilizaron 10 tratamientos, con 10 repeticiones, correspondiendo a una unidad experimental cada contenedor con 3 hojas cotiledonares (explantes) .

Las unidades experimentales, correspondieron a un contenedor (frasco de 125 mililitros de volumen) el cual contenía el medio de cultivo, según el tratamiento asignado, como sustrato a los explantes.

Para los tres tipos de explantes, todos los contenedores se distribuyeron, teniendo en cuenta los tratamientos, en condiciones de cuarto de incubación (Figura 14)



Figura 14. Distribución de contenedores con explantes – Hojas Cotiledonares teniendo en cuenta los tratamientos en el cuarto de incubación.

3.6 EVALUACIONES

Las variables que se tuvieron en cuenta en la evaluación para cada uno de los explantes se describen considerando que solamente se evaluaron, Oxidación Fenólica, Mortalidad, Supervivencia y Formación de Callo para Segmentos de Hoja e Hipocótilos teniendo en cuenta los resultados que a continuación se describen, no se presentaron resultados para explante Hojas Cotiledonares, puesto que el periodo propuesto para dichas evaluaciones, no fue el suficiente, esto no permitió llegar a tener ningún resultado, puesto que pocos días después de la primera siembra hubo total mortalidad y fue necesario descartar este explante.

Las evaluaciones propuestas en el proyecto, excluyendo las anteriormente mencionadas no se tuvieron en cuenta, pues los resultados no fueron los esperados y lo que se propuso fue hasta la obtención de plantas completas y adaptadas a condiciones de campo.

3.6.1 Evaluaciones Explantes – Segmentos de Hoja

3.6.1.1 Oxidación Fenólica del explante – Segmentos de Hoja

Se tuvo en cuenta esta evaluación, asumiendo que cuando se hace daños mecánicos en el tejido vegetal, existen especies vegetales que segregan fenoles que llevan a la oxidación. Teniendo en cuenta este criterio se realizaron doce observaciones visuales (semanalmente, entre los meses de Febrero y Junio de 2011) en todos y cada uno de los tratamientos y se evaluó teniendo en cuenta la fenolización en el tejido (explante) de acuerdo a como se iba manifestando por cambio de color.

El grado de Oxidación Fenólica de los explantes - Segmentos de Hoja se comenzó a evaluar desde la siembra (31 de enero de 2011) contando 130 días después de la siembra de explantes en el medio de cultivo (Junio 10 de 2011) (Figura 15); utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no oxidación fenolica en una escala de 1 a 4 donde; 1= ausencia de oxidación fenólica, 2= oxidación leve, 3= oxidación moderada y 4 = oxidación intensa en cada uno de los explantes (5) de cada contenedor y por repetición (10) basada en la intensidad de la oxidación observada en los explantes.



Figura 15 Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav). sembrados en medio de cultivo

De acuerdo a las observaciones se fue calificando (-5) cuando no existía Oxidación Fenólica en ninguno de los explantes y así sucesivamente hasta (+5) cuando la oxidación abarcaba todos los explantes; con estos valores se fue determinando la Oxidación Fenólica durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -5 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +5 equivalente al 100%.

3.6.1.2 Mortalidad de explante - Segmentos de Hoja

Al presentarse oxidación y necrosamiento de tejidos, el explante no sobrevive, lo cual puede conducir a la muerte total del mismo.

La Mortalidad de los explantes - Segmentos de Hoja se comenzó a evaluar, conjuntamente con las otras variables, desde la siembra (31 de enero de 2011) contando 130 días después de la inoculación de explantes en el medio de cultivo (Junio 10 de 2011) (Figura 16) utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no mortalidad, en cada uno de los explantes (5) de cada contenedor y por repetición (10) basada en la intensidad oxidativa del explante, observada macroscópicamente en los explantes.



Figura 16 Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) en proceso de Oxidación Fenólica la cual conduce a la muerte del explante.

De acuerdo a las observaciones se fue calificando (-5) cuando no existía Mortalidad en ninguno de los explantes y así sucesivamente hasta (+5) cuando la Mortalidad abarcaba todos los explantes; con estos valores se fue determinando la Mortalidad durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -5 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +5 equivalente al 100% .

3.6.1.3 Sobrevivencia explante – Segmentos de Hoja

Si los tejidos respondieron favorablemente al daño mecánico, a la no oxidación, al no necrosamiento y no hubo mortalidad, es posible que haya respuesta al medio de cultivo en el cual fueron inoculados y biológicamente y fisiológicamente manifiesten visiblemente, la respuesta (Figura 17); se evaluaron a partir de la siembra con observaciones diarias en todos y cada uno de los tratamientos.

De acuerdo con las observaciones se fue calificando (-5) cuando los explantes no Sobrevivieron en ninguno de los contenedores y así sucesivamente hasta (+5) cuando la Sobrevivencia abarcaba todos los explantes; con estos valores se fué determinando la Sobrevivencia durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -5 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +5 equivalente al 100% .



Figura 17 Sobrevivencia de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Senth*) Cav.). como respuesta al medio de cultivo y a la relación hormonal durante los periodos de evaluación.

3.6.1.4 Formación de Callo explante - Segmentos de Hoja

Dependiendo del tipo de explante y con los suplementos hormonales en el medio de cultivo podrán presentarse formaciones de callo (Figura 18) o directamente la organogénesis. Este parámetro se evaluó desde el día de la siembra y periódicamente cada 5 días, la formación de callo (s) en cada uno de los tratamientos, por observación visual.



Figura 18. Detalle de la formación nodular con zonas verdes embriogénicas en hojas de tomate de árbol (*Solanum betaceum (Senth) Cav.*).

De acuerdo a las observaciones se fue calificando (-5) cuando los explantes no presentaban formación de callo en ninguno de los contenedores y así sucesivamente hasta (+5) cuando la formación de callo se presentaba en todos los explantes; con estos valores se fué

determinando la formación de callo durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -5 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +5 equivalente al 100% .

3.6.2 Evaluaciones Explante - HIPOCOTILO

Después de realizadas dos siembras, como anteriormente se explica en metodología, por contaminación y falta de respuesta al medio de cultivo, a las concentraciones hormonales (Figura 19 A), se realizó una segunda siembra M-S 2,4 D; 2,4 D + BAP; 2,4 D + CIN y finalmente se obtuvo algunas respuestas con el medio modificado correspondientes al medio modificado MS; 3/4 M.S, 1/2 M.S + AIA+ BAP y AIA + CIN (Cuadro 4).

3.6.2.1 Oxidación Fenólica del explante – Hipocótilo

El grado de Oxidación Fenólica de los explantes - Hipocótilos - se comenzó a evaluar desde la siembra a la primera evaluación (1 de Septiembre de 2011 hasta Octubre 30 de 2011) contando 60 días después de la siembra de explantes en el medio de cultivo, un total de 7 observaciones en todos y cada uno de los tratamientos y se evaluó teniendo en cuenta la fenolización en el tejido (explante - Hipocótilo) de acuerdo a como se iba manifestando por cambio de color (Figura 19 B); utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no Oxidación Fenólica (1 = ausencia de Oxidación Fenólica, 2 = Oxidación leve, 3 = Oxidación moderada y 4 = Oxidación intensa) en cada uno de los explantes (3) de cada contenedor y por repetición (10) basada en la intensidad de la Oxidación observada en los explantes.

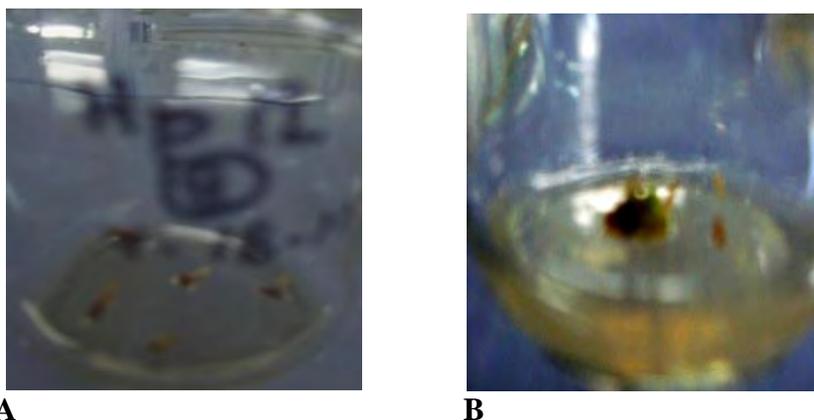


Figura 19 Oxidación de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* *Senth*) Cav.: A) Primera siembra en MS con las relaciones hormonales propuestas inicialmente. B) Tercera siembra en MS modificado, cambio hormonal y relación hormonal.

Se tuvo en cuenta esta evaluación, asumiendo que cuando se hace daños mecánicos en el tejido vegetal, existen especies vegetales que segregan fenoles que llevan a la oxidación.

Entre los 7 y 60 días de cultivo, los Hipocótilos, según los tratamientos presentaron Oxidación Fenólica en los bordes y en la base del mismo que se encontraba o no en contacto con el medio de cultivo y otros sobre la superficie del explante, la que se fue agudizando a través del tiempo hasta los 60 días (última evaluación) por encontrarse en estado de necrosamiento del tejido y posterior muerte del mismo.

De acuerdo con las observaciones se fue calificando (-3) cuando no existía Oxidación Fenólica en ninguno de los explantes y así sucesivamente hasta (+3) cuando la Oxidación abarcaba todos los explantes; con estos valores se fue determinando la Oxidación Fenólica durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -3 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +3 equivalente al 100%.

3.6.2.2 Mortalidad de explante - Hipocótilo

Al presentarse oxidación y necrosamiento de tejidos, el explante no sobrevive, lo cual puede conducir a la muerte total del mismo.

La Mortalidad de los explantes - Hipocótilo - se comenzó a evaluar, conjuntamente con las otras variables, desde la siembra a la primera evaluación (1 de Septiembre de 2011 hasta 30 de Octubre de 2011) contando 60 días después de la inoculación de explantes en el medio de cultivo (Figura 20) utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no Mortalidad, en cada uno de los explantes (3) de cada contenedor y por repetición (10) basada en la intensidad oxidativa del explante, observada macroscópicamente en los explantes.



Figura 20 Explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) necrosado por Oxidación Fenólica en proceso de Mortalidad

De acuerdo con las observaciones se fue calificando (-3) cuando no existía Mortalidad en ninguno de los explantes y así sucesivamente hasta (+3) cuando la oxidación abarcaba todos los explantes; con estos valores se fue determinando la Mortalidad durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde -3 correspondía a 0% y así sucesivamente hasta +3 equivalente al 100%.

3.6.2.3 Sobrevivencia de explante - Hipocótilo

Si los tejidos respondieron favorablemente al daño mecánico, a la no Oxidación, al no necrosamiento y no hubo Mortalidad, hay respuesta al medio de cultivo en el cual fueron inoculados, y biológica y fisiológicamente manifiestan visiblemente la respuesta, formación de callo o posiblemente rizogénesis, caulogénesis, filogénesis o formación de individuos completos; la Sobrevivencia de los explantes - Hipocótilo se comenzó a evaluar, conjuntamente con las otras variables, desde la siembra a la primera evaluación (1 de Septiembre de 2011 hasta 30 de Octubre de 2011) contando 60 días después de la inoculación de explantes en el medio de cultivo (Figura 21); utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no Sobrevivencia, en cada uno de los explantes (3) de cada contenedor y por repetición (10) basada en el verdor del explante, formación o nó de callo o si se presentó la intensidad oxidativa del explante, observada macroscópicamente en los explantes.



Figura 21 Explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) mostrando respuesta de Sobrevivencia al medio de cultivo modificado.

De acuerdo con las observaciones se fue calificando (+3) cuando los explantes Sobrevivieron y así sucesivamente hasta (-3) cuando los explantes comenzaron a oxidarse, necrosarse y morir; con estos valores se fue determinando la Sobrevivencia durante todo el periodo, lo que permitió realizar una tabla con valores que fueron transformados en porcentaje, donde +3 correspondía equivalente al 100% y así sucesivamente hasta -3 correspondiente a 0% .

3.6.2.4 Formación de callo explante - Hipocótilo

Dependiendo del tipo de explante y con los suplementos hormonales en el medio de cultivo podrán presentarse Formaciones de Callo o directamente la organogénesis. La Formación de Callo en los explantes - Hipocótilo - se comenzó a evaluar, conjuntamente con las otras variables, desde la siembra a la primera evaluación (1 de Septiembre de 2011 hasta 30 de Octubre de 2011) contando 60 días después de la inoculación de explantes en el medio de cultivo (Figura 22) utilizando la observación visual en cada evaluación se determinó si había o no Formación de Callo, en cada uno de los explantes (3) de cada contenedor y por

repetición (10) basado en los cambios estructurales y morfológicos del explante, en el verdor del mismo, observado macroscópicamente en los explantes.

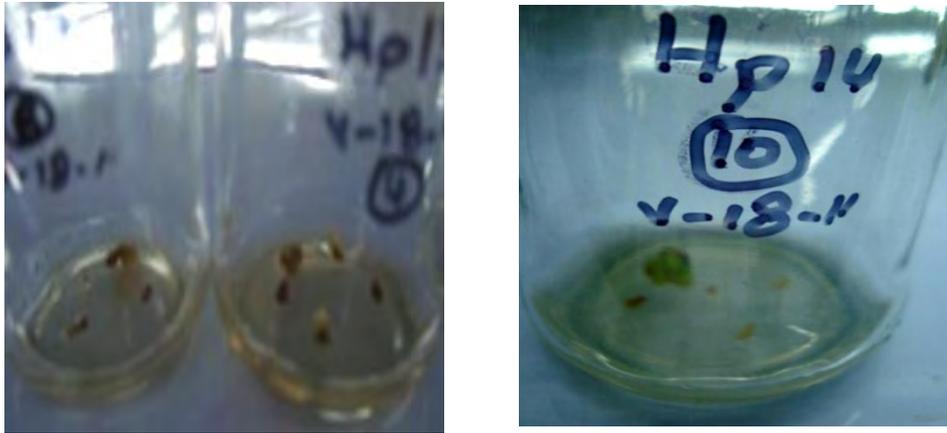


Figura 22 Hipocótilos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) en Formación de Callo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPLANTES - SEGMENTOS DE HOJA

4.1.1 Oxidación Fenólica Explante – Segmentos de Hoja

Entre los 25 y 30 días de cultivo, los Segmentos de Hoja, según los tratamientos presentaron Oxidación Fenólica en los bordes y en contacto con el medio de cultivo y otros sobre la superficie del explante, la que se fue agudizando a través del tiempo hasta los 130 días, lo que condujo al necrosamiento del tejido y posterior muerte del mismo (Figura 23).

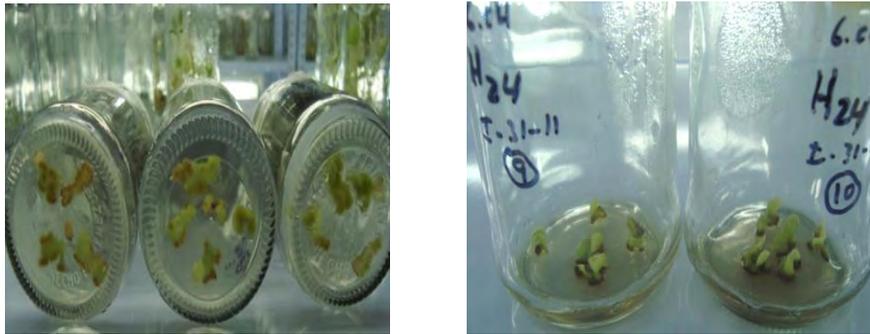


Figura 23 Oxidación Fenólica en los bordes y en contacto con el medio de cultivo y otros, sobre la superficie del explante – Segmento de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (*Senth*) *Cav.*) (25 a 30 dds).

El Análisis de Varianza (Cuadro 6) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando su efecto diferencial en los procesos de Fenolización sufridos por los explantes- Segmentos de Hoja de tomate de árbol. Al comparar los tratamientos se pudo observar que los T6,T1 y T5 fueron los que sufrieron menor Fenolización con diferencias significativas cuando se compararon con los tratamientos T2, T3 y T10; no presentaron diferencias con respecto a los tratamientos T4,T7,T9 y T8.

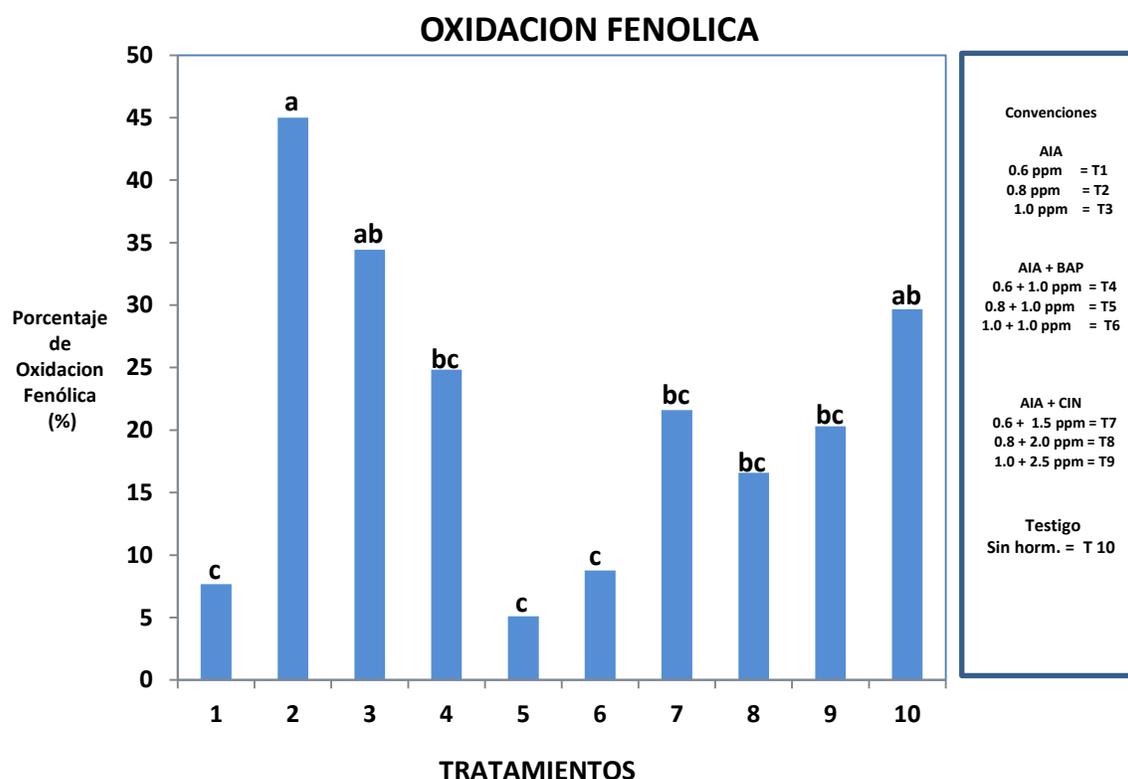
Los datos observados varían entre 45% en el T2, correspondiente a la incorporación de 0.8 ppm de AIA y 5.09% en el T5, que corresponde a una combinación de AIA (0.8 ppm) y BAP (1.0 ppm). (Grafica 1).

Además, indica que los tratamientos T2, T3 y T10 presentan diferencias estadísticas significativas en un rango porcentual entre 29.67% y 45% frente a los tratamientos T4, T7, T9, T8, T6, T1 en un rango que va de 7.67% a 24.83% Se presentan diferencias entre T2 con 45% respecto a T4,T7,T9 y T8 con valores de 24,83%, 21.59%, 20.30% y 16.59%, respectivamente.

Cuadro 6. Analisis de Varianza de la variable Oxidación Fenólica del explante-Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum*.(Senth) Cav.) cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12925.42	9	1436.16	8.53	<0.0001
Trat	12925.42	9	1436.16	8.53**	<0.0001
Error	13802.90	82	168.33		
Total	26728.32	91			

** Altamente significativo



Grafica 1. Porcentaje de explantes – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) que presentaron Oxidación Fenólica según los tratamientos.

Se observa que cuando la adición de AIA se hace a una menor concentración (T1 = 0.6 ppm), la Oxidación Fenólica es menor, alcanzando valores de 7.67%. Cuando la concentración aumenta a 0.8 ppm (T2) alcanza mayores valores con un 45% y aunque siga aumentando la concentración 1.0 ppm (T3) la Oxidación Fenólica disminuye presentando un valor de 34.44% (Gráfica 1).

De acuerdo con Roca y Mroginski (1993), la oxidación de algunos compuestos químicos como taninos, fenoles y polifenoles es uno de los aspectos de más difícil manejo dentro del cultivo *in vitro* y es causal de la inhibición de las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas y de la respuesta de la planta a las diferentes hormonas y reguladores del crecimiento, por esta razón, la oxidación de los tejidos vegetales cultivados bajo condiciones *in vitro* termina con la supresión total de toda respuesta de crecimiento y desarrollo del tejido y una posterior necrosis del mismo.

Se puede determinar que la utilización en estas concentraciones de AIA (0.8 y 1.0 ppm) los resultados obtenidos permiten inferir que la adición de AIA al medio de cultivo dentro del rango de concentraciones propuestas no favorecerá el desarrollo de este tipo de explantes bajo condiciones *in vitro*, teniendo en cuenta el alto grado de oxidación fenólica.

En el caso de la adición de la auxina AIA en complemento con 6-Bencil amino purina (BAP), los siguientes tres tratamientos T4, T5 y T6, presenta una Oxidación Fenólica de un 24.83% para el T4 pero cuando aumenta la concentración de AIA en complemento con BAP a la misma concentración, hay una reducción apreciable de la Oxidación Fenólica respecto a los demás tratamientos (T5 y T6) con valores 5.09% y 8.76%, respectivamente lo que indica que no hay diferencias significativas.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se encontró que la citoquinina bencil amino purina (BAP) y su relación con el AIA ejerce un efecto menor sobre la oxidación fenólica de los explantes segmentos de hoja bajo condiciones de cultivo *in vitro*. De hecho, los tratamientos en que se adicionó este fitoregulator en concentraciones de 1.0 ppm presentaron un nivel inferior de oxidación fenólica con respecto a los tratamientos en los cuales se utilizó la relación AIA/CIN o solamente AIA. De acuerdo con los resultados presentados en la Gráfica 1, esta citoquinina tuvo un efecto menor sobre esta variable cuando se empleó de manera conjunta con el AIA, pero sí cuando fue adicionada la Cinetina, en concentraciones de 1,5, 2.0 y 2.5 ppm.

Salisbury y Ross (2000) afirman que las auxinas o cualquier otro tipo de fitoregulator son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades y que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre las plantas porque su exceso, en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal, produce toxicidad en el mismo.

Con la adición al medio de cultivo de AIA complementada con Cinetina se observa similitud entre los tratamientos T7, T9 y T8 con valores de 21.6%, 20.30% y 16.6% respectivamente.

Con respecto al testigo, se observa en la Gráfica 1, que sin la adición de hormonas al medio de cultivo, la Oxidación Fenólica se evidenció con un valor de 29.67%, siendo este porcentaje elevado con respecto a los tratamientos T6, T1 y T5, con valores de 8.76, 7.67% y 5.09 a excepción de T2 y T3 con valores de 45% y 34.44%, respectivamente.

Lo anteriormente expresado va conforme a lo mencionado por Debergh y Read, (1991), quienes afirman que la producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre.

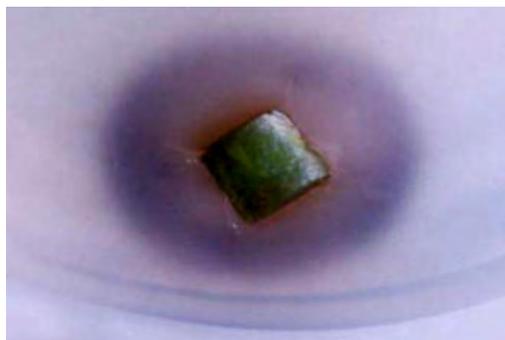


Figura 24. Distribución de los compuestos fenólicos en la superficie del cultivo y en el interior del mismo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) sembrados *in vitro* en medio MS (62).

Al respecto George, (1996a) menciona que, las reacciones de hipersensibilidad incluyen la liberación del contenido de las células rotas, reacciones en las células vecinas sin mostrar síntomas de lesiones y/o la muerte primitiva de células específicas en el entorno de la zona de la herida o la zona de infección. Las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias que producen a su vez el oscurecimiento del medio (Figura 24). Este tipo de ‘ennegrecimiento’ está asociado con heridas. No todos los compuestos que se producen son inhibidores, pero frecuentemente se encuentra que, una vez se produce la decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren a no ser que se tomen medidas oportunas.

El mismo autor, confirma que el ennegrecimiento de los tejidos y los daños que esto implica es mucho más severo en los estadios iniciales del cultivo y deja de ser un problema una vez los explantes comienzan a crecer. Una vez establecido el cultivo, la consecuencia de la secreción de sustancias fenólicas suele ser una inhibición del crecimiento pero, en este caso, ya no es letal.

Los tejidos jóvenes tienen generalmente menos tendencia a producir exudados fenólicos, cuando se escinden (cortar, dividir, separar), que los más viejos (Azofeifa 2009).

Existen casos en los que los explantes son sensibles a la presencia de auxinas en el medio. A veces, incluso existe diferencia entre el establecimiento del cultivo de brotes axilares o de brotes apicales. Se produce mayor ennegrecimiento en brotes que provienen de plantas tomadas del invernadero que en explantes de semillas germinadas asépticamente (George, 1996a).

También se puede producir un ennegrecimiento de los callos o de las suspensiones celulares por la producción de fenoles si no se realiza un subcultivo lo suficientemente frecuente (2-3 semanas),(Alonso, 2002).

El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas, sintetizadas o están presentes en los tejidos heridos o senescentes. Los exudados suelen ser mezclas de complejos de sustancias fenólicas. A pesar de tener un aspecto semejante, los exudados fenólicos producidos por plantas de géneros diferentes no tienen la misma composición.(George, 1996a) .

Los fenoles son productos muy lábiles*, que se oxidan fácilmente. Los productos que se originan por su oxidación pueden ser fitotóxicos y pueden incluso enfatizar los procesos de oxidación, porque después de la oxidación se convierten ellos mismos en oxidantes muy fuertes. La síntesis de los compuestos fenólicos puede ocasionar la aparición de nuevos productos, que juegan un importante papel en el mecanismo de protección mecánica del tejido contra la contaminación. (*Lábiles: Su velocidad de descomposición en el sentido de los equilibrios, son productos inestables) (Alonso, 2002).

Estos productos pueden formar una barrera física contra la invasión (lignina) o funcionar como inhibidores del crecimiento microbiano (quinonas y fitoalexinas). Un grupo especial de fenoles, son los protectores de auxinas (antioxidantes que inhiben la oxidación del AIA catalizada por peroxidasas) (Debergh y Read, 1991).

A veces la producción de fenoles no es necesariamente perjudicial. Los fenoles actúan de forma natural regulando la oxidación del AIA, promocionando el crecimiento de suspensiones celulares, posiblemente por sinergismo con las auxinas y solamente se vuelven tóxicos si la concentración aumenta. Además, las sustancias producidas por el efecto de la herida pueden promocionar el enraizamiento. La oxidación de fenoles simples no tiene que ir en detrimento de la morfogénesis, existen casos en que puede existir regeneración de brotes adventicios incluso después de que los explantes se vuelvan marrones y quebradizos. Existen ocasiones en los que incluso se produce mayor regeneración en los explantes que se ponen marrones que en aquellos que permanecen verdes (Debergh y Read, 1991).

Para reducir la oxidación se han utilizado diversos antioxidantes. Algunos de ellos solamente son efectivos durante cortos períodos de tiempo porque ellos mismos se pueden convertir rápidamente en oxidantes muy fuertes, por ejemplo el ácido ascórbico y el ditiotreitol. La reducción de la temperatura o el cultivo de los explantes en la oscuridad pueden ayudar a reducir la oxidación así como también limitar la presencia de citocininas en los medios de iniciación ya que estas promocionan la oxidación. La exudación al medio de cultivo de protectores de auxinas se potencia con la reducción de la concentración de sales, posiblemente debido a un efecto osmótico (Alonso, 2002).

Los fenoles los crea la planta en su metabolismo secundario por la vía del ácido sikimico y vía del poliacetato, los cuales utiliza en momentos de estrés (hídrico, lumínico, reproductivo); por oxidación genera quininas (Azofeifa, 2009)

La oxidación es el proceso a través del cual un átomo, o grupo de átomos, pierde uno o más electrones (se oxida) y los cede a otro (el cual se considera reducido). En sustratos orgánicos, la oxidación y reducción involucra la participación de átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos (Karp, 1998).

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol- oxidasa (PPO) para producir quinonas, fenolasas y tirosinasas, así como de las peroxidases (PoX), las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular, son liberadas, sintetizadas o están presentes en ciertos sustratos y en condiciones oxidativas cuando los tejidos son lesionados o se encuentran senescentes. (Amiot *et al.* 1996; Bray *et al.* 2000, Azofeifa, 2009).

En muchos casos, la oxidación se ha relacionado directamente con el acúmulo de PPO y decrecimiento de putrescina, espemidina y espermina de los tejidos. Los sustratos para estas enzimas, que pueden variar entre los diferentes tejidos, son comúnmente la tirosina o los fenoles. Estas enzimas normalmente se encuentran compartimentalizadas, por ejemplo: PPO en cloroplastos, PoX en peroxisomas, o se ubican en las membranas subcelulares, los sustratos son almacenados dentro de la vacuola. La enzima y el sustrato entran en contacto cuando la célula sufre algún daño, estrés o se encuentra senescente y generalmente, da como resultado la muerte del explante (Azofeifa, 2009).

Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo (Bray, *et a.*,2000; Pompeu *et al.* 2008). En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (George, 1996, Tabiyeh *et al.*, 2006, Van Staden *et al.*, 2006, Abdelwahd *et al.*, 2008).

Asimismo, en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta a estreses bióticos y abióticos). Por ejemplo, en explantes cultivados de tomate se ha reportado la presencia de vainilina, ácido p-coumárico, p-hidroxibenzaldehído y siringaldehído (Harms *et al.*, 1983, Rao *et al.*, 1986, Abdelwahd *et al.*, 2008). No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del

explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y si no se remedia la situación, puede morir (George 1996, Ogita, 2005).

Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos* y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (*la epigenética es el estudio de modificaciones en la expresión de genes que no se encuentra en la secuencia del ADN y estas modificaciones son heredables. Una de las fuentes de mayores modificaciones de los genes es por el factor ambiental y puede afectar a uno o varios genes con múltiples funciones) (Cassells y Curry 2001, Van Staden *et al.* 2006).

De acuerdo con George y Sherington (1984) citados por George (1996), las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz, por lo que es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja.

Según Gonzalez *et al.*, (2003), al evaluar el comportamiento de segmentos nodales guayabana enana roja Cubana var. EEA-18-40 (*Psidium guajaba* L.) manifiestan que se presentó contaminación visible en el medio de cultivo, alrededor de la base de los explantes y en ocasiones colonizando los mismos. De todas las muestras analizadas determinaron la contaminación por bacterias, contaminación por levaduras, contaminación por hongos y muchas veces se puede dar a confusión un oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo (fenolización) con algunos de estos contaminantes y en ocasiones están relacionados, encontrando que los contaminantes más frecuentes pertenecen a las familias de Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae, esto se explica, porque estas bacterias Gram negativas son abundantes en la superficie aérea de la planta y en el ambiente, ya que se han aislado como saprofitas del agua y del suelo. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que las bacterias se encuentren en los espacios intercelulares y por ello escapan a la desinfección, expresándose en el medio de cultivo, cuando el explante está bajo condiciones de estrés, lo que puede significar que en la siembra de estos explantes se pudo haber contraído la contaminación de estos microorganismos.



Figura 25 Oxidación Fenólica en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) en el área de contacto con el medio de cultivo.

En este sentido, es importante destacar que aunque en el presente estudio todos los explantes tuvieron Oxidación Fenólica, los mismos no fueron viables, por lo que es necesario hacer un mantenimiento en solución antioxidante viables y el humedecimiento del material vegetal con esta solución durante la extracción de los explantes (Figura 25).

También es posible que el cultivo de los explantes en oscuridad evite una mayor oxidación (Florez, 2011).

Obando y Jordan (2001), evaluaron el potencial de regeneración *in vitro* de varios explantes de tomate de árbol y su relación con los cambios de proteínas solubles y fenoles a lo largo de la morfogénesis, habiendo encontrado que los explantes de hoja, en presencia de TDZ (Thidiazurom), solo o combinado con AIA, inducían inicialmente callos y posteriormente brotes, los cuales se formaron en la superficie abaxial, 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. La mayor tasa de inducción de brotes se obtuvo utilizando TDZ solo (93.3%) y el número de brotes adventicios formados por explante fue el más alto (2,1 a 16,3). Se observó pardeamiento en algunos de los explantes, los cuales se tornaron necróticos; este fenómeno ocurre en la lámina de la hoja, pero no en los brotes adventicios nuevos, los cuales permanecieron verdes.

Los mismos autores, indicaron que en tomate de árbol, el contenido fenólico de los tejidos intactos fue siempre mayor cuando se comparó con el de los explantes en cultivo. Un menor nivel de los fenoles endógenos en las secciones de hojas y en las yemas axilares parece estar asociado a la inducción de brotes y raíces. La adición de TDZ parece reducir la actividad de la enzima Fenilalanina Ammonia Liasa (PAL), reduciéndose los fenoles.

4.1.2 Mortalidad Explante – Segmentos de Hoja

El Análisis de Varianza (Cuadro 7) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando que las combinaciones hormonales estudiadas afectaron significativa y diferencialmente la Mortalidad de los explantes-Segmentos de Hoja de tomate de árbol; al observar los porcentajes de Mortalidad de los Explantes Foliares se determinaron variaciones entre 2.67% en el T5 y 58.57% en el T2. Se pudo observar que el T5 fue el que obtuvo menor Mortalidad seguido de los T10 y T8.

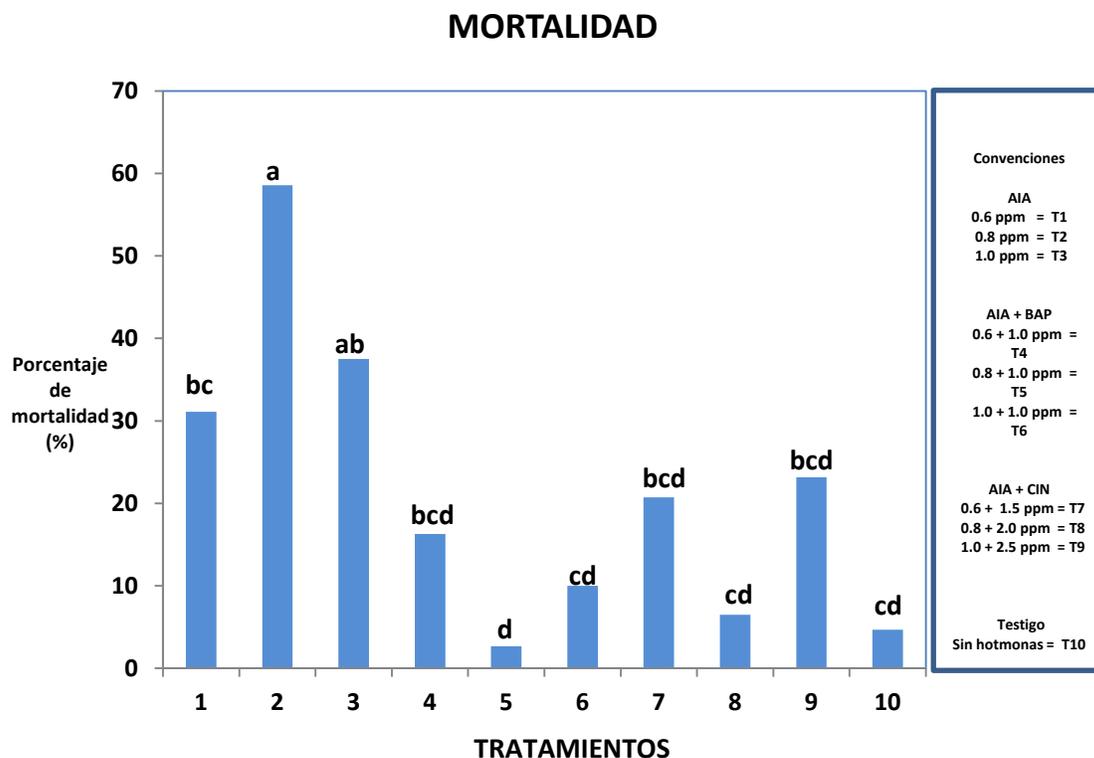
En la Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 2) se observan los valores correspondientes al porcentaje de Mortalidad de explantes de tomate de árbol – Segmentos de Hoja obtenidos con los diferentes tratamientos; los tratamientos con mayores porcentajes de Mortalidad fueron T2 con 58.57% correspondiente a la aplicación de 0.8 ppm de AIA y T3 con 37.50% correspondiente a la aplicación de 1.0 ppm de AIA, sin diferencias estadísticas entre ellos, pero significativamente superiores a los tratamientos los cuales alcanzaron diferencias altamente significativas al compararlos con los tratamientos, T6, T8, T10 y T5 con valores que oscilaron entre 10.00% para el T6 y 2.67% para el T5. (Gráfica 2)

Así mismo, permitió detectar diferencias significativas entre el tratamiento T5, que presentó el menor porcentaje de Mortalidad (2.67%), con respecto a los tratamientos T1 (31.11%), T3 (37.50%) y T2 (58.57%) y sin diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos..

Cuadro 7 Analisis de Varianza de la variable Mortalidad de explantes de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum*. (Senth) Cav)cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21830.94	9	2425.66	8.07	<0.0001
Trat	21830.94	9	2425.66	8.07**	<0.0001
Error	23738.93	79	300.49		
Total	45569.88	88			

** Altamente significativo



Gráfica 2. Porcentaje de explantes que presentaron Mortalidad según los tratamientos en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.).

Se realizaron análisis relacionados con la Mortalidad del explante para analizar el comportamiento, confrontándose con cada uno de los tratamientos.

La causa principal de pérdida de los explantes (Mortalidad) posiblemente fué el oscurecimiento de los tejidos (fenolización, necrosamiento) y que no observaron regeneración de ningún tipo de estructuras en los explantes. No se observó respuesta de formación de brotes posiblemente debido a que los tejidos del explante tendieron a oscurecerse y morir entre los 32 días hasta los 130 días.

La mayor mortalidad se obtuvo con las concentraciones de 0.8 ppm de AIA (T2) seguida del T3 (1.0 ppm de AIA) y menor mortalidad en el T5 cuando se utilizó 0.8 ppm de AIA en combinación con 1.0 ppm de BAP.

Con respecto al resultado anterior, Olivera, *et al.*, (2010) manifiestan que en la evaluación de la eficiencia del medio de cultivo se debe tener en cuenta la fenolización, que es la presencia de compuestos fenólicos oxidados asociados a los tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés por el efecto abrasivo del desinfectante, los cortes que sufre el explante y composición del medio de cultivo. Estos compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de los explantes dañándolos y matándolos; produce cambios en la coloración del tejido y la emisión de pigmentos rojizos o carmelitas hacia el medio de cultivo. Esto podría deberse a que los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos (Margara 1988).

Las citocininas estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos y la inducción de brotes, siendo las más usadas el BAP (Bencil amino purina), KIN (6-furfuril- aminopurina) y ZEA (zeatina) Por otro lado, las auxinas promueven el crecimiento, la diferenciación celular y la diferenciación de raíces, y las más usadas son el IBA (ácido indol-3-butírico) y el ANA (ácido naftalén acético) que sirven para el enraizamiento (Roca y Mroginski, 1991).

Los tipos de reguladores de crecimiento, sus combinaciones, y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Olmos *et al.*, 2004).

En el trabajo realizado por Olivera, *et al.*, (2010) se evaluó la influencia del BAP solo y en combinación con una baja concentración de ANA. Todos los tratamientos con hormonas generaron brotes, lo cual indicaría una respuesta positiva al BAP, mientras que se observa que la incorporación del ANA en el tratamiento T1 disminuye la brotación respecto al tratamiento T2 (BAP a la misma concentración pero solo). Los resultados del tratamiento T1 no concuerdan con lo reportado para otras especies que responden a concentraciones bajas de BAP (Oviedo y Guevara, 1988).

A pesar de que el BAP previene o retrasa la degradación de la clorofila, ligado a decrecimientos de clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasas (Costa *et al.* 2005, Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007), su incorporación al medio de cultivo se ha relacionado con decoloraciones y oscurecimiento del explante. Por ejemplo, en *Phyllostachis nigra* (BAP

a 1- 30 μm) causó un fuerte oscurecimiento de tejidos (Ogita, 2005). Lo mismo que en *Ailanthus altissima* cv. "Purple Dragon".

Para evitar el problema, estos investigadores, sustituyeron el BAP por su ribósido (BAR). Este cambio redujo a la mitad el número de explantes oscurecidos. También, Brisson *et al.*, (1988) mencionan que en el cultivo de *Chrysosplenium americanum* el oscurecimiento de brotes ocurrió cuando se utilizó BAP. El problema se evitó con el uso de kinetina (kin) o Zeatina. Al contrario, callos de *Aconitum heterophyllum*, cultivados en un medio con 0,5 mg/l de kin liberaron sustancias fenólicas. Cuando éstos se transfirieron a un medio con 1 mg/l de BAP el problema no se presentó (Giri *et al.*, 1993).

Debergh y Maene, (1977) mencionan que con niveles mayores de 1 mg/l de Cin, los explantes de *Pelargonium sp.* liberaron exudados oscuros al medio de cultivo, los cuales afectaron la sobrevivencia de los mismos.

Se sabe que las auxinas son un factor esencial en la proporción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces, tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que incrementa su crecimiento (Hurtado y Merino, 1994).

Al observar la Gráfica 2, se puede apreciar que los tratamientos T1, T2 y T3 a los cuales se les adicionó AIA al medio de cultivo en concentraciones de 0.6, 0.8 y 1.0 ppm fueron aquellos en los cuales se presentó mayor mortalidad. Lo anterior va en concordancia con la evaluación de Oxidación Fenólica donde los tratamientos T2 y T3 fueron aquellos que presentaron mayor Oxidación Fenólica.

La Gráfica 2 indica que los tratamientos T4, T6 y T5 a los cuales se les adicionó AIA complementada con BAP al medio de cultivo, presentan valores de 16.30%, 10% y 2.67%, respectivamente, los cuales reflejan los resultados reportados para Oxidación Fenólica.

Para los tratamientos T9, T7 y T8 con valores de 23.17%, 20.74% y 6.50% a los cuales se les adicionó AIA mas Cinetina, se observa que presentaron Mortalidad en una cuarta parte de los explantes durante el periodo de evaluación; Para el testigo se observa que la Mortalidad fue menor con un valor de 4.67%.

Al respecto, Ibarrán *et al.*, (1997) señalan que el necrosamiento y muerte del tejido del explante foliar procedente de plántulas germinadas *in vitro*, posiblemente pudo deberse a la utilización de concentraciones mayores de 0,2 mg L⁻¹ de BA durante el cultivo de caoba (*Swietenia macrophylla*) bajo condiciones de 16 h diarias de luz.

El análisis de la Mortalidad de los explante por razones de orden fisiológico o por efecto de la desadaptación del explante al medio es de gran importancia en el estudio de las condiciones ideales para la micropropagación de una especie.

Posiblemente los anteriores resultados, indican que la Mortalidad en los explantes – Segmentos de Hoja se presenta en todos los tratamientos, independientemente de que en el medio de cultivo se utilice o no hormonas (auxinas, citocininas). La mayor Mortalidad se presentó en aquellos tratamientos donde se utilizó solamente el AIA en las concentraciones según los tratamientos propuestos.

Cabe resaltar que la Mortalidad, cualquiera que haya sido el factor, se dió en todos los tratamientos y que las evaluaciones descritas fueron el resultado durante los 130 días, tiempo después del cual todos los explantes murieron trayendo como consecuencia la no obtención de otros resultados que condujeran a realizar las otras evaluaciones propuestas.

En los cultivos *in vitro*, la inducción de organogénesis por efecto de las citoquininas (BAP), está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base a una proporción de citocinina alta con respecto a la auxina. De otro lado, el AIA es una auxina que interviene en el alargamiento y en la división celular, estimulando la formación de brotes. En ausencia de citocininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Pero en presencia de BAP, el efecto que se obtiene por la presencia de la auxina, es una división celular mediada por la citocinina. Sin embargo, un exceso de auxina puede suprimir la división celular y aún, el crecimiento celular. (Espinosa, *et al.*, 2005).

En el trabajo realizado por Espinosa, *et al.*, (2005), al utilizar en tomate de árbol partenocárpico esquejes de nudo, los brotes diferenciados no Sobrevivieron debido a la alta Oxidación Fenólica de los nudos, lo que condujo a la necrosis de los mismos y su posterior muerte. Por lo tanto no se pudieron obtener brotes viables que permitieran continuar con la multiplicación de este genotipo, el cual es altamente recalcitrante al cultivo *in vitro*, al igual que otras especies tropicales reportadas.

La importancia de la producción de AIA es que altas concentraciones de la auxina pueden inhibir la respuesta hipersensible y pueden suprimir la expresión de genes de defensa vegetal (Maor *et al.*, 2004).

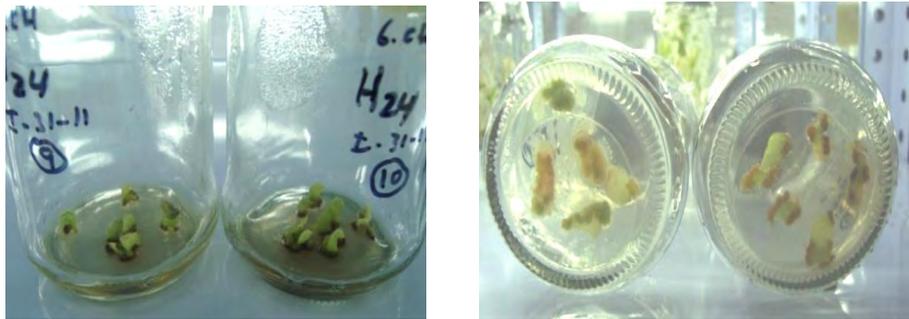


Figura 26 Mortalidad de explantes después de Oxidación Fenólica en Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.) en el área de contacto con el medio de cultivo.

En un trabajo realizado por Patiño *et al.*, (2007) concerniente en la evaluación y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* Cav. *Senth*) utilizando filtrados de cultivo de *Collectotrichum acutatum* con actividad pectinasa, demostraron que tanto las citocininas como los filtrados y también su interacción contribuyen de manera eficiente en el proceso de selección *in vitro*. Se destaca que no se obtuvo ningún regenerante a partir de los explantes sembrados en medio de cultivo sin BAP, independientemente que el medio contuviera o no filtrado fitotóxico.

Los mismos autores manifiestan el efecto del BAP sobre los explantes sujetos y no sujetos a la acción del filtrado. De los explantes sembrados sobre medio sin adición de BAP, el 26% permanecieron vivos después de 45 días de sembrados, el 74% restante murieron y presentaron diferentes grados de necrosis. Cuando se adicionó BAP al medio de cultivo la tasa de supervivencia y viabilidad de los explantes se incrementó notablemente.

También es interesante mencionar que cuando las concentraciones de BAP se incrementaron a 2 o 3 mg · L, las tasas de supervivencia de los explantes sometidos a la acción de los filtrados no fue muy diferente de la del testigo sin citocinina y con filtrado a la más alta concentración 4x. Con las combinaciones BAP 2 mg · L + F4x y BAP 3 mg · L + F4x se presentaron tasas de Mortalidad de 79,16% y 73,86%, las cuales no difieren mucho de la del testigo que correspondió a 77,73%.. Estos resultados podrían interpretarse a la luz de recientes descubrimientos en la acción de las citocininas, particularmente del BAP sobre cultivos celulares. (Patiño *et al*, 2007)

Estos efectos probablemente estén relacionados con la capacidad de las citocininas para promover la diferenciación de cloroplastos, retrasar la senescencia foliar y coadyuvar en los procesos de división celular (Haberer y Kieber, 2002; Carimi *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis thaliana* la reducción del crecimiento celular se produjo sólo a concentración de 27 µM de BAP (4.7 ppm de BAP), siendo 39% menor que la del control. Estos resultados posiblemente podrían explicar el hecho de que las concentraciones más

altas de BAP (13µM y 27 µM) produjeron fragmentación del ADN nuclear en las células de zanahoria, una etiqueta de muerte celular programada. Este mismo efecto fue observado en las células de *A. thaliana* tratadas con 27 µM de BAP. Pruebas adicionales dejaron en claro que altas concentraciones de BAP pueden inducir en las células de zanahoria y *A. thaliana* muerte celular programada, probablemente como resultado de aceleración de la senescencia de los tejidos (Carimi, *et al.*, 2003)

4.1.3 Sobrevivencia Explante – Segmentos de Hoja

El Analisis de Varianza (Cuadro 8) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando que las diferentes combinaciones hormonales estudiadas afectaron significativa y diferencialmente la Sobrevivencia de los explantes durante los periodos evaluados y que se refleja en la Sobrevivencia de los explantes (Segmentos de Hoja) de tomate de árbol. Al comparar los tratamientos se pudo observar que el T9 fue el que obtuvo menor Sobrevivencia con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T1, T2 T6, T10, T3, T8 y T5 (Gráfica 3)

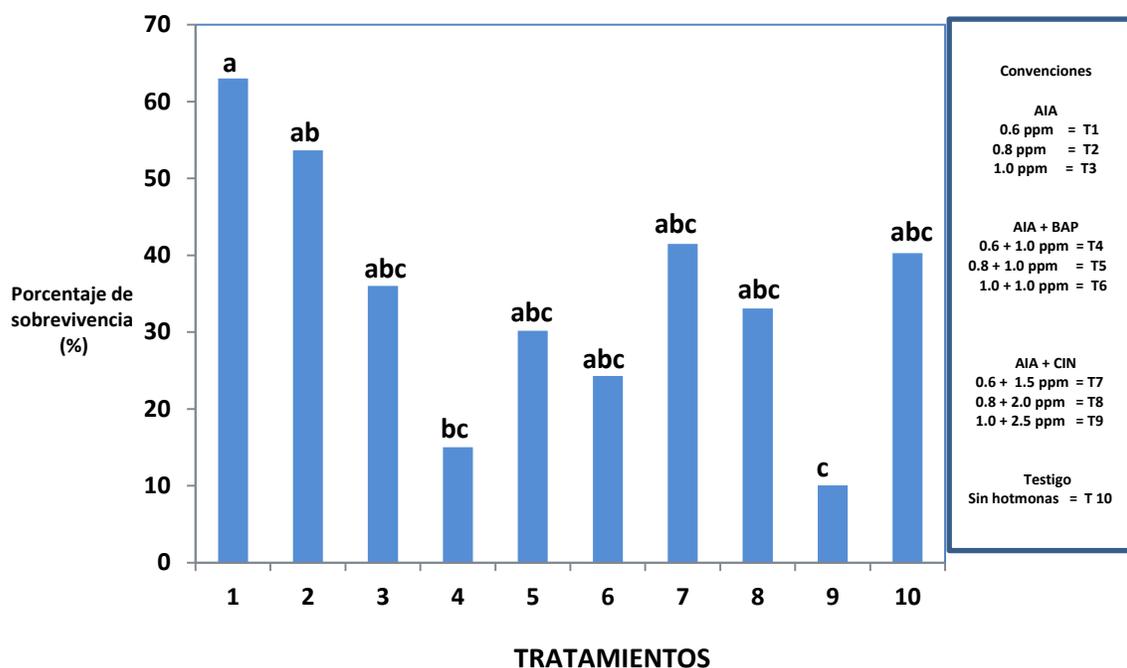
Al realizar la Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 3) se observan los valores correspondientes al porcentaje de Sobrevivencia de explantes de tomate de árbol – Segmentos de Hoja obtenidos con los diferentes tratamientos, los cuales varían en un rango de 10.07 a 53.67% para los tratamientos T9 correspondiente a la aplicación de 1.0 ppm + 2.5 ppm de CIN y T1 (0.6 ppm de AIA), respectivamente.

Cuadro 8 Analisis de Varianza de la variable Sobrevivencia de explantes de Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Senth) Cav.). cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23509.19	9	2612.13	3.27	0.0018
Trat	23509.19	9	2612.13	3.27**	0.0018
Error	70399.43	88	799.99		
Total	93908.62	97			

****Altamente Significativas**

SOBREVIVENCIA



Gráfica 3. Porcentaje de explantes que Sobrevivieron según los tratamientos en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*).

Se observa (Gráfica 3) que los tratamientos T1, T2 y T7, con valores de 63%, 53.67% y 41.50% correspondientes a aquellos tratamientos a los cuales se les adicionó AIA al medio de cultivo en concentraciones de 0.6 ppm, 0.8 ppm y 1 ppm, respectivamente, fueron los que durante el periodo de evaluación (130 días) tuvieron el mayor porcentaje de explantes-Segmentos de Hoja, vivos, a diferencia de los tratamientos T9 y T4 a los cuales se les adicionó al medio de cultivo 1ppm de AIA + 2.5 de CIN y 0.6 ppm AIA + 1 ppm de BAP que tuvieron el menor numero de explantes vivos con valores de 10.07% y 15.03%, respectivamente.

Pudo evaluarse durante el periodo en que los explantes permanecieron vivos (130 días los explantes en los contenedores) la cual va relacionada con las evaluaciones Oxidación Fenólica y Mortalidad, lo que significa que los valores aquí presentados, se refieren a ese periodo; no quiere decir que se va incrementando sino hace referencia a los explantes que permanecieron vivos (verdes).

Se observa que para el tratamiento T1 con un valor porcentual de 63%, alcanza la mayor Sobrevivencia el cual al confrontarlo con los valores de Mortalidad 31.11% y Oxidación

Fenólica 3.67% indica que al adicionar 0.6 ppm de AIA los explantes sobreviven por un determinado tiempo (130 días) pero pasado este periodo hay producción de fenoles lo que conduce al necrosamiento del mismo y su posterior muerte.

En forma paralela, desde la siembra y durante los 130 días de evaluación pudo observarse que con la adición al medio de cultivo de 0.8 ppm de AIA (T2), la Oxidación Fenólica presenta un valor alto (45%) y al parecer es un factor limitante puesto que en tanto los explantes iban muriendo (58.57%) durante ese periodo pudo evaluarse la Sobrevivencia con un valor de 53.67%.

Se observa respuestas similares para el T3 con la adición de 1 ppm de AIA con valores menores y mientras se presenta Oxidación con valores de 34.44%, la Mortalidad es de 37.50% y la Sobrevivencia del 36% lo que permite aducir que el factor responsable de la Mortalidad y la baja Sobrevivencia pudo deberse posiblemente a la exudación de fenoles que posteriormente causarían la muerte de tejidos y del explante.

Para el tratamiento T7, se observa que la Sobrevivencia fué del 41.40% que se mantuvo durante los 130 días y que posteriormente condujo a la muerte del explante, aunque se tiene un valor de 20.74% para Mortalidad y 21.59% para Fenolización; debe aclararse que los valores de Sobrevivencia en este caso correspondería casi a la mitad del material pero finalmente la muerte de explantes y la pérdida de contenedores (unidades experimentales) también se atribuye a la contaminación por bacterias, hongos y levaduras.

George y Sherrington, (1984), manifiestan que el tamaño de los explantes determinan la Sobrevivencia, crecimiento y tasa de multiplicación de los cultivos. A menor tamaño de los explantes utilizados, menores son los problemas de contaminación, pero es posible una deficiente respuesta morfogénica.

En un ensayo realizado por Berrios, *et al.*, (1991) al realizar la propagación clonal *in vitro* de diferentes especies de Poró (*Erythrina poeppigiana*, Fabace), al tratar de controlar la oxidación con enjuagues de los explantes en una solución estéril de ácido ascórbico en combinación con ácido cítrico, al agregar Cisteina.HCl al medio de cultivo, encontraron que para *Erythrina poeppigiana* y *E. costaricensis*, la oxidación alcanzó 37% y 24% respectivamente, lo que redujo de manera considerable la Sobrevivencia de estas dos especies en fase de establecimiento, concluyendo que la oxidación fue la causa más importante de la pérdida de propágulos.

En este ensayo, cuando estos se cortaron, aparecieron coloraciones oscuras en las zonas dañadas, lo que concuerda con Bonga (1982) quien afirmó que la oxidación es un impedimento para la iniciación de un cultivo aséptico.

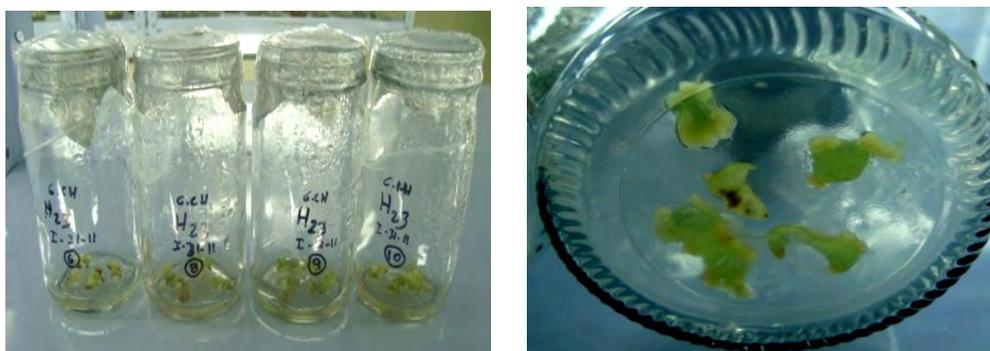


Figura 27 Supervivencia de explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 130 días que posteriormente sufrieron Oxidación Fenólica, necrosamiento y finalmente murieron.

4.1.4 Formación de Callo explante – Segmentos de Hoja

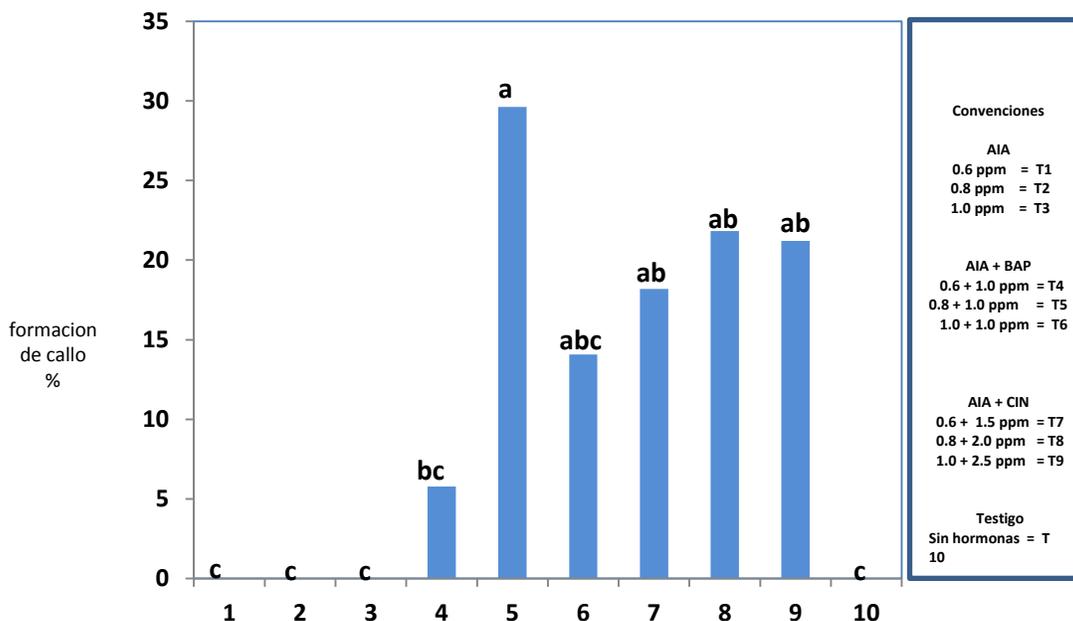
El Analisis de Varianza (Cuadro 9) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando que las combinaciones hormonales estudiadas afectaron significativamente la Formación de Callo en los explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol, durante los periodos evaluados. Al comparar los tratamientos se pudo observar que el T5 fue el que obtuvo mayor Formación de Callo con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T4 y T6 que tuvieron los menores valores y T1, T2 T3 y T10, los que no formaron callo durante los periodos de evaluación (Gráfica 4).

Cuadro 9 Analisis de Varianza de la variable Formación de Callo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) cultivados en medio de cultivo MS (62) con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11037.08	9	1226.34	9.95	<0.0001
Trat	11037.08	9	1226.34	9.95**	<0.0001
Error	10843.83	88	123.23		
Total	21880.90	97			

****Altamente significativos**

FORMACION DE CALLO



Gráfica 4. Porcentaje de explantes que Formaron Callo según los tratamientos en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*)

La Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 4) muestra los valores correspondientes al porcentaje de Formación de Callo de explantes de tomate de árbol-Segmentos de Hoja obtenidos con los diferentes tratamientos, los cuales varían en un rango de 0.00% para los tratamientos T1, T2, T3 y T10 a 29.63% para el T5. Se puede apreciar que aquellos tratamientos a los cuales se les adicionó solamente el AIA (T1, T2 y T3) y el T10 al cual no se le adicionó ninguna hormona, no formaron callosidades si se compara con aquellos tratamientos a los cuales se les adicionó una relación hormonal auxina – citocinina (BAP o CIN).

Si se analizan los tratamientos T5, T8 y T9, con los mayores porcentajes de Formación de Callos (29.63%, 21.82% y 21.21%, respectivamente), y los tratamientos T7, T6 y T4 con valores de 18.18%, 14.07% y 5.78% se puede apreciar la interacción auxina-tipo de citocinina (AIA – BAP) en la Formación de Callo en aquellos a los cuales se les adicionó CIN en las concentraciones propuestas (Gráfica 4).

Esta evaluación se realizó durante el periodo en que los explantes permanecieron vivos (130 días que permanecieron los explantes en los contenedores) la cual va relacionada con

las evaluaciones Oxidación Fenólica, Mortalidad y Supervivencia, lo que significa que los valores aquí presentados se refieren a ese periodo.

No todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de plantas. La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies que pueden sumarse a *Nicotiana tabacum*, en su característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras (Roca y Mroginski, 1993).

A las pocas horas en el medio de inducción, las hojas empezaron a curvarse ligeramente, de forma que, los bordes, las zonas de corte del explante, se separaban ligeramente de la superficie del medio de cultivo y los explantes de Segmento de Hoja que no presentaron respuesta, terminaron por secarse.



Figura 28 Formación de callo en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*)

En ausencia de reguladores de crecimiento (T10) o en las concentraciones analizadas de la auxina (AIA) o en concentraciones bajas con BAP (de 0,6 ppm de AIA + 1ppm de BAP) no se observaron diferencias significativas en las respuestas de los explantes Segmentos de Hoja en la aparición de callo, no formándose ningún tipo de callo o produciéndose en un porcentaje muy bajo de los explantes. Por el contrario, cuando la concentración de BAP fue de 1ppm + 0.8ppm de AIA, se observó Formación de Callo.

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división y diferenciación celular en el cultivo de tejidos. Existen auxinas naturales y sintéticas; entre las naturales la más utilizada es el ácido indol-3-acético (AIA), la que se usa para inducción de callos en concentraciones entre 10-30 μ M. En concentraciones de 1-10 μ M puede estimular la organogénesis. Se inactiva por la luz y es rápidamente oxidada por las células vegetales (Dixon y Gonzalez, 1994).

Las citoquininas, son sustancias que estimulan la división celular (frecuentemente junto con las auxinas). La división celular se regula por la acción conjunta de las auxinas y citoquininas, influyendo en fases diferentes del ciclo celular (Granell y Carbonell, 1995).

Las citoquininas se encuentran en forma libre o en forma de glucósidos y ribósidos (Granell y Carbonell, 1995). Entre las citoquininas más utilizadas están la Kinetina: 6-fulfurilaminopurina (KIN = CIN), la cual se adiciona a los medios de cultivo en concentraciones de 1-20 μ M para la inducción y crecimiento de callos e inducción de morfogénesis y la BAP (6-benzoilaminopurina) la cual es utilizada para inducción y crecimiento de callos y morfogénesis. Se utiliza más que la CIN (Dixon y Gonzalez, 1994).

La inducción de callo se limitó al nivel de las nerviaciones al inicio y posteriormente cubriendo toda la superficie del segmento de hoja. A medida que aumenta la concentración de la BAP junto con la de AIA, se observó que la Formación de Callo se produjo también en células diferentes de las nerviaciones y en la zona de corte llegando a producirse incluso hinchamiento y regeneración en la zona central de las hojas y llegando el callo a rodear todo el explante.

Obando y Jordan (2001), evaluaron el potencial de regeneración *in vitro* de varios explantes de tomate de árbol y su relación con los cambios de proteínas solubles y fenoles a lo largo de la morfogénesis, encontrando que los explantes de hoja, en presencia de TDZ (Tiadiazurum), solo o combinado con AIA, inducían inicialmente callos y posteriormente brotes, los cuales se formaron en la superficie abaxial, 4-5 semanas después de iniciado el cultivo. La mayor tasa de inducción de brotes se obtuvo utilizando TDZ solo (93.3%) y el número de brotes adventicios formados por explante fue el más alto (2,1 a 16,3). Se observó pardeamiento en algunos de los explantes, los cuales se tornaron necróticos; este fenómeno ocurre en la lámina de la hoja, pero no en los brotes adventicios nuevos, los cuales permanecieron verdes.

Obando y Jordan (2001), establecieron que la mejor respuesta organogénica se obtuvo cuando los explantes foliares se sembraron sobre medio suplementado con TDZ en concentraciones de 5 a 10 mg · L, sin embargo, para fines prácticos, la mejor opción es el BAP debido al menor costo de la fitohormona.

Un aspecto importante se evidenció con la adición de citocininas (BAP y CIN) al medio de cultivo. Esta observación respalda el ya conocido papel de las citocininas en las respuestas de las plantas al estrés ambiental. Varios estudios han demostrado que el nivel endógeno de citocininas decrece cuando las plantas están bajo la acción de algún factor de stress (Hare *et al*, 1997). Durante el cultivo de tejidos, las células individuales o los tejidos de los explantes se desdiferencian y luego se rediferencian nuevamente dando origen a nuevos tejidos. Esta reprogramación del genoma infringe a las células y tejidos una serie de experiencias traumáticas (Madlung y Comai, 2004), además, teniendo en cuenta que en los cultivo de tejidos, los explantes están expuestos a diferentes condiciones de tensión (desequilibrios osmóticos, lesiones causadas en el aislamiento de los tejidos de los

explantes, niveles y calidades atmosféricas anormales, etc), se puede preveer que los mismos presentan una alteración en sus niveles de citocininas y posiblemente otros reguladores.

Hoyos, (1996) logró obtener callos friables a partir de explantes de hojas crecidas *in vitro*, en un medio MS (62), suplementado con 0.1 mg/l de 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético y 0.05 mg/l de BAP (6- Bencilaminopurina), con el fin de producir las suspensiones embriogénicas necesarias para la regeneración de material resistente a la acción de toxinas producidas por el hongo *Collectotrichum acutatum* Penz, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.



Figura 29 Formación de Callo el cual se originó desde las nerviaciones hacia el margen en explantes - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 130 días que posteriormente sufrieron Oxidación Fenólica, necrosamiento y finalmente murieron.

Cuando la respuesta se limitó a las nerviaciones, el callo formado consistió en nódulos compactos (Figura 30), tenía un aspecto frágil, de color blanco acuoso y estaba formado por nódulos más o menos diferenciados.

Se observó que las nervaduras secundarias presentes en el Segmento de Hoja permanecieron verdes hasta los 32 días en algunos de los explantes y en la zona de corte hubo Formación de Callo de color verde no muy intenso.

Kapaun y Cheng, (1997) observaron dos tipos de formación de callo en el explante; uno blanco y compacto y otro de color verde cristalino, este último se presentó mayormente en el corte del nervio medio y en las regiones de las nervaduras secundarias, lo cual coincide con lo antes mencionado.

Trabajos de Lugo y León, (1991) indican que la formación de callo en discos de mesocarpo de guayabo cultivados en medio McCown y Lloyd fue de aspecto compacto y con presencia de protuberancias irregulares.

La Formación de Callo fue del tipo parenquimatosa y se manifestó a los 16 días de cultivo, ocurriendo un pequeño incremento a los 32 días en la mayoría de los tratamientos.

En trabajos de Salazar y Romero, (1997) la iniciación de formación de callo se dió a los 15 días de cultivo *in vitro* del ajonjolí, lo cual coincide con los resultados mencionados, aunque, en investigaciones de Kapaun y Cheng, (1997) la formación de callo fue visible a partir de los 7 días.

La formación de callo se produjo solamente en los cortes del explante poco oscurecido y en las nervaduras, por lo que sería conveniente realizar cortes nuevos en el explante antes de sembrarlo, ya que en estudios histológicos de *Coffea arabica* se ha demostrado que el callo se origina en las células del mesófilo de los bordes cortados en el explante foliar (Sondhal y Sharp, 1979). Así como también, incubar los explantes bajo oscuridad por cierto período de tiempo, de 14 ó 15 días después de la siembra, teniendo en cuenta que Kapaun y Cheng (1997) encontraron que los explantes cultivados bajo oscuridad produjeron mayor cantidad de callo que aquellos en presencia de luz.

En parchita o maracuyá (*Passiflora edulis*), Otahola, (1997) señala la regeneración de plantas a partir de discos foliares; en su metodología incluyó la incubación de los explantes por 15 días en oscuridad después de la siembra.

Ramirez, (1998), encontró dificultades al llevar a cabo la formación de callos y regeneración de brotes a partir de segmentos de hojas crecidas en campo, debido a la alta concentración de fenoles y en consecuencia la baja viabilidad de los explantes.

Los medios suplementados con 2,4-D, en concentraciones de 2 mg/L no dieron buenos resultados, puesto que los callos formados eran de mala calidad y al poco tiempo empezaron a morir. Solo en el medio 4 (5 mg/L 2,4-D + 9 % sacarosa), se obtuvo un callo de tamaño medio (cerca de 1 cm de diámetro) y de un color blanco cremoso a las 3 semanas de iniciado el ensayo (Arahana, *et al.*, 2010).

Este callo se mantuvo en observación durante 2 meses, al cabo de los cuales fue desechado pues no proliferó mayormente y por el contrario fue deteriorándose paulatinamente. En los medios de cultivo que contenían 5 mg/L de ANA se obtuvo callos a las 3 semanas de iniciado los ensayos, mientras que en los medios de cultivo que contenían 7 mg/L de ANA la formación de callo se dió a las 2 semanas. Aunque en todos los ensayos realizados con ANA se obtuvo callos grandes de coloración blanca cremosa y textura friable, no mostraron signos de ser embriogénicos. Igualmente se mantuvieron en observación durante 2 meses y luego fueron desechados. Finalmente, en los ensayos realizados con los medios de cultivo 9 y 10, la formación de callo se dió precariamente en los bordes de los explantes a partir de la cuarta semana de cultivo; sin embargo, una semana después, los callos formados empezaron a morir. (Arahana, *et al.*, 2010).

Otro aspecto a considerar fue que el porcentaje de explantes que formaron callo en los ensayos con 2,4-D fue muy bajo, teniendo el máximo en el medio 4 (25 %), mientras que en el medio 1 solo un 10 % de los explantes formaron callo. Mientras que en los ensayos con ANA, a excepción del medio 5 (95 %), en todos los demás medios el 100 % de los explantes formaron callo (Arahana, *et al.*, 2010)

En el trabajo de Selección y Regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol realizado por Patiño *et al.*, (2007) en el cual se utilizaron filtrados de cultivo de *Collectotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis de tomate de árbol, a varias concentraciones, obtuvieron a partir de explantes foliares de tomate de árbol sometidos a los tratamientos correspondientes a las diferentes combinaciones BAP x Filtrado después de los 45 días de cultivo *in vitro*. B1: BAP 1 mg · L; B2: BAP 2 mg · L; B3: BAP 3 mg · L; F0: sin filtrado; F2x: Filtrado con concentración relativa 2x; F4x: Filtrado con concentración relativa 4x. (Patiño *et al* 2007).

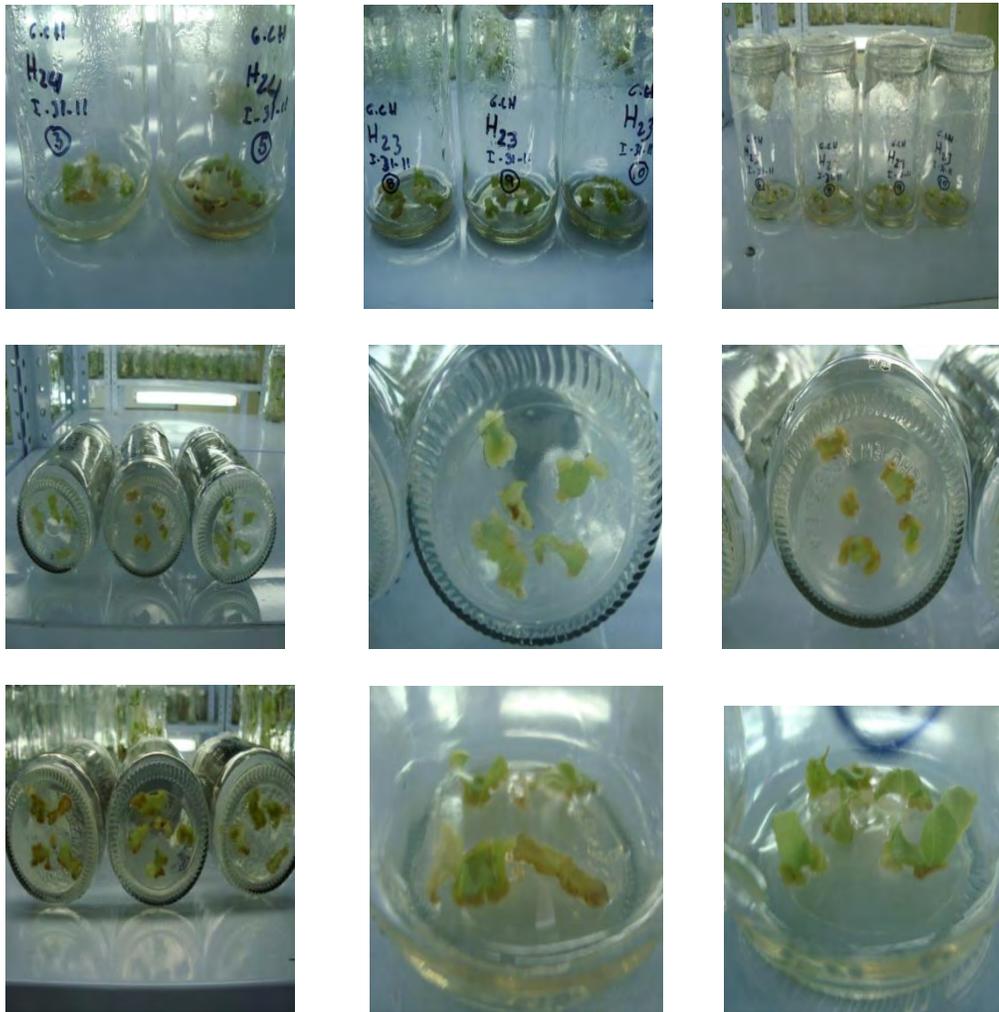


Figura 30. Respuesta del explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) en algunos de los tratamientos durante el periodo de evaluación en que permanecieron verdes y formaron callo.

4.2 EXPLANTE HIPOCOTILO

4.2.1 Oxidación Fenólica explante - Hipocótilo

El Análisis de Varianza (Cuadro 10) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando su efecto diferencial en los procesos de Fenolización sufridos por los explantes- Hipocótilo de tomate de árbol.

Desde la siembra y después de la primera evaluación, se pudo observar que en estos explantes (hipocótilos) durante los primeros 30 días la Oxidación no se presentó en ninguno

de los tratamientos, excepto en el testigo (T10), en el cual fue visible desde los primeros 7 días después de la siembra.

Cabe resaltar que a partir de los 60 días después de la siembra, la Oxidación Fenólica se agudizó en todos los tratamientos inhibiendo el desarrollo y causando Mortalidad en todos los explantes, haya o nó formado callo, los que hasta este periodo de tiempo permanecían verdes y como consecuencia de la Oxidación Fenólica comenzaron a presentar pardeamiento.

Cuadro 10. Analisis de Varianza de la variable Oxidación Fenólica de explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) cultivados en medio de cultivo MS (62) modificado con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4319,03	9	479,89	4,04	0,0002
Trat	4319,03	9	479,89	4,04 **	0,0002
Error	10701,88	90	118,91		
Total	15020,91	99			

***Altamente significativo**

Se presentó contaminación en al menos dos contenedores por tratamiento durante el tiempo de permanencia en el cuarto de incubación.

Al cabo de 60 días de cultivo, en los explantes se pudieron apreciar algunas de las siguientes respuestas: a) contaminación con hongos y/o bacterias; b) ennegrecimiento tisular; c) Sin respuesta o principios de formación de callo (Figura 31).

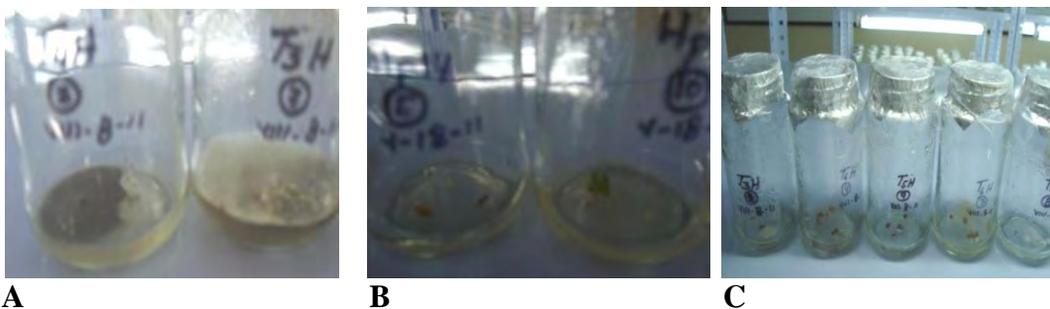
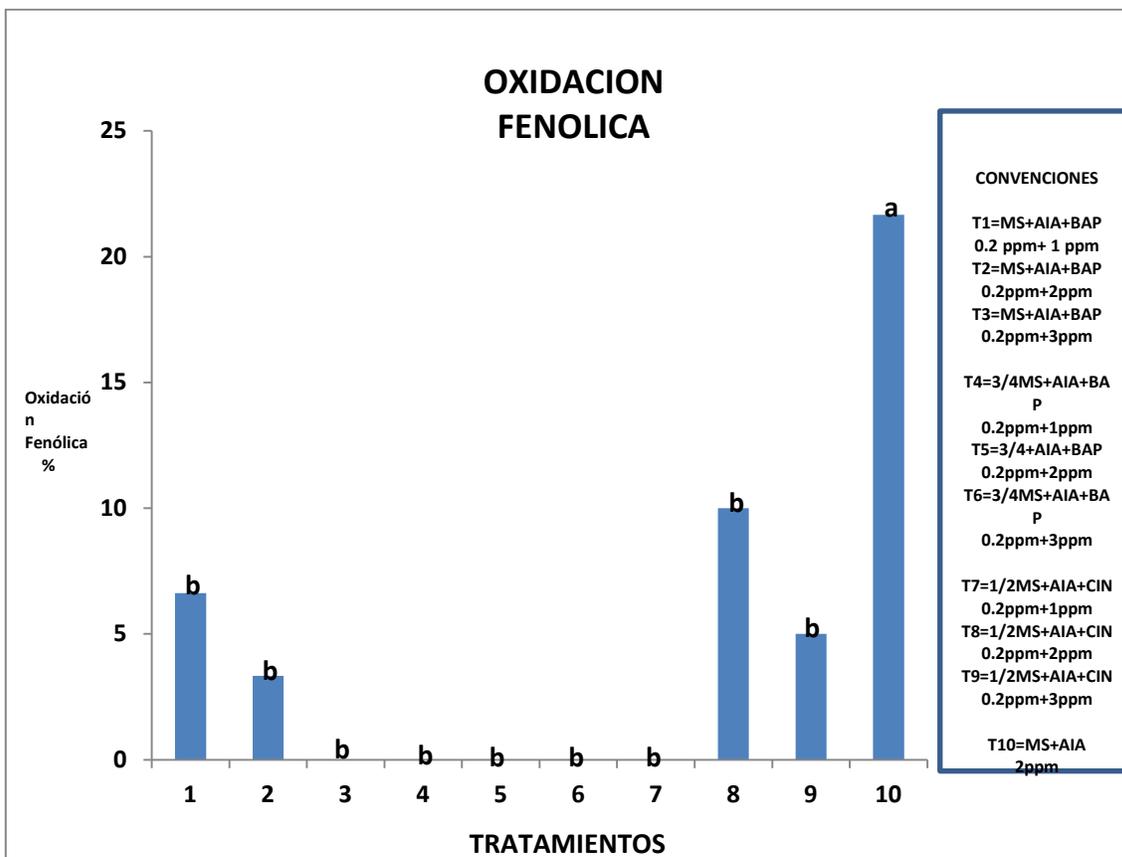


Figura 31. Hipocótilos de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) los cuales presentan A) Contaminación con hongos y bacterias B) Comienzos de Oxidación Fenólica C) Sin respuesta o principios de Formación de Callo.



Grafica 5. Porcentaje de explantes – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) que presentaron Oxidación Fenólica según los tratamientos.

La Prueba de comparación de medias (Gráfica 5), al comparar los tratamientos se pudo observar que el T10 fué el que presentó mayor grado de Oxidación Fenólica con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T8, T1, T9, T2, T3, T7, T4, T5 y T6, con un valor del 21.66% cuando se comparó con los tratamientos con valores menores en un rango entre 3.33% y 10% para los tratamientos T2 y T8, respectivamente.

Lo anterior se ve reflejado cuando en el testigo se utilizó MS (medio completo)+AIA en una concentración de 2ppm en comparación con los otros tratamientos cuando se utilizó MS diluido ($\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{2}$) más la adición de AIA/BAP en las concentraciones 0.2 ppm + 1 ppm – 0.2 ppm + 2 ppm – 0.2 ppm + 3 ppm para los T1, T2 y T3; 3/4MS mas la adición de AIA/BAP en las concentraciones 0.2 ppm + 1 ppm – 0.2 ppom + 2 ppm – 0.2 ppm + 3 ppm para los T4, T5 y T6 y 1/2MS más la adición de AIA+CIN para los tratamientos T7, T8 y T9 en las concentraciones 0.2 ppm + 1 ppm – 0.2 ppm + 2 ppm – 0.2 ppm + 3 ppm.

En la Gráfica 5, se puede apreciar que los tratamientos, T1 MS (completo) + AIA + BAP (0.2 ppm + 1 ppm), T2 MS (completo) + AIA + BAP (0.2 + 2 ppm) y T3 MS (completo) + AIA + BAP (0.2 ppm + 3 ppm) con valores porcentuales de 6.63%, 3.33% y 0,

respectivamente, presentan Oxidación Fenólica, lo que permite deducir que con el medio de cultivo completo y la presencia de las auxinas y las citocininas en las concentraciones propuestas, siempre va a presentar la Oxidación Fenólica, pero en la medida que aumenta la concentración de BAP, la oxidación disminuye o no se presenta.

Para los tratamientos T4 (3/4MS) + AIA + BAP (0.2 ppm + 1 ppm), T5 (3/4 MS) + AIA + BAP (0.2 ppm + 2 ppm) y T6 (3/4MS) + AIA + BAP (0.2 ppm + 3 ppm), permite manifestar que en esa dilución con la misma concentración de la auxina y diferentes concentraciones de la citocinina no se presentó Oxidación Fenólica durante el periodo de la misma (60 días) (Gráfica 5).

Cuando el medio fué diluido a la mitad de concentración, se pudo apreciar que para los tratamientos T7(1/2MS) + AIA + CIN (0.2 ppm + 1 ppm), T8 (1/2MS) + AIA + CIN (0.2 ppm + 2 ppm) y T9 (1/2MS) + AIA + CIN (0.2 ppm + 3 ppm), la menor concentración de CIN no presentó Oxidación Fenólica, pero si se manifestó cuando aumentaba la concentración de la misma (Gráfica 5).

Cuando se utilizó el medio de cultivo completo (MS) con AIA (2 ppm), fue evidente que la Oxidación Fenólica se presentó en todos los contenedores desde el inicio de las evaluaciones hasta los 60 días donde prácticamente todos los explantes se necrosaron y murieron.

Frecuentemente, el establecimiento de tejidos procedentes de plantas leñosas en el cultivo *in vitro*, se ve impedido por la deposición de compuestos que provocan oscurecimientos de los tejidos. En el momento de hacer cortes se sintetizan compuestos fenólicos en los tejidos de las plantas, los cuales posteriormente se oxidan y taponan los conductos vasculares oscureciendo el medio y afectando el crecimiento y supervivencia de los explantes, (Marks y Simpson, 1990).

Al respecto, Jaiswal y Amin, (1987), manifiestan que para limitar los procesos de oxidación de los tejidos, el medio de cultivo juega un papel importante. El medio mas frecuente es el Murashige-Skoog (62) enriquecido con citocininas como bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de $0.44 - 8.88 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (0.077ppm – 1.558 ppm) como principal regulador de crecimiento. La adición de reguladores de crecimiento de tipo auxinico como el Acido Indol Acético (AIA) en concentraciones de $0.57 - 2.85 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (0.1 ppm – 0.5 ppm) aseguran una mayor calidad, lo que permite señalar que las concentraciones propuestas en el presente estudio para AIA estaban dentro de las concentraciones utilizadas por los anteriores autores, pero no las correspondientes a las utilizadas para las citocininas (BAP y CIN).

La respuesta posiblemente se ve influenciada por el medio de cultivo empleado (MS completo) y las diluciones propuestas y se puede apreciar que los mayores valores de explantes – Hipocótilo (un poco más del 20%) se obtienen cuando se emplea el MS

completo. Estos porcentajes disminuyeron cuando se utilizaron los medios mas diluidos (3/4 y 1/2MS). Los explantes, no prosperaron y terminaron muriéndose.

El oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* se debe a una oxidación por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas las cuales son moléculas químicas propensas muy reactivas que generan daño en los tejidos e incluso, la muerte celular. (Bray *et al.*, 2000).

Muchos explantes después de su implantación empiezan a perder color verde y muestran oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo cuya naturaleza no es precisa. Sin embargo, se sabe que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas, producto del metabolismo secundario. (Abdelwahd, *et al.*, 2008)

No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibidores o tóxicos, pero en la mayoría de los casos cesa el crecimiento del explante perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y si no se remedia la situación, este puede morir (Ogita, 2005)

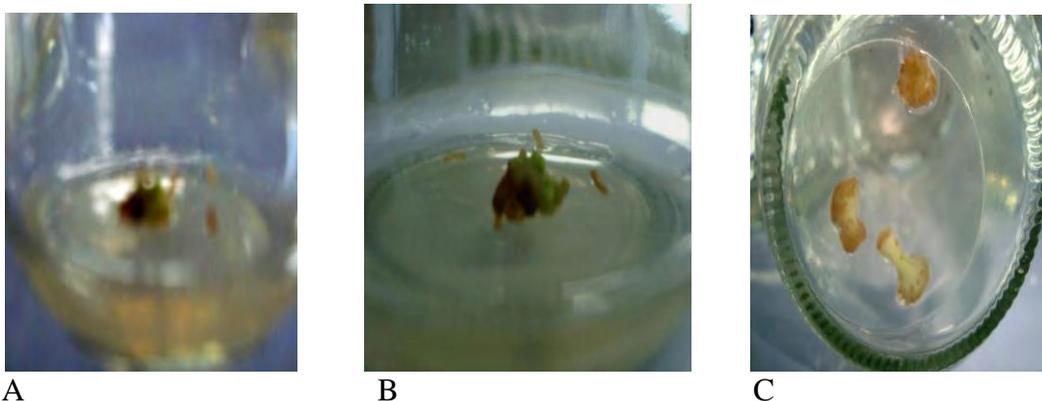


Figura 32. Respuesta del explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) a las modificaciones del medio de cultivo, hormonas y concentraciones hormonales: A) Explantes contaminados con bacterias y/o hongos, B) Explantes con inicio de oxidación y C) Explante con solamenta callos

Los segmentos de Hipocótilo que se utilizaron como explantes se tornaron verdes a los tres días de cultivo, los que permanecieron en esas condiciones hasta los 60 días, a partir de los cuales, los explantes presentaron una gran Oxidación en sus extremos, excepto en el T10 en el que comenzó a visualizarse la Oxidación Fenólica 7 días después de la siembra.

La Oxidación que se observó durante esta prueba, fué de manera progresiva hasta los 60 días después de la siembra, iniciando en el área donde se habían realizado los cortes, tornándose de un color verde del explante a café oscuro, debido a la proliferación de

fenoles, contrarrestándose en gran parte comparado con los medios (MS y concentración hormonal diferentes a las utilizadas en el tercer ensayo), donde todos los explantes se oxidaban. Calderón, (2000) concluye que los explantes de especies leñosas como el aguacate son muy susceptibles a la Oxidación Fenólica, lo que incide en forma negativa en el desarrollo y crecimiento de los brotes.

Vuylsteke, (1989) indica que el ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos fenólicos, en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando una inhibición del crecimiento.

En el trabajo realizado por Florez, (2011) en la propagación de guayaba, para la variable Oxidación Fenólica de los explantes, no se presentaron diferencias significativas, pero los valores más altos se encontraron en la especie CASS en explantes provenientes de plantas madres expuestas al sol y bajo sombra (15 min y 10 min, respectivamente), contrario a lo reportado por Ocampo y Nuñez (2007) que a mayor tiempo de desinfección de explantes de guayaba mayor es la oxidación por fenoles.

4.2.2 Mortalidad explante – Hipocótilo

El Análisis de Varianza (Cuadro 11) permitió establecer diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos analizados, indicando su efecto diferencial en la mortalidad de los explantes – Hipocótilo de tomate de árbol

El T10 fue el que presentó mayor Mortalidad con diferencias significativas cuando se comparó con los demás tratamientos en esta variable, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la variable Oxidación Fenólica.

Cuadro 11 Análisis de Varianza de la variable Mortalidad en explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) cultivados en medio de cultivo MS(62) modificado con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5598,42	9	622,05	2,49*	0,0136
Trat	5598,42	9	622,05	2,49*	0,0136
Error	22440,16	90	249,34		
Total	28038,58	99			

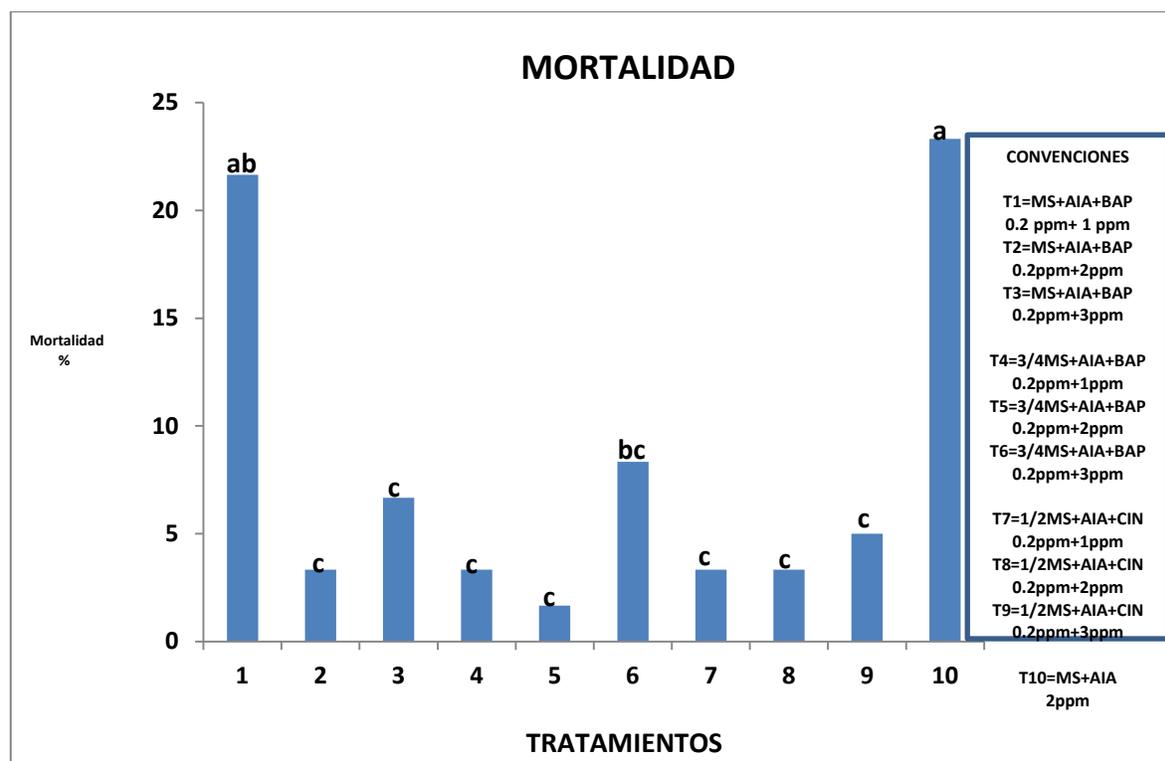
***Significativas**

La Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 6), permitió observar que el T10 (23.3%) fué el que presentó mayor Mortalidad con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos, T6 (%), T3 (%), T8 (%), T7 (%), T4 (%) y T5 (%), no presentando diferencias con el T1.

El T10 (MS Completo) correspondiente al tratamiento al cual se le adicionó AIA en concentración de 2 ppm, presenta el más alto valor de Mortalidad respecto a los otros tratamientos; fue evidente que la Oxidación Fenólica se presentó en todos los contenedores desde el inicio de las evaluaciones hasta los 60 días donde prácticamente todos los explantes se necrosaron y murieron, lo cual concuerda con la variable de Oxidación Fenólica.

Como se menciona en la anterior evaluación, los hipocótilos durante los primeros días desde la siembra tuvieron un comportamiento a través del cual, se pudo apreciar que los explantes permanecieron verdes durante los 60 días, después de los cuales en forma generalizada, en todos los tratamientos se pudo observar que la causa principal de pérdida de los explantes (Mortalidad) posiblemente fué el oscurecimiento de los tejidos (fenolización, necrosamiento) aún hayan o nó formado callos o que no observaron regeneración de ningún tipo de estructuras en los explantes. No se observó respuesta de formación de brotes posiblemente debido a que los tejidos del explante tendieron a oscurecerse y morir a partir de los 60 días.

Si se presentó Mortalidad de explantes – Hipocótilos en el tratamiento testigo (T10) en casi la mayoría de los contenedores, lo que concuerda con la Mortalidad por Oxidación Fenólica.



Gráfica 6. Porcentaje de explantes que presentaron Mortalidad según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*)

En la Gráfica 6, se puede apreciar que en el T1 (MS Completo)+AIA+BAP (0.2 ppm+1ppm), se presentó Mortalidad con un valor de 21.66% lo cual ratifica el resultado presentado para Oxidación Fenólica, que aunque tuvo un valor menor de 6.63% la Mortalidad de explantes se dió progresivamente a partir de los 60 días, lo que permite deducir que con el medio de cultivo completo y la presencia de auxinas y citocininas en las concentraciones propuestas, siempre va a presentar la Oxidación Fenólica que finalmente conduce a la muerte de los explantes.

El T6 con un valor de 8.66% (Gráfica 6) 3/4MS+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm) aún el medio de cultivo esté diluido y enriquecido con AIA y BAP, la manifestación y respuesta de los explantes – Hipocótilo siempre fue por Oxidación Fenólica después de los 60 días, teniendo en cuenta que durante el periodo de evaluación este tratamiento fué el que menor contaminación presentó por hongos, bacterias y levaduras.

En concordancia con lo anteriormente expresado, Debergh y Read, (1991) señalan que la producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre. Las reacciones de hipersensibilidad incluyen la liberación del contenido de las células rotas, reacciones en las células vecinas sin mostrar síntomas de lesiones y/o la muerte primitiva de células específicas en el entorno de la zona de la herida o la zona de infección.

Las superficies de corte de muchos explantes comienzan a decolorarse justo después de cortarlas. Los explantes completos o partes de ellos frecuentemente continúan oscureciéndose cuando se introducen en el recipiente de cultivo y exudan sustancias que producen a su vez el oscurecimiento del medio (Figura 36).

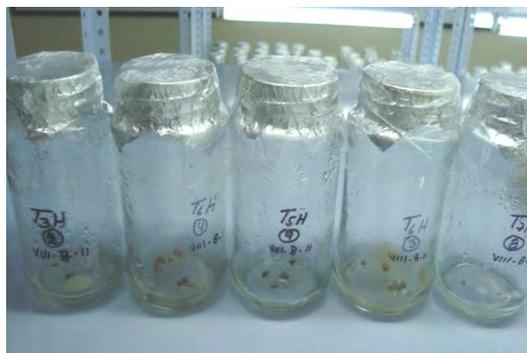


Figura 33. Explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) iniciando proceso de oscurecimiento del tejido a los 60 días y su posterior muerte.

Este tipo de ‘ennegrecimiento’ está asociado con heridas. No todos los compuestos que se producen son inhibidores, pero frecuentemente se encuentra que, una vez se produce la

decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren a no ser que se tomen medidas oportunas (George, 1996a).

Se observa que en aquellos tratamientos donde se adicionó citocininas (BAP y CIN) en concentraciones de 1 a 3 ppm se presentó menor Mortalidad respecto al T10 y al T1 aún el medio MS sea completo, $\frac{3}{4}$ o $\frac{1}{2}$ de dilución y la misma concentración de AIA (0.2 ppm) pero al finalizar los periodos de evaluación se observó una total necrosis que condujo a la muerte de los explantes:

T2=MS completo+AIA+BAP (0.2ppm+2ppm)

T3=MS completo+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm)

T4= $\frac{3}{4}$ MS+AIA+BAP (0.2ppm+1ppm)

T5= $\frac{3}{4}$ MS+AIA+BAP (0.2ppm+2ppm)

T7= $\frac{1}{2}$ MS+AIA+CIN (0.2ppm+1ppm)

T8= $\frac{1}{2}$ MS+AIA+CIN (0.2ppm+2ppm)

T9= $\frac{1}{2}$ MS+AIA+CIN (0.2ppm+3ppm)

La inducción de órganos por efecto de la citocininas (BAP), está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción alta con respecto a la auxina. De otro lado, el AIA es una auxina que interviene en el alargamiento y la división celular, estimulando la formación de brotes. En ausencia de citocininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Pero en presencia de la BAP, el efecto que se obtiene por la presencia de la auxina, es una división celular mediada por la citocinina. Sin embargo, un exceso de auxina puede suprimir la división celular y aún, el crecimiento celular. (Espinosa, *et al.*, 2005).

La extensión del ennegrecimiento y la inhibición del crecimiento, depende mucho del genotipo. Es especialmente problemático en especies que contienen niveles altos de taninos y otros hidroxifenoles. Se encuentran también diferencias entre especies dentro del mismo género y entre cultivares dentro de las especies. El genotipo influye en la cantidad de sustancias fenólicas producidas así como en su toxicidad. Los tejidos jóvenes tienen generalmente menos tendencia a producir exudados fenólicos, cuando se escinden, que los más viejos.

El mismo autor, señala que la exudación es menor cuando la planta se encuentra en estado de disminución del crecimiento que cuando se encuentra en crecimiento activo o previo a la floración. También se puede producir un ennegrecimiento de los callos o de las suspensiones celulares por la producción de fenoles si no se realiza un subcultivo lo suficientemente frecuente (2-3 semanas).

Existen casos en los que los explantes son sensibles a la presencia de auxinas en el medio. A veces, incluso existe diferencia entre el establecimiento del cultivo de brotes axilares o

de brotes apicales. Los tejidos escindidos de brotes de plantas leñosas que han sido muy podadas o que se encuentran etioladas producen menos fenoles que aquellos que provienen de partes adultas de la planta. Se produce mayor ennegrecimiento en brotes que provienen de plantas tomadas del invernadero que en explantes de semillas germinadas asépticamente en *Pistachia sp.* (George, 1996^a).

El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas, sintetizadas o están presentes en los tejidos heridos o senescentes. Los exudados suelen ser mezclas de complejos de sustancias fenólicas. A pesar de tener un aspecto semejante, los exudados fenólicos producidos por plantas de géneros diferentes no tienen la misma composición (Villa, 1999).

Los fenoles son productos muy lábiles que se oxidan fácilmente. Los productos que se originan por su oxidación pueden ser fitotóxicos y pueden incluso enfatizar los procesos de oxidación, porque después de la oxidación se convierten ellos mismos en oxidantes muy fuertes. La síntesis de los compuestos fenólicos puede ocasionar la aparición de nuevos productos que juegan un importante papel en el mecanismo de protección mecánica del tejido contra la contaminación (García-Pajón y Collado, 2003)

Estos productos pueden formar una barrera física contra la invasión (lignina) o funcionar como inhibidores del crecimiento microbiano (quinonas y fitoalexinas). Un grupo especial de fenoles son los protectores de auxinas (antioxidantes que inhiben la oxidación del AIA catalizada por peroxidasas) (Debergh y Read, 1991).

A veces la producción de fenoles no es necesariamente perjudicial. Los fenoles actúan de forma natural regulando la oxidación del AIA, promocionando el crecimiento de suspensiones celulares, posiblemente por sinergismo con las auxinas y solamente se vuelven tóxicos si la concentración aumenta. Además, las sustancias producidas por el efecto de la herida pueden promocionar el enraizamiento. La oxidación de fenoles simples no tiene que ir en detrimento de la morfogénesis, existen casos en que puede existir regeneración de brotes adventicios incluso después de que los explantes se vuelvan marrones y quebradizos. Existen ocasiones en los que incluso se produce mayor regeneración en los explantes que se ponen marrones que en aquellos que permanecen verdes (Alonso, 2002)

Para reducir la oxidación se han utilizado diversos antioxidantes. Algunos de ellos solamente son efectivos durante cortos períodos de tiempo porque ellos mismos se pueden convertir rápidamente en oxidantes muy fuertes, por ejemplo el ácido ascórbico y el ditiotreitol. La reducción de la temperatura o el cultivo de los explantes en la oscuridad pueden ayudar a reducir la oxidación así como también limitar la presencia de citocininas en los medios de iniciación ya que estas promocionan la oxidación. La exudación al medio de cultivo de protectores de auxinas se potencia con la reducción de la concentración de sales, posiblemente debido a un efecto osmótico (Obando y Jordan, 2001).

Al respecto, George (1996) indica que los tejidos juveniles son menos propensos a problemas de oxidación que los tejidos maduros, aunque en *Saccharum* spp. el cultivo de tejidos inmaduros presentó más problemas de oxidación que tejidos más desarrollados.

La presencia de sustancias fenólicas en las semillas de cocobolo (*Dalbergia retusa*), especie maderable afectó el porcentaje de germinación. Sin embargo, este efecto se pudo disminuir cuando se transfirieron a un medio fresco. El problema de oxidación también se hizo presente en algunos explantes, lo que conllevó a una mayor producción de masa callosa en éstos y posteriormente su inmediato necrosamiento. El porcentaje de oxidación de los explantes fue de un 2%. A pesar de que algunos autores mencionan que la exudación de sustancias fenólicas es mayormente problemático en tejidos maduros que en juveniles (Bonga, 1982, Gill y Gosal 1996), ésta no dejó de ser una limitante en la producción de estructuras organogénicas en explantes de hipocótilo de cocobolo.

En el cultivo *in vitro* de *Musa* sp. es frecuente la aparición de coloraciones oscuras en el medio de cultivo. Tales tonalidades se deben a la presencia de sustancias fenólicas y polifenólicas en el explante que se difunden hacia el medio, especialmente si se cultivan secciones de frutos y ápices. Los productos de oxidación de estas sustancias generalmente inhiben el crecimiento y con frecuencia son responsables de la muerte de los explantes (De Guzman, *et al.*, 1980)

Según George y Sherrington, (1984) los explantes grandes pueden presentar problemas en la desinfección y tornarse menos manipulables, presentando contaminación por la presencia de bacterias que conducen a la putrefacción acuosa del explante, lo cual provoca que el medio de cultivo se torne amarillento ocurriendo posteriormente la muerte de los explantes.

4.2.3 Sobrevivencia explante – Hipocótilo

El Análisis de Varianza (Cuadro 12), permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los diferentes tratamientos analizados, indicando que el medio de cultivo completo y las diluciones (3/4 y 1/2), la utilización de la misma auxina a la misma concentración en todos los tratamientos y las diferentes combinaciones de citocininas (BAP 1-2-3 ppm y CIN 1-2-3 ppm) estudiadas, presentaron significativa y diferencialmente la Sobrevivencia de los explantes – Hipocótilo durante los periodos evaluados (60 días) y que se refleja en la Sobrevivencia de los mismos.

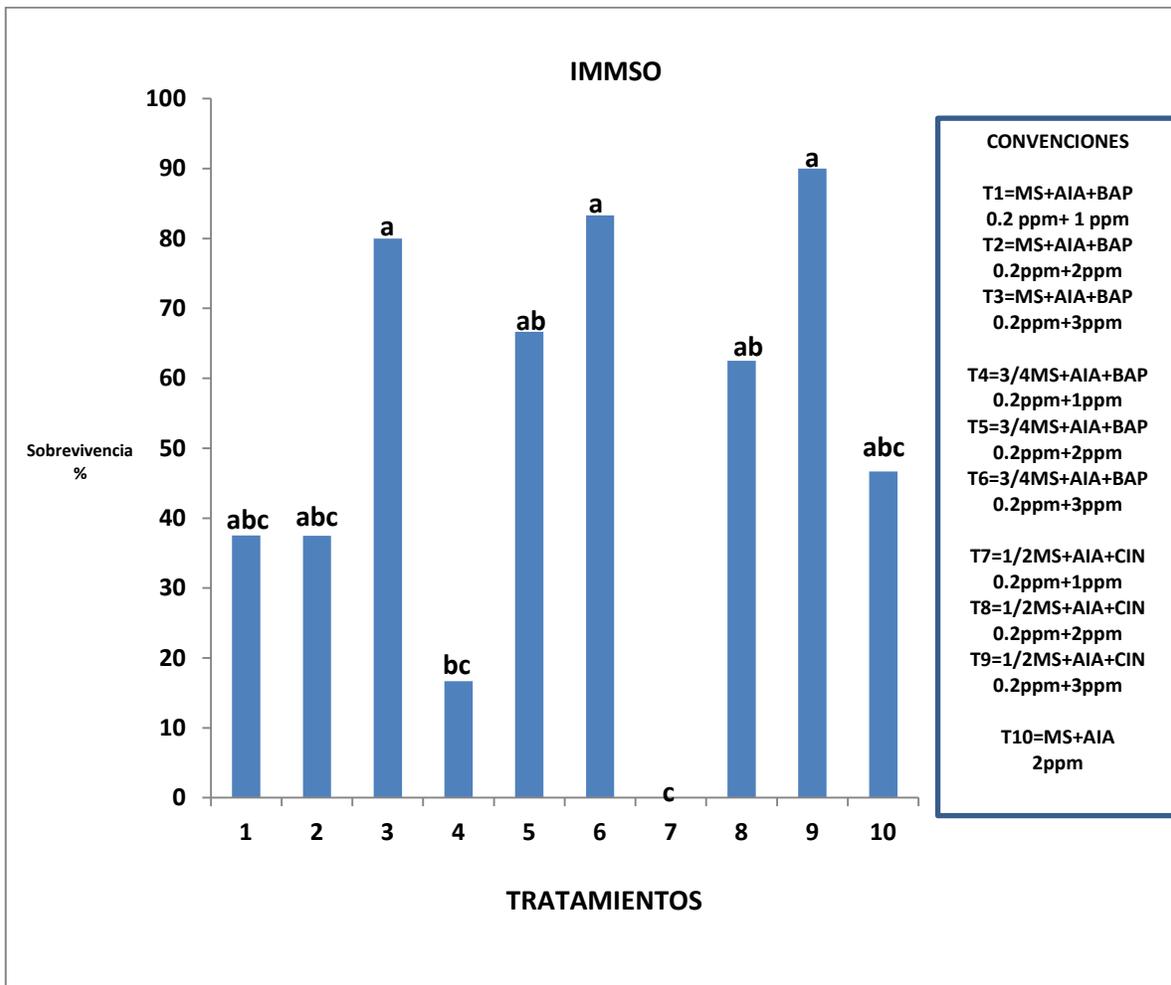
Cuadro 12 Análisis de Varianza de la variable Supervivencia de explante - Hipocótulo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) cultivados en medio de cultivo MS(62) modificado con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	41139.3822	9	4571.0425	3.62	0.0017
Trat	41139.38221	9	4571.04247	3.62**	0.0017
Error	60671.0644	48	263.9805		
Total	101810.4466	57			

**** Altamente Significativo**

Al comparar los tratamientos se pudo observar que el T7 fue el que obtuvo menor Supervivencia (0 supervivencia) con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T9, T6, T3, T5, T8, T10, T1 y T2 (Gráfica 7).

En la Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 7), se observan los valores correspondientes al porcentaje de Supervivencia de explantes – Hipocótulo de tomate de árbol, obtenidos con los diferentes tratamientos, los cuales varían en un rango de 0.00 a 89.99% para los tratamientos T7 correspondiente a la aplicación de 1/2MS+AIA+CIN (0.2ppm+1ppm) y T9 (1/2MS)+AIA+CIN (0.2ppm+3ppm), respectivamente.



Gráfica 7. Distribución porcentual de explantes que Sobrevivieron según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*)

El T9 con un valor de 89.99% para Sobrevivencia, 5% para Oxidación Fenólica y 5% para Mortalidad que corresponderían a contenedores perdidos por contaminación, lo que permite manifestar que este tratamiento con esas características es probablemente al que mejor respuesta darían los explantes – Hipocótilo hasta los 60 días de cultivo, después de los cuales se tendría en consideración otras actividades de preservación de explantes, vía organogénesis (subcultivos, utilización de antioxidantes, medio de cultivo fresco...)

El porcentaje de Sobrevivencia de los explantes – Hipocótilo, pudo evaluarse durante el periodo en que permanecieron vivos (desde la siembra hasta los 60 días en los contenedores), el que estuvo muy relacionado con el grado de Oxidación Fenólica, Mortalidad y con la contaminación, aunque se presentó en muy poca escala; no quiere decir

que se va incrementando, sino hace referencia a los explantes que permanecieron vivos (verdes) (Figura 37).

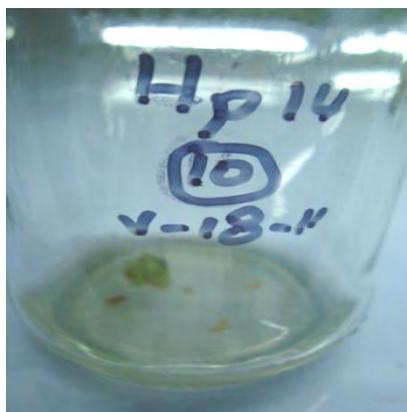


Figura 34. Sobrevivencia de explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) durante los 60 días del periodo de evaluación.

La sobrevivencia de los explantes – Hipocótilo presentó un patrón de comportamiento donde el mayor porcentaje de Sobrevivencia de los mismos fue del T9 con un 89.99% en el medio 1/2MS+AIA+CIN (0.2ppm+3ppm) seguido por el T6 con 83.33% (3/4MS)+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm) por lo que posiblemente el tipo y nivel de citocinina también influyó en el porcentaje de Sobrevivencia. Estos resultados se asemejan con lo descrito por Haberer y Kieber, (2002), quienes encontraron mayores tasas de Sobrevivencia de plántulas de *Tillandsioide sp.* utilizando las sales MS con los macronutrientes a media concentración y a la cuarta parte de su concentración.

Para el T7 (1/2MS)+AIA+CIN(0.2ppm+1ppm) el porcentaje de Sobrevivencia fue de 0% durante los 60 días de evaluación.

El T3 (MScompleto)+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm) alcanzó un valor de porcentaje del 79.99%.

Lo anterior indica que los tratamientos T9, T6 y T3 con cambio de concentración en el MS (1/2, 3/4 y completo, respectivamente), con la misma concentración de AIA (0.2ppm) y la utilización de citocininas (BAP y CIN) a la concentración de 3 ppm, son los tratamientos que presentan los mejores resultados hasta los 60 días de la siembra.

El T5 (3/4MS)+AIA+BAP (0.2ppm+2ppm) y T8(1/2MS)+AIA+CIN (0.2ppm+2ppm) con valores porcentuales de 66.66% y 62.49%, respectivamente, se observa que aún el medio de cultivo MS diluido a 3/4 y 1/2 con la misma concentración de AIA (0.2 ppm) y la misma concentración de las citocininas (BAP o CIN), la respuesta y los porcentajes promedio de Sobrevivencia, están por encima de los valores intermedios en forma general, sin embargo son considerablemente más altos para aquellos tratamientos T10, T1, T2 y T4 los cuales tienen valores de 46.66%, 37.50%, 37,49% y 16,67%, respectivamente. Estos valores mas

bajos, podrían atribuirse, entre otros factores a la posible Oxidación del material y la presencia de contaminantes a partir de los 60 días, que fue el periodo de evaluación.

Obando y Jordan, (2001) reportaron el mismo problema en el cultivo de *A. cherimola* haciendo referencia a la presencia de fenoles y polifenoxidasas, que son comunes en estas especies.

La efectividad de la combinación AIA-BAP en la inducción de brotes adventicios ha sido reportada en varias especies leñosas: *Acacia sinuata*, *Sesbania sesban*, *Prosopis cineraria*, *Dalbergia sissoo*, entre otras (Rao y Lee, 1988; Vengadesan *et al.*, 2005), evidenciando el papel relevante que juega la interacción específica auxina-citocinina dentro del proceso de desdiferenciación celular, adquisición de potencial morfogenético y neoformación de estructuras ocurridas en el callo (Street, 1979; Quoirin *et al.*, 1998).

4.2.4 Formación de Callo explante - Hipocótilo

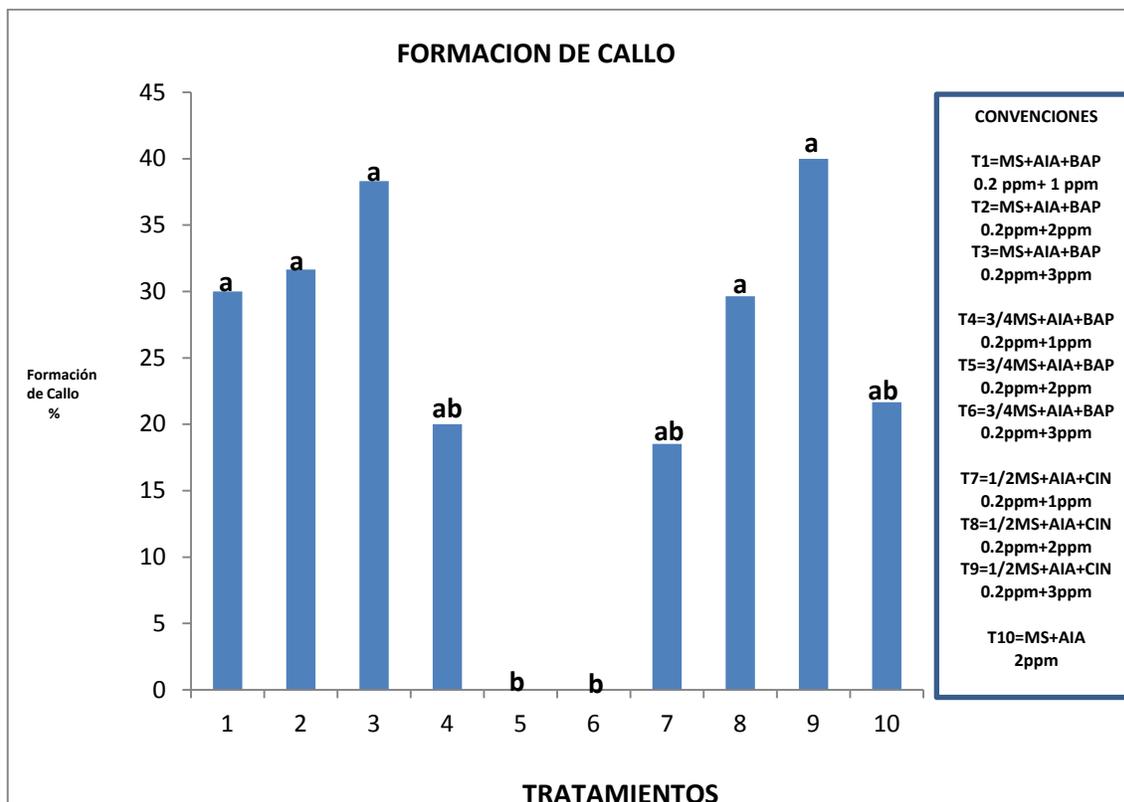
El Análisis de Varianza (Cuadro 13) permitió establecer diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos analizados; las diferentes combinaciones hormonales estudiadas, influyeron significativa y diferencialmente la formación de callo en los explantes – Hipocótilo de tomate de árbol, durante los periodos evaluados.

Cuadro 13 Análisis de Varianza de la variable Formación de Callo de explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) cultivados en medio de cultivo MS (62) modificado con diversos niveles hormonales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	17733,46	9	1970,38	2,99**	0,0038
Trat	17733,46	9	1970,38	2,99**	0,0038
Error	58071,32	88	659,90		
Total	<u>75804,78</u>	97			

****Altamente Significativo**

Al realizar la Prueba de Comparación de Medias (Gráfica 8) se observan los valores correspondientes al porcentaje de Formación de Callo de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol, obtenidos con los diferentes tratamientos, los cuales varían en un rango de 0.00 a 40.0% para los tratamientos T5, T6 y T9, respectivamente, correspondiente a la aplicación de (3/4MS)+AIA+BAP (0.2ppm+2ppm), (3/4MS)+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm) y 1/2MS+AIA+CIN (0.2ppm+3ppm), respectivamente.



Gráfica 8. Porcentaje de explantes que Formaron Callo según los tratamientos en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth.*)

A los 15 días comienzan a visualizarse la Formación de Callo en los explantes provenientes de Hipocótilos de semillas en germinación en los medios de cultivo ensayados, independientemente de los reguladores de crecimiento utilizados. Esta evaluación pudo realizarse durante todo el periodo en que los explantes permanecieron vivos (60 días que permanecieron contenedores) la que va relacionada con las evaluaciones Oxidación Fenólica, Mortalidad y Supervivencia.

En las combinaciones 1/2MS+AIA+CIN (0.2ppm+3ppm) correspondiente al T9, se observó Formación de Callo en la base del explante y en el extremo superior, teniendo en cuenta que estuvieron en contacto con el medio de cultivo, manifestando una coloración amarillenta y consistencia dura al finalizar el periodo de evaluación (60 días). Esto se diferenció con los tratamientos T5 y T6 que no mostraron Formación de callo. Esto significa que posiblemente no pueden ser potenciales para la regeneración debido a que los explantes – Hipocótilo no crecen bajo estas condiciones de medio de cultivo y concentraciones hormonales.

Se puede apreciar que aquellos tratamientos a los cuales se les adicionó solamente AIA (T1,T2 y T3) (MScompleto)+AIA+BAP (0.2ppm+ppm); MScompleto)+AIA+BAP (0.2ppm+2ppm) y (MS completo)+AIA+BAP (0.2ppm+3ppm)(con valores porcentuales de 29.99%, 31.65% y 38.31%, respectivamente, hay Formación de Callo.

En los tratamientos T5 y T6, no hubo Formación de Callo, lo cual sugiere que esta respuesta es dependiente de la dilución del medio de cultivo (3/4).

En el T10 (MScompleto)+AIA (2ppm) con un valor porcentual de 21.66%, en el T4 (3/4MS)+AIA+BAP (0.2ppm+1 ppm) con un valor de 20% y T7 (1/2MS)+AIA+Cin (0.2ppm+1ppm) con un valor porcentual del 18.52% Formaron Callosidades en menor cantidad si se compara con aquellos tratamientos a los cuales se les adicionó una relación hormonal auxina-citocinina (BAP o CIN) a una concentración de 3 ppm. Los callos desarrollados solo se dieron en los tratamientos que tenían AIA y citocininas como fitoreguladores y en esas concentraciones.

No todos los explantes que producen callos posibilitan la regeneración de plantas. La elección de un explante apropiado se complica si se pretende la regeneración de plantas a partir de callos. Son pocas las especies que pueden sumarse a *Nicotiana tabacum*, en su característica de permitir el uso de una gran variedad de explantes para producir callos capaces de regenerar plantas enteras (Roca y Mroginski 1993).

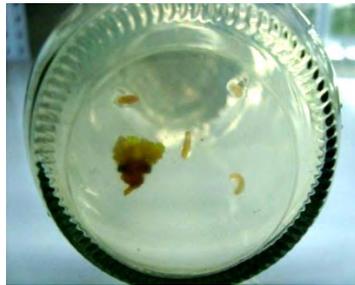


Figura 35. Formación de Callo en explante – Hipocótilo en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días. (Pertenece a uno de los contenedores que permanecieron por un tiempo, de la primera siembra).

Villa, (1999) al realizar ensayos con tomate de árbol plantea que los tejidos vegetales Forman Callo a partir de las heridas como una reacción defensiva natural y en particular en las dicotiledóneas a partir de las células del anillo de cambium.

Según Parrot, (1993) el tipo, estado fisiológico y los niveles de diferenciación y polarización de los tejidos utilizados como explantes iniciales son algunos de los factores que favorecen o interfieren la formación de callos.



Figura 36. Formación de Callo en explantes – Hipocótilo en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Senth) en el T9 que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días.

Sujatha y Dhingra, (1993) lograron la formación de callos y la regeneración de brotes adventicios a partir de callos formados de hipocótilos y hojas de *Jatropha curcas*, L. con 0.5 mg/l de BA y 1 mg/l de AIB. Sin embargo, los peciolo requieren concentraciones más bajas de estos reguladores (0.1 mg/L de BA y 0.1 mg/l de AIB continúan señalando estos autores.

En los ensayos de Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática en los que se utilizó el tercio superior del hipocótilo, formaron callo con un mayor crecimiento en comparación con los ensayos en los que se utilizó los tercios medio e inferior de los hipocótilos. La formación de callo empezó a partir de la segunda semana de cultivo en todos los medios usados. En general los callos eran de tamaño mediano a grande (de 1 a 2 cm de diámetro) y de color blanco, a excepción de los callos formados en los medios 7 y 8, los cuales eran pequeños (cerca de 5 mm de diámetro) y amarillentos. Sin embargo solo los callos que se formaron en los medios de cultivo suplementados con 5 mg/l de ANA y 9 % de sacarosa, produjeron embriones somáticos a los 24 días de iniciado el ensayo con una eficiencia del 40 %. Con los demás medios utilizados, aunque se obtuvo callo friable de color blanco brillante, éste no llegó a producir embriones somáticos. A pesar de que los callos obtenidos en los medios 1 y 6 daban indicios de tener regiones embriogénicas, éstas nunca llegaron a desarrollarse y más bien al poco tiempo se tornaron friables y adquirieron una coloración café. (Arahana, *et al.*, 2010).

Los hipocótilos han mostrado ser explantes regenerativos de estructuras variadas, así ha sido reportado por Matsouka y Hinata (1979), trabajando con *Solanum melongena* (berenjena). Ellos encontraron tres respuestas diferentes cuando cultivaron los explantes, las cuales dependían de la concentración del ANA en el medio de cultivo. Cuando ésta era de 0.8 mg*l⁻¹, solo formó callo, cuando fué disminuida a 0.016 mg*l⁻¹, se formaron callos que produjeron raíces adventicias y si la auxina no estaba presente se generaban vástagos adventicios. Al añadir BA al medio, se incrementó la formación de vástagos, pero se inhibió la de raíces y la producción de embriones somáticos.



Figura 37. Formación de Callo en explantes – Hipocótilo en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Senth*) que permanecieron durante los periodos de evaluación hasta los 60 días, los cuales se originaron en ambos extremos y posteriormente se extendió a la totalidad del explante.

Si bien, en los ocho de los diez tratamientos utilizados se formaron callos, se pudo observar que los mejores porcentajes fueron obtenidos cuando se emplea MS completo y la concentración de AIA (0.2ppm)+BAP en las tres concentraciones (1,2 y3 ppm); aquellos que se cultivaron en el medio 1/2MS +AIA (0.2ppm)+CIN (1,2 y3 ppm) también tuvieron la formación de callo.

Fue común observar visualmente diferencias en el desarrollo de los callos, algunos de los cuales crecieron más rápidamente, mientras que otros apenas lograban un mínimo crecimiento y en otros no pudo observarse ninguna formación.

La inducción de callos procedentes de explante – Hipocótilo se hace ligeramente más lenta o no presenta respuesta a la formación de callo a concentraciones bajas de las citocininas propuestas (BAP y CIN).

En todos los tratamientos que formaron callos, pasados los 60 días, tendieron a oscurecerse y su crecimiento fue lento, los callos se oxidaron y murieron.

La eficiencia de la micropropagación por sí sola, no asegura que las plantas regeneradas sean normales; en algunos casos solo se obtienen estructuras rudimentarias que no llegan a desarrollarse en plantas (Liu, *et al.*, 1990; Arroyo y Revilla, 1991)

4.3 HOJAS COTILEDONARES

Después de la siembra de las hojas cotiledonares y durante las evaluaciones iniciales se presentó contaminación y oxidación en todos los contenedores, que fueron excluidos del cuarto de crecimiento y no se contabilizaron en las siguientes evaluaciones.

La hoja es el órgano más afectado, ya que desarrolla un mesófilo desorganizado de parénquima esponjoso, con grandes espacios intercelulares. Se ha mencionado que las

causas de respuestas negativas de estas estructuras (hojas jóvenes) están ligadas a factores como los nutricionales, la baja intensidad luminosa durante la incubación, la humedad relativa en el recipiente de cultivo y a elevadas dosis de reguladores de crecimiento que producen un efecto tóxico en el explante (López 1996). Por otra parte, el oscurecimiento y la oxidación de tejidos cultivados *in vitro* puede ser el resultado de la oxidación de algunos componentes celulares por radicales libres o de compuestos fenólicos para producir quinonas, que al reaccionar pueden generar daño y hasta muerte celular (Azofeifa 2009).

En cultivo de tejidos *in vitro*, la oxidación puede presentarse en cualquier etapa del proceso donde se produzca estrés al material durante el establecimiento, como resultado del efecto abrasivo de los desinfectantes y en las siguientes etapas como resultado de los cortes que se realizan al explante. También pueden influir la composición del medio de cultivo, el tipo de envase, la hiperhidricidad, la aireación, la edad, y el genotipo del material, las especies leñosas son las más propensas a sufrir oxidaciones severas.

De acuerdo a estos resultados, este explante fue descartado de las evaluaciones, sugiriéndose que debería hacerse ensayos de tal forma que se haga un seguimiento desde el momento de la disección del explante y todos los procesos de desinfección, siembra, asepsia, requerimientos hormonales y nutricionales, condiciones ambientales exógenas.

Posiblemente la desinfección empleada no fue efectiva, Se sugiere evaluar mayores concentraciones de cloro u otros desinfectantes que permitan aumentar el número de explantes establecidos *in vitro*.

CONCLUSIONES

El alto porcentaje de contaminación endógena del material escogido y tratado como explante, limitó el establecimiento de las metodologías de micropropagación de *Solanum betaceum Cav. Sendth* en este ensayo, lo que se atribuye posiblemente a la inadecuada manera de trabajar en condiciones asépticas, por el uso de una insuficiente desinfección superficial del explante y por la presencia de microorganismo endógenos.

Es importante destacar que aunque en el presente estudio los explantes Segmentos de Hoja e Hipocótilos tuvieron oxidación fenólica, los mismos no fueron viables, por lo que es necesario hacer un mantenimiento en soluciones antioxidantes viables y al humedecimiento del material vegetal con estas soluciones durante la extracción de los explantes.

La causa principal de pérdida de explantes (mortalidad) para los Segmentos de Hoja e Hipocótilos posiblemente fué el oscurecimiento de los tejidos (fenolización, necrosamiento) y que no observaron regeneración de ningún tipo de estructuras en los explantes.

La mayor mortalidad en explante Segmentos de Hoja se presentó en aquellos tratamientos donde se utilizó el AIA en las concentraciones según los tratamientos propuestos.

La inducción de callo se limitó al nivel de las nerviaciones al inicio y posteriormente cubriendo toda la superficie del Segmento de Hoja, a medida que aumenta la concentración de la BAP junto con la de AIA, observándose que la formación de callo se produjo también en células diferentes de las nerviaciones y en la zona de corte llegando a producirse incluso hinchamiento y regeneración en la zona central de las hoja y llegando el callo a rodear todo el explante.

A los 130 días después de la siembra, se pudo evaluar la oxidación fenólica en los Segmentos de Hoja, la cual se presenta en todos los tratamientos, presentando el mayor valor el T2 con un 45% correspondiente a la incorporación de 0.8 ppm de AIA y 58.57% (0.8ppm, de AIA) para la variable mortalidad; 63.00% para el T1 (0.6ppm de AIA) el cual alcanza la mayor sobrevivencia durante el periodo de evaluación. El T5 (0.8ppm de AIA+1.0ppm de BAP) fue el que obtuvo mayor formación de callo (29%) con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T4 y T6 que tuvieron los menores valores, T1, T2, T3 y T10, los que no formaron callo, indicativo de respuesta pero en bajo porcentaje.

A los 60 días después de la siembra, en el explante – Hipocótilo se pudo determinar que a partir de este periodo, la oxidación fenólica se agudizó en todos los tratamientos inhibiendo el desarrollo y causando mortalidad en todos los explantes, hayan o no formado callo, los que hasta este periodo de tiempo permanecían verdes y como consecuencia de la oxidación fenólica comenzaron a presentar pardeamiento. T10 fué el que presentó mayor grado de oxidación fenólica con diferencias significativas cuando se comparó con los tratamientos T8, T1, T9, T2, T3, T7, T4, T5 y T6, con un valor del 21.66%; mayor mortalidad con un

valor del 23.33%. El T9 con un valor de 89.99% para sobrevivencia y con un valor del 40% en la formación de callo respecto a los demás tratamientos.

Los exudados liberados al medio de cultivo cuando se utilizó explante – Hipocótilo son inhibidores o tóxicos, en la mayoría de los casos cesa el crecimiento del explante perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y si no se remedia la situación, éste puede morir.

La inducción de callos en Hipocótilos logrados mediante la adición conjunta de AIA y BAP constituye un primer paso en el desarrollo de éste y otros procesos *in vitro*, que en un futuro contribuyan en los programas de propagación y mejoramiento de esta especie.

Tanto los Segmentos de Hoja como los Hipocótilos del tomate de árbol generan respuestas morfogénicas cuando se les cultiva *in vitro*, bajo condiciones controladas.

Los reguladores del crecimiento vegetal, a las concentraciones utilizadas, son buenos inductores de la morfogénesis.

Se puede decir que el medio de cultivo MS completo y diluido (3/4 y 1/2) suplementado con auxinas y citocininas es el adecuado para la obtención de callos de tomate de árbol a partir de Hipocótilo.

En este proceso la relación hormonal (citoquinina/auxina) usada en explantes de tomate de árbol (hipocótilos) debe estar enriquecida en citoquinina.

RECOMENDACIONES

Realizar subcultivos lo suficientemente frecuentes (2-3 semanas) con el fin de evitar un ennegrecimiento de los callos o de las suspensiones celulares por la producción de fenoles.

Para reducir la oxidación se deben utilizar o ensayar diversos antioxidantes en diferentes concentraciones; es importante destacar que aunque en el presente estudio todos los explantes tuvieron oxidación fenólica, los mismos no fueron viables, por lo que es necesario hacer un mantenimiento en solución antioxidante del material vegetal con esta solución durante la extracción de los explantes.

Se debe tener en cuenta desde el inicio del cultivo y previo al mismo que, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del contenedor de cultivo,

Es conveniente mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja. Las enzimas involucradas en la biosíntesis y la oxidación de fenoles se incrementan con la luz.

La aplicación de estas técnicas de propagación para la producción agrícola representa una valiosa herramienta para la obtención de plantas con las características que se quiere propagar, a más de proporcionar una base para futuras investigaciones a nivel celular y de reproducción clonal en tomate de árbol.

La búsqueda de contaminaciones debe incluir análisis de los organismos que pueden crecer en el medio de cultivo y por otra parte los patógenos que infectan de forma específica al cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, J.; HORGAN K.J. and THORPE, T.A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11:112-117
- ABDELWAHD, R; HAKAM, N; LABHILILI, M; UDUPA, S. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology 7: 997-1002.
- AGRONET. Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Evaluaciones Agropecuarias. 2008. Disponible en Internet: URL <http://www.agronet.gov.co/>.
- ALBORNOZ, P. 1992. El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el Ecuador. FUNDAGRO 130 p.
- ALONSO, G. M. M.. 2002 Biotecnología Aplicada a la Mejora de *Pelargonium sp.* Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. Tesis Doctoral Madrid. España 136 pp.
- AMIOT, M.; FORGET, F.; GOUPY, P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and nonenzymatic derived products. Herba Polonica 42: 237-247.
- ARAHANA, B. V.; CABRERA V.A., TORRES, M. L. 2010. Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador 11p.
- ARISTIZABAL, J.C. 1997. Fertilización en tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendth). En: Fitotecnia. Manizales, Universidad de Caldas. 2p.
- ARROYO R. y M.A. REVILLA. 1991 *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyls segments in two bell pepper cultivars. Plant Cell Rep., 10: 414-416
- AZOFEIFA, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175. Centro para la Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS). Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. 2060 San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. 175 pp.
- BEHKI, R.M. y LESLEY, S.M. 1979. Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum* L.Z. Pflanzenphysiol. 98: 83-87.

BERNAL, J. 1995. El Cultivo de tomate de árbol. En: Primer Curso de Producción de cultivos de clima medio, lulo y tomate de árbol. CORPOICA, CRECED, Garzón (Huila) pp 1-8

BERNAL, J. y DIAZ, C. 2006 Materiales locales y mejorados de tomate de árbol, mora y lulo disponibles para su evaluación en Colombia. CORPOICA – MIAGRICULTURA Rionegro, Antioquia,

BERRIOS, A.; J. SANDOVAL, F. y L.E MÜLLER. 1991 Propagación clonal *in vitro* de diferentes especies de Poró. Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica Vol 41, N° 4, pp 607-614.

BIONDI, C.W. and THORPE, T.A. 1982. Growth regulator effects, metabolite changes, and respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. Bot. GAZ. 143:20-25

BONGA, J.M. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferr, O. (eds). Plant cell cultures: Results and perspectivas. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holanda. p 253-264

_____. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In Tissue culture in forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds). La Haya Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. P 109-149

BRAY, E; BAILEY-SERRES, J; WERETILNYK, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.

BRISOON, L.; IBRAHIM, R.r; RIDEAU, M. 1988. Tissue culture of *Chrysosplenium americanum* and its potential for flavonoid production. Plant cell reports 7: 130-133.

CALIFORNIA RARE FRUIT GROWERA (CRFG) 2007. Tamarillo *Solanum betaceum* Sendth. Solanaceae.
<http://www.crfg.org/pubs/ff/tamarillo.html>.

CALDERON, E. J.R. 2000. Respuesta de dos cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.) var. Guatemalensis var. Hass y var. Americana var. Booth-8 al cultivo de tejidos in vitro. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 69 p.

CARIMI, F. ; M. ZOTTINI; E. FORMENTIN; M. TERZI, and L. LO SCHIAVO. 2003. Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. Planta. 216(#):413–421

CASSELLS, A.C. 1991. Problems in tissue culture. En: *Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H.DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.31-44.

CASSELLES, A. y CURRY, R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant cell, Tissue and organ culture* 64: 145-157.

CHRISTOPHER, T y RAJAM, M.V. 1996. Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:245-250

CONTRERAS, I y ALMEIDA, J. 2003 Micropropagación de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendth.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de los Andes. *Revista Forestal. Venezuela* 47(2) 9-13

CONSTABEL, F.; MILLER R.A. Y GAMBORG, O.L. 1971. Histological Studies on embryos produced from cell cultures of *Bromus inermis*. *Can. J. Bot.* 51, 2105-2106

CORNEJO, M.J y PRIMO, E. 1984. Organogénesis en cultivos celulares diploides y haploides de arroz. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) Madrid, España. 127 p.

COSTA, M.L.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; MARTINEZ, G.A. 2005. Effect of ethephon and 6benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase linked chlorophyll bleaching during postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °c. *Postharvest Biology and Technology* 35: 191-199.

DE GUZMAN, E.; DECENA, A. y UBALDE, E. 1980 Plantlet regeneration from unirradiated and irradiated banana shoot tip tissues cultured *in vitro*. *Philippine Agriculturist* 63(2):140-146.

DEBERG, P y; MAENE, L. 1977. rapid clonal propagation of pathogen free Pelargonium sp. plants starting from tips and apical meristems. *acta Horticulturae* 78: 449-454.

DEBERGH, P.C. y READ, P.E. 1991. Micropropagation. *En: Micropropagation: Technology and Application*. Ed. H. DPCyZR. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp.1-13.

DE LA PEÑA, F. y ROCHA, G. Análisis y evaluación del proceso de micropropagación in vitro de la curaba (*Passiflora mollissima* H.B.J.K. Bailey).

DIXON, R.A. y GONZALEZ, R.A. 1994. *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Ed. Oxford University. Oxford. pp 9-35.

DODDS, J.H. 1983 Tissue culture of hard Woods. *En: Dodds, J.H. (ed.). Tissue culture of trees*. AVI Publishing. Co. Westport, Conneticut, E.U. p 22-28

DUBLIN, P. 1991. Multiplicación vegetativa del café y cacao. En: M. W. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151: 577-619.

ESPINAL, C.F., MARTINEZ, H.J. y PEÑA, Y. 2005. Cadena de los frutales de exportación en Colombia: mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo N° 67. 68p.
<http://www.agrocadenas.gov.co>

ESPINOSA, J.A.; TRILLOS, O.; HOYOS R. A.; AFANADOR, L. y CORREA, G. 2005. Potencial de propagación *in vitro* de tomate de árbol partenocáropico (*Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt). Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Facultad de Agronomía. Revista Facultad de Agronomía. Vol 58. N° 1 p 2685-2695

FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA (s.a.). El cultivo de tomate de árbol. (s.d.b.) 22p

FLORES E., B. 2011. Propagación *in vitro* de portainjertos para guayabo: Cass (*Psidium friedrichsthalianum*) y Arrayán (*Psidium Sartorianum*). Tesis de Mestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texicoco. Edo. Mexico 59 p

GAMBORG, O.I. AND SHYLUK J.P.. 1981 Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe. Ed. Academic Press, New York. Pp 21-44

GARCIA-PAJON, C. M. y COLLADO, I. 2003. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. Natural Prod. Rpts. 20(4):426-431.

GEILFUS, F. 1994. Manual de Agroforestería para el desarrollo rural. Vol 2. Guía de especies. Ender – Caribe. Turrialba. Costa Rica. Pp 355 -357

GEORGE, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. in Practice. 2 ed. Exegetics Limited. England. 1361 p

GEORGE, E.F. (1996a). Problems in initiating and maintaining cultures. En: Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Ed. . Exegetics Ltd., Edington, Wilts. England. pp.638-669.

GEORGE, F.E. y SHERRINGTON, D.P. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Inglaterra. Exegetics. p. 177.

GILL, R. y S. GOSAL. 1996. Micropropagation of economically important tropical trees, p.230-233. In M. Dieters, A. Matheson, D. Nikles & C. Hardwood (eds.). Tree improvement for sustainable tropical forestry. QFRI-IUFRO Conference. Caloundra, Queensland, Australia.

GIRI, A. ; AHUJA, P; AJAYKUMAR, P. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Aconitum heterophyllum* Wall. Plant cell, Tissue and organ culture 32: 213-218.

GONZALEZ, L.M. 2003. Bacterias contaminante en la fase de establecimiento *in vitro* del guayabo. Instituto de biotecnología. Revista. Facultad Nacional de Agronomía. Medellin Vol 158 N°1 pp 2685-2695.

GRANELLI, A. y CARBONELLI, L. 1995 Las hormonas Vegetales. Investigación y Ciencia, 226, 41-48.

GRESSHOFF, P. y DOH, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersium sculentum*. Planta 107:161-170

HABERER, G. y J.J. KIEBER, 2002 Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128(2):354-362

HALPERIN, y WETHERELL, D.F. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer.J. Bot. 51:274:283

HARE, P.D., CRESS, W.A. and STADEN, J. VAN. 1997. The involvement of cytokinins in plant responses to environmental stress. Plant Growth Regulat. 23(1-2):79-103

HARMS, C; BAKTIR, I. y OERTLI, J. 1983. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* spp.) by multiple adventitious shoot formation. Plant cell, Tissue and organ culture 2: 93-102.

HERNÁNDEZ, B. y LEON, J.E. 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la Agricultura y la Alimentación. Italia pp. 183-186.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ISALM, R. y JOARDER, O. I. 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explant of *Carica papaya* L through organogenesis. Plant Cell Report 13:99-102

HOYOS, R 1996. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav. Sendt) *in vitro* vía organogénesis. En: Seminario Orientación estratégica de la Investigación Agropecuaria en la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín p 50.

HOYOS, R. y KAFURI, L. 1998. Sistemas biotecnológicos para la selección acelerada de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) por su resistencia a antracnosis En: Seminario de frutales de clima frío moderado, Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales (2: 1998: Manizales). Memorias del 2º Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales: Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. p 40-45.

- HOYOS, R., GIRALDO, A. y MARTINEZ, D. 1998. Establecimiento de estructuras callosas y suspensiones celulares de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). En: Seminario de frutales de clima frío moderado. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales (2:1998: Manizales). Memorias del 2º Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales: Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, 1998. 2003. p 49-51.
- HUGHES, K.W. 1981 Ornamental species. En: Conger, B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón Florida, E.U.
- HURTADO, N.H.; MORALES, A.L.; GONZALEZ- MIRET, M.L. y ESCUDERO, G. 2009. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinoides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.) Food Chemistry 117 :88-93.
- HURTADO, M.D. y MERINO, M.E. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. Mexico D.F. Mexico 232p.
- IICA – MINAGRICULTURA DE COLOMBIA. 2003. Política Agrícola Internacional. Marco Legislativo, lineamientos de política, instrumentos y estrategias. Memorias Seminario Internacional. Bogotá.
- IBARRAN, J. G.; M. VIELMA y M. TACORONTE. 1997. Estudio de organogénesis *in vitro* en *Swietenia marophylla* King. En resúmenes: XIII Congreso Venezolano de Botánica. Revista Científica UNET 9 (1): 34.
- JAISWALL, V.S. y AMIN, M.N. 1987. In vitro propagation of guava from shoot cultura of mature trees. Plant Physiol. 130: 7-12.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. 2012. *Tropicos.org*. Saint Louis, Missouri. USA. [Web en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.tropicos.org>> [con acceso el 15 de Junio de 2012].
- JELASKA, S. 1980. Growth and embryoid formation in *Cucurbita pepo* callus culture. In: Reunion Eucarpia: Application de la culture *in vitro* al amelioration des plantes potageres. Doré. C. (Ed.). Versailles, INRA, Section Legumes. P. 172-178
- KAPAUN, J. A. y Z. M. CHENG. 1997. Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm. HortScience 32 (2): 301-303.
- KARP, G. 1998. Biología celular y molecular. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. Mc.GrawHill interamericana. México D.F. México. 746 p.
- KRIKORIAN, A.D. 1991. Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151: 41-77.

- LINDSEY, K. y JONES, M.G.K. 1992 Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza (España) 274 p
- LIU, W.; W.A. PARROT; D.F. HILDEBRAND; G.B. COLLINS Y E.G. WILLIAMS. 1990 *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduce genes. Plant Cell Rep. 9:360-364
- LOBO, M. 2004. Recursos genéticos de especies frutales. En: Memorias VIII Congreso Venezolano de Fruticultura. Maracaibo, Venezuela pp 1-13
- LOPES, C. 2000. Somatic embriogénesis induction in tamarillo (*Cyphomandra betacea*). En: Mohan Jain, S.; Gupta, P.K. and Newton, R.J. eds. Somatic embryogenesis in woody plants. New York. Agritech Publicaciones. V 6, 756 p
- LUGO, U. y S. LEON. 1991. Evaluación de explantes y medios de cultivos en la callogénesis de *Psidium guajava* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 8 (4): 237.
- MADLUNG, A. y COMAI, L. 2004. The effect of stress on genoma regulation and structure. Ann Bot. 94(4):481-495
- McBRIDE, F.J. 1962. Solanaceae. En *Flora of Perú*, vol. XIII, part. V-B N° 1. Field Museum of Nat. Hist.
- MAOR, R. S. HASKIN, H. LEVI-KEDMI and SHARON. 2004. In Plant Production of Indole-3- Acetic. Acid by *Colletotrichum*. En Revista de la Facultad Nacional de Agronomía. Medellin Vol 60 N° 2. 2007.
- MARGARA, J. 1988. “Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis”. Madrid: Ediciones Mundi- Prensa.
- MARKS, T.R. y S.E. SIMPSON. 1990. Reduced phenolic oxidation at cultura initiation *in vitro* following the exposure of field – grow stockplants to darkeness or low levels of irradiance. J. Hort. Sci. 65 (2): 103-111
- MATSOUKA, H. y HINATA K. 1979. Induced organogénesis and embriogénesis en hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. J. Exp. Bot. 30:363-370.
- MEZA, N y MANZANO, J. 2007. Características morfológicas de la semilla, procesos de germinación y emergencia del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav Sendth). Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Estado De Trujillo – Venezuela. UCLA Postgrado de Horticultura Lara, Venezuela Revista. Facultad de Agronomía (LUZ). 24 Supl. 1:271 – 275
- MIDEROS, M.F. 2008. Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del Suroeste de Colombia. Revista Iberoamericana de Micología. 25:167-172

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). 2008a. Proyecto: Evaluación y Selección de Genotipos superiores de Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendth). Mejoramiento Genético de Tomate de árbol para la Zona Productora de Nariño y Putumayo. San Juan de Pasto 39p.

_____. 2008 b. Anuario Estadístico de frutales 2003-2007. Bogotá DC. 218 P En Línea www.agronet.gov.co.

MORTON, J. 1987 Tue Tomato. In: Fruits of warm climates. Miami, Florida. E.U. p 437-440

MROGINSKI, L.A; KARTHA, K.K. y SHYLUK, J.P. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by in vitro culture of immature leaves. Can. J. Bot. 59:826-830.

MURASHIGE, 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. En: Thorpe, T.A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture. University of Calgary, Calgary. Canadá. P 15-26

MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 437-497

OBANDO, M. y JORDAN, M. 2001. Regenerative responses of (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo) cultivated *in vitro*. En: Acta Horticultura. N° 560 (2001); p 429-432

OCAMPO, F. y NUÑEZ, V.M. 2007 Propagación *in vitro* de *Psidium guajava* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Revista CORPOICA Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 8(1): 22-27

OCHOA, N. 1990. Establecimiento de Cultivos *in vitro*. Fundamentos Teórico-Práctico del cultivo de Tejidos Vegetales.

OGITA, S. 2005. Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. Plant Biotechnology 22: 119–125.

OLIVERA G, P.; TAMARIZ A, C. y GUTIERREZ-CORREA, M. 2010. Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de *Perezia coerulea* Wedd, planta medicinal altoandina. *Aporte Santiaguino*, ene./jun. vol.3, no.1, p.117-124.

OLMOS, S.; LUCIANI, G. y GALDEANO, E.. 2004. “Métodos de propagación y conservación de germoplasma ”. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal, eds. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski, pp. 161-172. Buenos Aires: Ediciones INTA.

OTAHOLA, V. 1997. Regeneración de plantas de parchita (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) a partir de cultivo "in vitro" de hojas. En resúmenes: XIII Congreso Venezolano de Botánica. Revista Científica UNET 9 (1): 36.

OTANG NTUI, S.V.; THIRUKKUMARAN, G; IIOKA, S; MII, M. 2009. Eficiencia en la regeneración a partir de la organogénesis de melón "Egussi" (*Citrullus coloncynthis* L). 2008. En: Scientia Horticulture 119 p 397-402.

OVIEDO, Y. y GUEVARA, E. 1988. "Propagación in vitro de la estaticia *Limonium sinatum* CV. Mindnigh blue". Agronomía Costarricense 12(1): 113-122.

PATIÑO, C.; HOYOS, R. y AFANADOR, L. 2007. Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* Cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. Revista Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Vol 60 N° 2 p 3923-3937.

PARROT, T. W. 1993 Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. San José, Costa Rica. Proceedings. INIBAP

PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España 325 p

PRINGLE, G.J. y MURRAY, B.G. 1991. Interspecific hybridization involving the tamarillo, (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendth. (Solanaceae) New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 19:103-111

POMPEU, G, GRATAOÃ, P; VITORELLO, V; AZEVEDO, R. 2008. Antioxidant isoenzyme responses to nickel induced stress in tobacco cell suspension culture. Scientia Agricola 65: 548-552.

QUINTERO, L.E., SALAZAR, M. y ACEVEDO, X. 2008. Costos de producción de uchuva y tomate de árbol en Colombia. Observatorio Agrocadenas de Colombia. Documento de Trabajo N° 45. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá Colombia. 8 p

RAO, G; WILLISON, J; RATNAYAKE, W; AAKMAN, R. 1985. Phenolics of suberized envelopes generated by isolated tomato locule protoplasts. Phytochemistry 24: 2127-2128.

RAVEENDAR, S.; PREMKUMAR, S.; SASIKUMAR, S.; IGNACIMUNTHUM, P.; AGASTIAN, B. 2009. Desarrollo de un rápido y muy eficiente sistema de organogénesis en caupi (*Vigna unguinata* (L) Walpen) 2008. Unidad de Biotecnología Vegetal, Instituto de Entomología Loyola College, Chennai – 600034, Tamil Nader, India En: Science Direct. Journal de Botanica. South Africa 75. 17-21

RAMIREZ V., M. del C. y E. G. SALAZAR. 1998. Método de desinfección y efecto de citocininas en el cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de *Psidium guajava* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 15:162-173.

_____. 1998. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros del guayabo (*Psidium guajava* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 15: 211-221

RAO, A.O. y LEE, S.K. 1988 Importance of tissue culture in tree propagation. In International Congress of plant tissue and cell culture. Tokyo, Japanes Asociation for plant. Tissue culture p 715-718.

REVEENDAR, A.; SASIKUMAR, S.; IGNACIMUTHU, S.Y AGASTIAM, P. 2009. Development of rapad highly efficient system of organogénesis in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) South African Journal of Botany 75 17-21 Elsevier Science Direct,

REINERT, J. y YEOMAN, M.M. 1982. Plant cell and tisuee culture. A laboratory manual. Springer – Verlag. Berlin. 83 p.

REUTHER, G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *in vitro* and greenhouse conditions. Acta Horticulturae 226: 91-98.

REY, H.J. Y MROGINSKI, L.A. 1978. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)- Phytion 36: 171-176

REY, H.Y., MROGINSKI, I. A. Y FERNANDEZ, A. 1980. Inducción de callos y raíces en explantes de seis cultivares de mandioca *Manihot esculentea* Crantz). Phytion 39:161-170

ROCA, W. y MROGINSKI, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

SALAZAR, E. y C. ROMERO. 1997. Cultivo *in vitro* de segmentos de hojas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 13 (3): 293-302.

SAÑUDO, B., ARTEAGA, G., CHAVES, G. VALLEJO, W. 2002. Introducción al Manejo de Frutales Andinos. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. UNED. 64-67 p

SALISBURY, F., ROSS, C. 2000. Fisiología Vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Espana: Thomson editores Paraninfo.

SELVARAY, N.; VASUDEBAM, M.; MANICKAVASAYAM, S.; KASTURIRENGAN, A. GANAPATHI, A. 2006. Alta frecuencia de regeneración a partir de cotiledones de pepino (*Cucumis sativus* L.). Departamento de Botánica, EVR Pexiyar College, Tiruchirappelli 620023, India. Departamento de Biología y Ciencias de Medicamentos, Pai

Chai University, Corea del Sur. Departamento de Biotecnología, Universidad Bharathidasam, Tiruchirappalli 620024, India. Em: Scientia Horticulture 112 (2007) 2-8

SONDHAL, M. R. y W. R. SHARP. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol 94: 101-108.

SONDHAL, M., T. NAKANURA y W. SHARP. 1991. Propagación *in vitro* del café. En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 151:621-642.

STREET, H.E. 1977^a. Introduction. En: Street, H.E. (ed). Plant tissue an cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p 1-10

_____. 1977^b. Cell (suspension) cultures-techniques. En: Street, H.E. (ed). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 61-102

SUJATHA, M. y M. DHINGRA. 1993. Rapid Plant Regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 35:293-296

TABIYEH, D; BERNARD, F; SHACKER, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and AG3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. Acta Horticulturae 726: 201-204.

TAFUR, R. 2006. Propuesta frutícola para Colombia y su impacto en la actividad económica, nacional, regional y departamental. En: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Memorias Primer Congreso Colombiano de Horticultura. 240 p

TAMAYO, A., BERNAL, J., HINCAPIE, M., y LONDOÑO, M. 1999. Frutales de clima moderado. CORPOICA La Selva, Antioquia. 10 p.

THORPE, T.A. 1983. Biotechnical applications of tissue culture to forest tree improvement. En: Biotechnological Advances. V. 1, p 263-278

TISSERAT, B.; ESAN, E.B. y MURASHIGE, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. 1:1-28

TORO, J.C. 2001. Situación actual de la investigación y desarrollo de frutas tropicales en Colombia. In: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Propuesta para un Programa de Frutas Tropicales. Bogotá, CIAT Pp 1.42.

TREJO, E.J.L., VALDEZ, T.R.; TREJO, T.G.; CRUZ, S.F. y RODRIGUEZ, M. s.a. Influencia de auxinas y citocininas en la inducción de callos en Hipocótilo de *Prosopis laevigata*. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biotecnología, universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

- VAN STADEN, J; FENNELL, C; TAYLOR, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- VENGADESAN, G., SELVARJ, N., ANAND, P.GABA, V. 2005. Ontogeny Of somaticv embryos in cucumer (*Cucumis sativus* L.) *in vitro* *Cell Dev. Biol. Plant* 41, 789-793
- VILLA, L., J. A. 1999. Cultivo del tomate de árbol. Politécnico Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias y Tecnologías Aplicadas, Medellín, Colombia. 127 p.
- VILLALOBOS, A.; LEUNG D.W.M. and THORPE, T.A. 1984b Ligth- cytokinin interactions in shoot formation in cultured cotyledon explantas of radiate pine. *Physiol. Plant.* 61: 497:504
- VUYLSTEKE, DR. 1989. Shot-tip culture for de propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Roma, International Board for Plant Genetic Resources. p. 56.
- WEAVER. R.J. 1987. Reguladores de Crecimiento de las Plantas en la Agricultura. Universidad de California. Editorial TRILLA. Mexico 622 p
- YAGUACHE, C. A. A. 2009 “Germinación, Brotación y onservación *in vitro* de *Solanum cajanumensis*, Kunth (tomate de árbol silvestre) Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de Ciencias Agropecuarias. Ingenieria Agropecuaria”. Tesis de grado de Ingeniero Agropecuario Loja - Ecuador
- YEUNG, E.C., AITKEN, J., BIONDI, S. and THORPE. 1981. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiate pine. *Bot. Gaz* 142: 494-501.
- ZAVALETA-MANCERA, H; LOPEZ-DELGADO, H; LOZA TAVERA, H; MORA HERRERA, M.; TREVILLA GARCIA, C; VARGAS SUAREZ, M; OUGHAM, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves thechloroplast integrity during dark senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.
- ZHENG, W; XIAO – XU DAN; DAI HUAN; QING CHEN. 2005. Derivados de la regeneración de tres especies de *Lysimanchia spp*, cultivados *in vitro*. En: *Scientia Horticulture* 122 (2009) 138 – 144 www.elsevier.com/locate/scihort

ANEXOS

Anexo A. Composición del Medio de Cultivo Murashige – Skoog (62)

Solución n Nº	Constituyentes	Cant/Const. Sol. Madre (mg)	Concentración Final		Volumen/Sol. Madre/litro de Medio Basal
			Masa (mg)	Moles	
1	NH ₄ NO ₃	82.500	1650	20.6 (mM)	20 ml
	KNO ₃	95.000	1900	18.8 (mM)	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	18.500	370	1.5 (mM)	
	KH ₂ PO ₄	8.500	170	1.25 (mM)	
2	H ₃ BO ₃	620	6.2	100 (µM)	1.0 ml
	MnSO ₄ .H ₂ O	2.176	22.3	100 (µM)	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860	8.6	29.0 (µM)	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	26	0.25	1.03 (µM)	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5	0.025	0.10 (µM)	
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	2.5	0.025	0.105 (µM)	
3	KI	75	0.83	6 (µM)	1.0 ml
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	15.000	440	2.99 (µM)	2.9 ml
5	Na ₂ EDTA	1.492	37.3	100 (µM)	5.0 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1.114	27.8	100 (µM)	
	Mio Inositol		100.00		
	Acio nicotínico		1.0		
	Piridoxina HCl		1.0		
	Tiamina HCl		10.0		

Anexo B. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Oxidación Fenólica en explante - Segmentos de Hoja en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₉	IMM T ₂ H ₂₀	IMM T ₃ H ₂₁	IMM T ₄ H ₂₂	IMM T ₅ H ₂₃	IMM T ₆ H ₂₄	IMM T ₇ H ₂₅	IMM T ₈ H ₂₆	IMM T ₉ H ₂₇	IMM T ₁₀ H _{Tes}
1	0	50	50	25	20	-	-	20	16	20
2	0	50	50	25	0	26,66	20	20	20	50
3	0	40	10	33,33	12	0	20	20	20	0
4	0	50	0	25	16	26,66	20	20	20	50
5	0	-	-	25	0	0	13,33	20	20	0
6	0	50	50	25	0	0	26,66	33,33	13,33	50
7	0	50	50	25	8	8	26,66	25	20	50
8	50	50	30	20	0	-	16	-	20	0
9	0	-	20	25	0	0		20	20	50
10	26,66	20	50	20	0	0	16	0	20	26,66

Anexo C. Porcentaje de Oxidación Fenólica de explantes – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*) presentado en los diferentes tratamientos

Trat	Medias			
2	45.00	a		
3	34.44	a	b	
10	29.67	a	b	
4	24.83		b	c
7	21.59		b	c
9	20.30		b	c
8	16.59		b	c
6	8.76			c
1	7.67			c
5	5.09			c

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Anexo D. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Mortalidad en explante - Segmentos de Hoja en tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₉	IMM T ₂ H ₂₀	IMM T ₃ H ₂₁	IMM T ₄ H ₂₂	IMM T ₅ H ₂₃	IMM T ₆ H ₂₄	IMM T ₇ H ₂₅	IMM T ₈ H ₂₆	IMM T ₉ H ₂₇	IMM T ₁₀ H _{Tes}
1	0	50	50	25	0	40	20	10	15	20
2	0	100	50	25	0	20	20	0	25	0
3	50	0	40	0	0	20	20	15	25	0
4	0	-	30	20	0	0	8	15	25	0
5	-	-	-	25	26,66	0	26,66	8	25	0
6	-	100	50	15	0	0	33,33	0	26,66	0
7	0	-	50	10	0	-	16	0	25	0
8	50	40	30	8	0	0	-	-	20	0
9	80	100	20	15	0	0	16	26,66	25	0
10	30	20	50	20	0	40	20	4	20	26,66

Anexo E. Porcentaje de Mortalidad de explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*) presentada en los diferentes tratamientos.

Trat	Medias				
2	58.57	a			
3	37.50	a	b		
1	31.11		b	c	
9	23.17		b	c	d
7	20.74		b	c	d
4	16.30		b	c	d
6	10.00			c	d
8	6.50			c	d
10	4.67			c	d
5	2.67				d

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Anexo F. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Sobrevivencia en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*)

Repet.	IMM T ₁ H ₁₉	IMM T ₂ H ₂₀	IMM T ₃ H ₂₁	IMM T ₄ H ₂₂	IMM T ₅ H ₂₃	IMM T ₆ H ₂₄	IMM T ₇ H ₂₅	IMM T ₈ H ₂₆	IMM T ₉ H ₂₇	IMM T ₁₀ H _{Tes}
1	50	50	50	13	20	100	100	15	10	80
2	100	60	10	26,66	100	7	13	33	7	33
3	40	50	10	50	8	20	80	33,33	6,66	33,33
4	100	100	20	5	4	6,66	13,33	33,33	13,33	33,33
5	100	100	100	26,66	6,66	20	50	4	7	33
6	100	100	50	10	20	20	6,66	33,33	13,33	33,33
7	100	50	50	15	20	20	40	33,33	13,33	50
8	10	10	20	12	20	100	8	100	5	33,33
9	10	10	30	10	20	20	100	33,33	20	33,33
10	20	6,66	20	30	20	20	4	12	5	6,66

Anexo G. Porcentaje de Sobrevivencia presentada en los diferentes tratamientos explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Trat	Medias			
1	63.00	a		
2	53.67	a	b	
7	41.50	a	b	c
10	40.30	a	b	c
3	36.00	a	b	c
8	33.07	a	b	c
5	30.17	a	b	c
6	24.30	a	b	c
4	15.03		b	c
9	10.07			c

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Anexo H. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Formación de Callo en explante – Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₉	IMM T ₂ H ₂₀	IMM T ₃ H ₂₁	IMM T ₄ H ₂₂	IMM T ₅ H ₂₃	IMM T ₆ H ₂₄	IMM T ₇ H ₂₅	IMM T ₈ H ₂₆	IMM T ₉ H ₂₇	IMM T ₁₀ H _{Tes}
1	0	0	0	0	20	0	33,33	33,33	20	0
2	0	0	0	0	100	20	33,33	20	33,33	0
3	0	0	0	0	20	6,66	12	0	33,33	0
4	0	0	0	0	20	20	33,33	20	33,33	0
5	0	0	0	0	26,66	20	20	26,66	26,66	0
6	0	0	0	5,00	20	20	16	40	33,33	0
7	0	0	0	25	20		20	20	13,33	0
8	0	0	0	12	20	20	33,33	20	0	0
9	0	0	0	5	20	20	33,33	20	20	0
10	0	0	0	10	20	0	12	33,33	20	0

Anexo I. Porcentaje de Formacion de Callo presentado en los diferentes tratamientos en explante - Segmentos de Hoja de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*)

Trat Medias

5	29.63	a			
8	21.82	a	b		
9	21.21	a	b		
7	18.18	a	b		
6	14.07	a	b	c	
4	5.78		b	c	
1	0.00			c	
10	0.00			c	
2	0.00			c	
3	0.00			c	

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0.05)

Anexo J. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Oxidación Fenólica en explante - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₀	IMM T ₂ H ₁₁	IMM T ₃ H ₁₂	IMM T ₄ H ₁₃	IMM T ₅ H ₁₄	IMM T ₆ H ₁₅	IMM T ₇ H ₁₆	IMM T ₈ H ₁₇	IMM T ₉ H ₁₈	IMM T ₁₀ H ₁₉
1	0	0	0	0	0	0	0	16,665	0	49,995
2	0	0	0	0	0	0	0	0	16,665	33,33
3	16,665	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	16,665	0	66,66
5	0	0	0	0	0	0	0	49,995	16,665	33,3
6	0	33,33	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	33	0	0	0	0	0	0	0	16,665	0
9	0	0	0	0	0	0	0	16,665	0	33,33
10	16,665	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo K. Porcentaje de Oxidación Fenólica de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*) presentado en los diferentes tratamientos.

Trat	Medias	
10	21,66	a
8	10,00	b
1	6,63	b
9	5,00	b
2	3,33	b
3	0,00	b
7	0,00	b
4	0,00	b
5	0,00	b
6	0,00	b

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexo L. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Mortalidad en explante - Hipocotilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₀	IMM T ₂ H ₁₁	IMM T ₃ H ₁₂	IMM T ₄ H ₁₃	IMM T ₅ H ₁₄	IMM T ₆ H ₁₅	IMM T ₇ H ₁₆	IMM T ₈ H ₁₇	IMM T ₉ H ₁₈	IMM T ₁₀ H ₁₉
1	49,995	0	0	33,33	0	16,665	0	0	0	49,995
2	0	0	66,66	0	0	0	0	0	16,665	16,65
3	49,995	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66,66
5	0	0	0	0	0	33,33	0	16,665	16,665	66,66
6	33,33	33,33	0	0	0	33,33	0	0	0	33,33
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	33,33	0	0	0	0	0	0	0	16,665	0
9	0	0	0	0	0	0	33,33	16,665	0	0
10	49,995	0	0	0	16,665	0	0	0	0	0

Anexo M. Porcentaje de Mortalidad de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*) presentada en los diferentes tratamientos

Trat Medias

10	23,33	a		
1	21,66	a	b	
6	8,33		b	c
3	6,67			c
9	5,00			c
8	3,33			c
7	3,33			c
4	3,33			c
2	3,33			c
5	1,67			c

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexo N. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Sobrevivencia en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₀	IMM T ₂ H ₁₁	IMM T ₃ H ₁₂	IMM H ₄ H ₁₃	IMM H ₅ H ₁₄	IMM H ₆ H ₁₅	IMM H ₇ H ₁₆	IMM H ₈ H ₁₇	IMM H ₉ H ₁₈	IMM H ₁₀ H ₁₉
1	33,33	66,66	66,66	-	99,99	66,66	0	99,99	99,99	0
2	99,99	99,99	-	-	99,99	99,99	0	66,66	66,66	0
3	33,33	99,9	99,99	66,66	-	-	0	-	99,99	99,99
4	-	0	99,99	-	-	-	-	99,99	99,99	-
5	33,33	0	-	-	-	-	0	66,66	66,66	-
6	66,66	33,33	33,33	-	-	-	-	99,99	99,99	33,33
7	33,33	-	-	0	-	-	-	0	99,99	99,99
8	-	-	-	-	0	-	-	0	66,66	-
9	0	0	-	0	-	-	-	-	99,99	-
10	0	0	99,99	0	66,66	-	-	66,66	99,99	-

Anexo O. Porcentaje de Sobrevivencia de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav. Sendth*) presentada en los diferentes tratamientos.

Trat Medias

9	89.99	a			
6	83.33	a			
3	79.99	a			
5	66.66	a		b	
8	62.49	a		b	
10	46.66	a		b	c
1	37.50	a		b	c
2	37.49	a		b	c
4	16.67			b	c
7	0.00				c

Ltras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Anexo P. Valores de Incremento Medio Mensual para cada uno de los tratamientos para Formacion de Callo en explante – Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. Sendth).

Repet.	IMM T ₁ H ₁₀	IMM T ₂ H ₁₁	IMM T ₃ H ₁₂	IMM H ₄ H ₁₃	IMM H ₅ H ₁₄	IMM H ₆ H ₁₅	IMM H ₇ H ₁₆	IMM H ₈ H ₁₇	IMM H ₉ H ₁₈	IMM H ₁₀ H ₁₉
1	16,665	16,665	49,95	0	0	0	99,99,	49,995	49,995	0
2	49,95	49,95	66,66	0	0	0	66,66	16,665	16,665	0
3	0	33,33	49,95	66,66	0	0	0	0	33,33	49,995
4	0	0	49,95	0	0	0	0	0	49,995	0
5	49,95	66,66	33,33	0	0	0	0	0	49,995	33,33
6	0	16,665	16,665	66,66	0	0	0	49,995	49,995	16,665
7	16,665	0	0	0	0	0	0	66,66	0	49,995
8	66,66	33,33	0	66,66	0	0	99,99	0	49,995	0
9	66,66	49,95	66,66	0	0	0	0	99,99	49,995	0
10	33,33	49,95	49,95	0	0	0	0	0	49,995	66,66

Anexo Q. Porcentaje de Formacion de Callo de explantes - Hipocótilo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Sendth) Cav. presentada en los diferentes tratamientos

Trat Medias

9	40,00	a	
3	38,31	a	
2	31,65	a	
1	29,99	a	
8	29,63	a	
10	21,66	a	b
4	20,00	a	b
7	18,52	a	b
5	0,00		b
6	0,00		b

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)