

REGENERACIÓN “*IN VITRO*” DE PLANTULAS DE TOMATE DE ÁRBOL  
(*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt) A PARTIR DE HIPOCOTILOS.

WILMER LIBEY DELGADO GUALMATAN  
YEDSENIA KATHERINE INSUASTI INAGAN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA  
SAN JUAN DE PASTO

2015

REGENERACIÓN “*IN VITRO*” DE PLANTULAS DE TOMATE DE ÁRBOL  
(*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt) A PARTIR DE HIPOCOTILOS.

WILMER LIBEY DELGADO GUALMATAN  
YEDSENIA KATHERINE INSUASTI INAGAN

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Ingeniero Agrónomo

ASESOR  
HERNADO CRIOLLO ESCOBAR I.A., M.Sc., Ph.D

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRICOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA  
SAN JUAN DE PASTO

2015

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva de los autores

Artículo 1 del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1996 emanado del honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

---

---

Asesor de pasantía

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darnos la fuerza y voluntad para poder terminar una etapa mas de nuestra vida.

A nuestros padres por el apoyo incondicional brindado

Al grupo de investigación en producción de frutales andinos por todo el apoyo y colaboración prestada.

A los Doctores Hernando Criollo, Tulio Cesar Lagos y Carlos Benavides por la paciencia e interés que le dedicaron a este trabajo.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes alternativas de micropropagación que permitan determinar la opción más eficiente para la multiplicación masiva de plántulas de tomate de árbol; se evaluaron tres auxinas AIA, ANA y 2,4-D en diferentes dosis, combinadas con BAP (1,0 mg.L<sup>-1</sup> y 3,0 mg.L<sup>-1</sup>), en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) utilizando hipocotilos como explantes. Para en análisis estadístico se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial con 27 tratamientos para un total de 270 unidades experimentales. El mayor promedio de número de brotes se obtuvo con AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup> con 11,6 brotes; el porcentaje de enraizamiento del explante fue mayor en los testigos sin fitorreguladores y con la inclusión de AIA. La variable formación de plantas completas tuvo mejor comportamiento con AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (36,9%). El mejor porcentaje de enraizamiento de brotes obtenidos a partir de hipocotilos, se obtuvo con las dosis hormonales AIA 1,0 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup>, con 96,23%. Las plantas enraizadas fueron exitosamente trasferidas etapa de endurecimiento con un 96,6% de supervivencia.

**Palabras clave:** BAP, AIA, ANA, 2,4-D, micropropagación, hipocotilos.

## ABSTRACT

This study was carry out to evaluate different alternatives of micropropagation that would allow us to determine the most efficient option for the mass production of tomato tree plants; Hypocotyls explants were evaluated under the effect of was Murashige y Skoog (MS). For the statistical analysis was used unrestrictedly randomized design with factorial arrangement with 27 treatments for full 270 experimental units. The largest average of number of shoots was obtained when using AIA 0.5 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup> with a value of 11,6 shoots. The best treatment for rooting of hypocotyls was AIA and the control without phyto regulators. The variable formation of complete plants responded better to AIA 0.5mg.L<sup>-1</sup>, with a 36.9%. The best average for rooting of shoots obtained was obtained with AIA 1,0 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup> with 96,23%. The rooted plant were successfully transplanted into the soil with a 96.6% survival rate.

**Key words:** BAP, AIA, ANA, 2,4-D, micropropagation, hypocotyls.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSION .....	13
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23

## INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol es una fruta tropical de origen andino (Pringle y Murray, 1991) de amplias posibilidades de exportación en los mercados internacionales (ProColombia, 2015). Se considera que es una fruta importante a nivel agrícola por su valor nutricional y comercial (Bonnet y Cárdenas, 2012). También es una alternativa de para la diversificación de cultivos, pese a su demanda no hay paquetes tecnológicos sostenibles que involucren variedades o híbridos mejorados, que permitan desarrollar protocolos de micropropagación que proporcionen clones vigorosos para su posterior regeneración (CIAT, 2003).

En Colombia existen 8.399 has sembradas de tomate de árbol generalmente el cultivo se realiza con semilla del agricultor con alta heterogenidad genética, de igual manera en Nariño con 381 has sembradas, los bajos niveles tecnológicos del cultivo y los problemas sanitarios severos, hacen que su rendimiento ( $6,8 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) sea muy inferior al promedio nacional ( $19,9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) (AGRONET, 2015).

Las dificultades para el mantenimiento de la variabilidad genética en campo, así como la conservación de los atributos genéticos de las variedades producidas por el fitomejorador, debido al carácter alógamo de la especie, requieren de metodologías de multiplicación vegetal de alta eficiencia que posean fidelidad genética; la técnica de cultivos de tejidos ofrece esta posibilidad, además de reducen los riesgos por contaminación de patógenos, requieren de áreas reducidas para la producción de grandes cantidades de plantas uniformes (clones) y facilidad de transporte (Rout *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que utiliza el concepto de la totipotencia celular, como uno de sus fundamentos; este concepto indica que cualquier célula vegetal, contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, independiente de su función o posición en ella (Ferl y Paul, 2000). Esta técnica facilita una rápida multiplicación de variedades mejoradas o de clones élite y se constituyen

en una herramienta fundamental para la ingeniería genética (Kothari *et al.*, 2010). Ya que permiten multiplicar de forma rápida, económica y rentable, material élite en cualquier época del año (Calva y Pérez, 2005).

Contreras y Almeida (2003) cultivaron cotiledones e hipocotilos de semillas de tomate de árbol recién germinadas en medio MS suplementado con BA (2.0, 3.5, 5.0 mg.L<sup>-1</sup>) + AIA (0.5, 0.75, 1.0 mg.L<sup>-1</sup>) como inductores de morfogénesis; en dos meses, observaron organogénesis de yemas y obtuvieron plantas normales al cultivarlas en medio MS sin reguladores.

Giraldo y Martínez (1998) encontraron que la presencia de BAP en el medio de cultivo, promovió la formación de brotes en los explantes foliares de hojas de plántulas propagadas *in vitro* de las variedades de tomate de árbol común y tomate de árbol rojo.

Apraez *et al.* (2012) regeneraron plantas de *Cyphomandra betacea* utilizando MS + 5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D a partir de callos, con un porcentaje de 14,66 %. Guimarães *et al.* (1996) describieron la obtención de plántulas de tomate *in vitro* por organogénesis, utilizando como explantes hipocotilos y hojas cotiledonares de tomate de árbol en presencia de ANA + AIB, además describen procesos organogénicos y embriogénicos de tomate de árbol a partir de diferentes explantes como hipocotilos, cotiledones, raíces, embriones cigóticos maduros y a partir de protoplastos.

Basados en lo anterior se realizó el presente trabajo con el objeto de contribuir al conocimiento de la producción *in vitro* de plántulas de tomate de árbol, a partir de hipocotilos evaluando el efecto de diferentes combinaciones de fitorreguladores y la capacidad de las plántulas obtenidas para aclimatarse.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y el invernadero de la Universidad de Nariño ubicados en San Juan de Pasto, Departamento de Nariño - Colombia a una altitud de 2.540 msnm con una temperatura promedio interna de 18°C y 24°C, respectivamente.

**Obtención de semilla.** La semilla sexual, se obtuvo a partir de frutos en estado de madurez completa, seleccionados de un mismo árbol de tomate Rojo Común y teniendo en cuenta sus características de sanidad y productividad.

**Lavado y siembra de semilla *in vitro*.** La desinfestación de las semillas se realizó con inmersión en yodo al 5% durante 15 minutos, tres lavados con agua estéril; Estas semillas se sumergieron en hipoclorito al 1,5% durante 10 minutos y se lavaron cinco veces con agua estéril; La siembra de estas semillas se realizó en cámara de flujo, colocando ocho semillas por frasco con 20 ml de medio de cultivo agar (7,0 g.l<sup>-1</sup>).

Seis semanas después de la siembra se extrajeron las plántulas para separar los hipocotilos que se dividieron en trozos de 1 cm aproximadamente; éstos se colocaron horizontalmente sobre un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes dosis de fitoreguladores (Tabla 1), con 7,0 g.L<sup>-1</sup> de agar, 3% de sacarosa y un pH de 5,8. Los explantes sembrados se mantuvieron en condiciones de 12h/12h de luz y una temperatura media de 22°C.

**Tabla 1.** Tratamientos correspondientes a los fitorreguladores y sus combinaciones, utilizados en la producción de plántulas a partir de hipocotilos de *C. betacea*.

Trat	Fitorreguladores	Trat	Fitorreguladores
1	ANA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>	15	2,4-D 1,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>
2	ANA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	16	2,4-D 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>
3	ANA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>	17	2,4-D 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>
4	ANA 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>	18	2,4-D 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>
5	ANA 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	19	AIA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>
6	ANA 3,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>	20	AIA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>
7	ANA 6,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>	21	AIA 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>
8	ANA 6,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	22	AIA 0,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>
9	ANA 6,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>	23	AIA 0,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>
10	2,4-D 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>	24	AIA 0,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>
11	2,4-D 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	25	AIA 1,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>
12	2,4-D 0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3 mg.L <sup>-1</sup>	26	AIA 1,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>
13	2,4-D 1,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 0 mg.L <sup>-1</sup>	27	AIA 1,0 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 3,0 mg.L <sup>-1</sup>
14	2,4-D 1,5 mg.L <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L <sup>-1</sup>		

**Diseño experimental.** Los tratamientos se distribuyeron en un diseño irrestrictamente al azar (DÍA) con arreglo factorial; factor A: dosis de BAP (0 mg.L<sup>-1</sup>, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> y 3,0 mg.L<sup>-1</sup>), factor B: auxinas (ANA, AIA, 2,4 D) y factor C: dosis de auxinas (tres) para un total de 27 tratamientos, con diez repeticiones y 270 unidades experimentales; cada unidad experimental estuvo conformada por tres explantes.

**Variabes.** Cada 30 días y por un espacio de 60 días se realizaron las siguientes evaluaciones:

**Explantos con emisión de brotes.** Se contó el número de brotes totales/ número de explantes sembrados; considerando un brote como una estructura diferenciada con tallo y hojas.

**Explantos enraizados.** Se contó el número de explantes con emisión de raíces mediante organogénesis directa/número de explantes sembrados.

**Explantos con emisión de plantas completas.** Se contó el número de explantes que formaron plantas completas (raíz, tallo, hojas) mediante organogénesis directa.

**Producción de plántulas.** A los 60 días, se procedió a trasplantar los brotes obtenidos de aquellos tratamientos que los generaron (AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>+ BAP 1,5 mg.L<sup>-1</sup>; AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>+ BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup>; BAP 3,0 mg.L<sup>-1</sup>; BAP 1,5 mg.L<sup>-1</sup>; AIA 1,0 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L<sup>-1</sup>; AIA 1,0 mg.L<sup>-1</sup>+ BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>) se cortaron y se sembraron en medio básico MS (1962), suplementado con AG<sub>3</sub> (0,5 mg.L<sup>-1</sup>).

El análisis de los tratamientos por su producción de plántulas se realizó con base en el modelo del diseño irrestrictamente al azar (DIA) con diez repeticiones. Se evaluó 30 días después de la siembra el porcentaje de enraizamiento de los brotes. Aquellos tratamientos que mostraron diferencias estadísticas se sometieron a una prueba de comparación de medias (DMS) al 95% de confiabilidad.

**Fase de aclimatación.** Se tomaron 10 plantas por cada tratamiento y se sembraron individualmente en bandejas de germinación empleando turba como sustrato y se colocaron en condiciones de invernadero con alta humedad relativa. Treinta días después se procedió a evaluar el porcentaje de aclimatación con base en el número de plántulas vivas en sustrato/plántulas transferidas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 2 se muestra el Análisis de Varianza (ANDEVA) para las variables número de brotes (NB), porcentaje de enraizamiento (R), porcentaje de formación de plántulas completas (FPC), con diferencias estadísticas altamente significativas en todas las fuentes de variación.

**Tabla 2.** ANDEVA para las variables número de brotes (NB), porcentaje de enraizamiento (PE) y porcentaje de formación de plántulas completas (PPC) a partir de hipocotilos de tomate de árbol (*C. betacea*). Sembrados en medio de cultivo MS con diferentes combinaciones de fitorreguladores.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		NB	PE	PPC
Dosis BAP (A)	2	820**	73129,7**	5963,3**
Auxinas (B)	2	628,6**	22536,9**	1201,6**
Dosis de auxina (C)	2	766,9**	10482,9**	716,8**
A*B	4	160,7**	5748,4**	380,8**
A*C	4	119,1**	9906,4**	1201,6**
B*C	4	156,8**	12875,9**	716,8**
A*B*C	8	30,8**	21686,2**	380,8**
Error	243	5,5	144,4	21,9

\*= nivel de significancia al 95% de confiabilidad; \*\*= nivel de significancia al 99% de confiabilidad.

**Numero de brotes (NB).** La formación de brotes fue estimulada por la aplicación de diferentes dosis de BAP solas o combinadas con AIA y totalmente inhibidas por la inclusión de los fitorreguladores ANA y 2,4-D (Figura 1). Estos resultados fueron similares a los reportados por Howell *et al.* (2003) quienes afirman que las citoquininas son las hormonas claves para inducir la formación de nuevos brotes en diversos explantes *in vitro* (hojas, raíces, cotiledones). La célula vegetal indiferenciada puede tomar dos caminos, crecer y dividirse o alargarse sin dividirse, la primera permanece indiferenciada, mientras que la segunda tiende a diferenciarse (Raven *et al.*, 1992). Coenen y Lomax (1997) afirman

que gran parte de las respuestas de totipotencia celular, de morfogénesis *in vitro* y de regeneración de plantas, ocurren en presencia de niveles apropiados de citoquininas y auxinas.

La incorporación de ANA y de 2,4-D en sus dosis evaluadas, inhibió totalmente la formación de brotes de tomate de árbol a partir de hipocotilos, ya que en un medio sin auxinas se observó un promedio de 0,9 brotes por frasco.

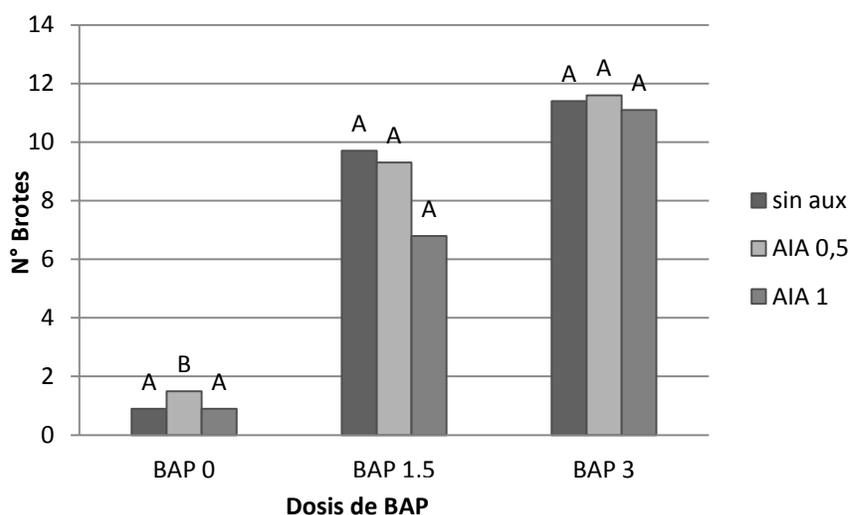
Cuando el medio de cultivo se suplementó con  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA, se incrementó la formación de brotes (1,5 brotes) con diferencias estadísticas respecto al testigo ( $0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA) y con respecto a la incorporación de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA, los cuales presentaron un promedio de 0,9 brotes (Figura 1).

Cuando no se aplicaron las auxinas ANA y 2,4-D, la incorporación de BAP ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), indujo los mayores incrementos en la formación de brotes a partir de hipocotilos de tomate de árbol, ya que cuando éstas se aplicaron inhibieron completamente la brotación.

La combinación en el medio de cultivo de BAP con AIA, no resultó efectiva para incrementar la brotación; con BAP ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), la formación de brotes se redujo de 9,7 brotes sin AIA, a 9,3 brotes con  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA y a 6,8 brotes con  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA, sin diferencias estadísticas (Figura 1). El incremento en las dosis de BAP a  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , permitió una mayor brotación con 11,4 brotes, que se mantuvo al adicionar AIA ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con 11,6 brotes y 11,1 brotes con la dosis de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , sin diferencias estadísticas entre ellos (Figura 1). Los brotes obtenidos a partir de hipocotilos de tomate de árbol en un medio MS con BAP y BAP + AIA estuvieron listos para su enraizamiento entre los 45 y 60 días después de la siembra (Figura 2).

Resultados similares fueron reportados por Obando y Jordán (2001) quienes evaluaron el potencial de regeneración *in vitro* de hipocotilos de tomate de árbol encontrando que los explantes en presencia de TDZ (Thidiazuron), solo o combinado con AIA, inducían inicialmente callos y posteriormente brotes, los cuales se formaron 4-5 semanas después de

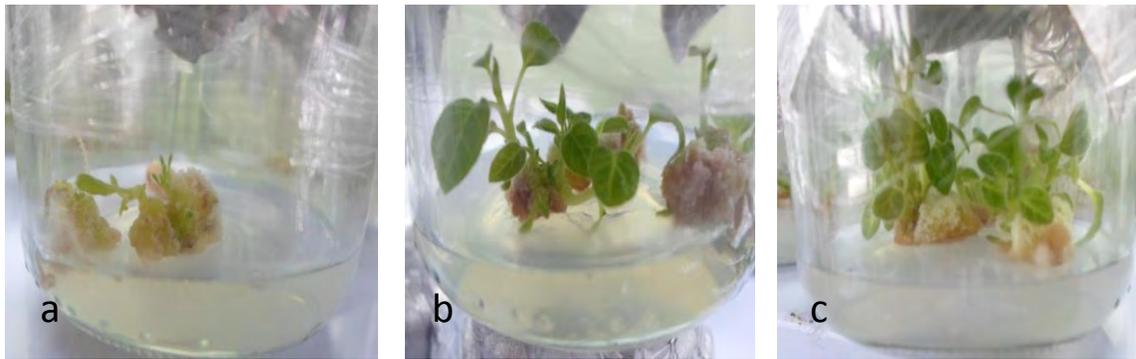
iniciado el cultivo. La mayor tasa de inducción de brotes los obtuvieron utilizando TDZ solo (93,3%). De igual manera Kurshid *et al.* (2008) indujeron la brotación de embriones somáticos de *Solanum melongena* L., en MS suplementado con 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de BAP obteniendo un promedio de 46 brotes. Se considera que en los cultivos *in vitro*, la inducción de organogénesis por efecto de citoquininas, está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción de citoquinina alta con respecto a la auxina (Espinosa *et al.*, 2005).



(Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes).

**Figura 1.** Promedio de brotes de tomate de árbol obtenidos con la combinación de BAP (0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) con dosis de AIA (0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 1,0 mg.L<sup>-1</sup>).

**Porcentaje de enraizamiento (PE).** En general, la formación de raíces fue estimulada por la incorporación de AIA e inhibida por 2,4D y ANA en dosis altas, presentándose en estos dos últimos casos callogénesis. Los contenidos óptimos de auxinas en el medio de cultivo inducen el crecimiento de raíces (Mantell *et al.*, 1993; Barba, 1991); Litz y Jarret (1993) indicaron que la adición de auxinas al medio de cultivo promueve la formación de callo, pero en la etapa de enraizamiento es un factor indeseable, ya que por ser un tejido de consistencia mucilaginoso, dificulta la manipulación de las plántulas en el momento del trasplante.



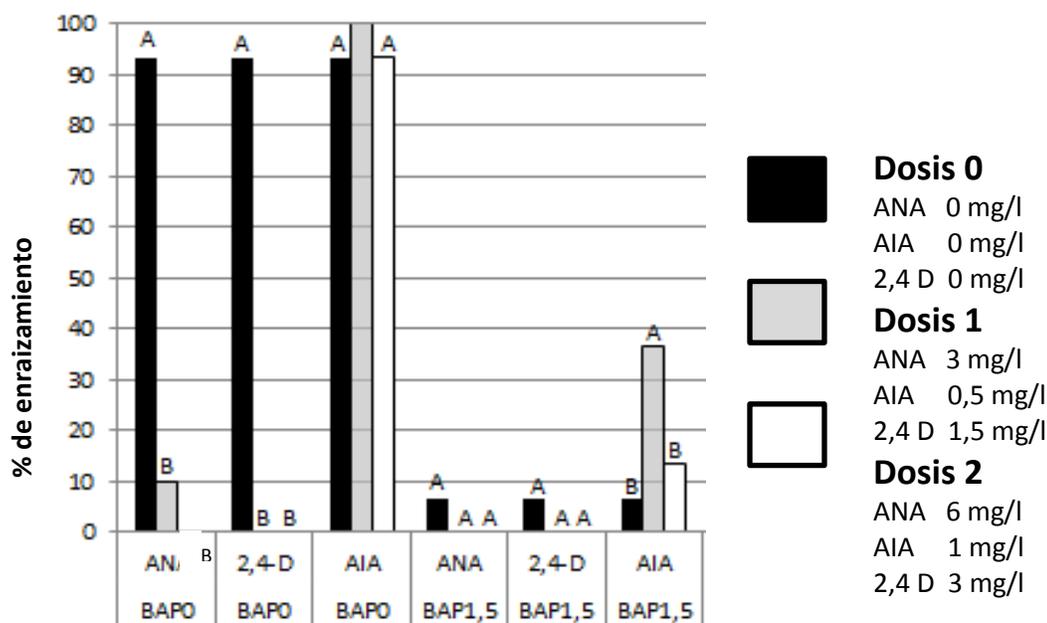
**Figura 2.** Brotes formados a partir de hipocotilos obtenidos con MS + BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>+ AIA 1 mg.L<sup>-1</sup>. **a)** 30 días. **b)** 45 días. **c)** 60 días.

La prueba de comparación de medias para BAP\*auxinas\*dosis de auxina mostró que sin BAP (Figura 3) la aplicación de AIA tuvo una respuesta similar en el porcentaje de enraizamiento de 93,100 y 93,3%, en su orden. Con la aplicación 2,4-D y ANA se redujo significativamente el enraizamiento observado con el testigo sin aplicación de hormonas, cuyo porcentaje fue 93%.

Cuando se aplicó BAP (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) (Figura 3), la inclusión de 2,4-D y ANA inhibió totalmente la formación de raíces, en comparación con BAP solo, que mostró un promedio de enraizamiento del 6,6%. Por el contrario, la aplicación de AIA (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) mostró el mejor comportamiento de la variable porcentaje de enraizamiento con un promedio de 36,6 % con diferencias estadísticas cuando se comparó con AIA (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) y con el testigo cuyos promedios fueron de 6,6 y 13,3% respectivamente.

Con 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, el proceso de enraizamiento se impidió. Al respecto, Kaparakis y Alderson (2002) en un trabajo de embriogénesis somática en tomate (*Lycopersicon sculentum*) encontraron que dosis altas de BAP no permiten la formación de raíces y produjeron tejidos aéreos con limitado crecimiento; según Lee (1974) parte de los efectos biológicos producidos por las citoquininas como el BAP, puede deberse a que inhiben la actividad, distribución y composición del AIA. Así mismo, Humphries (1960) afirma que altas concentraciones de citoquininas (0-10 mg.L<sup>-1</sup>) inhiben la formación de raíces y el efecto promotor de otros fitorreguladores (Ben-Jaacov *et al.*, 1991). Por esta razón, estos

reguladores se omiten en el cultivo de tejidos cuando se requiere el enraizamiento de brotes, o se requiere de varios subcultivos en medio libre de citoquininas antes de iniciar el enraizamiento.



#### Diferentes dosis de BAP + diferentes dosis de auxina

(Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes).

**Figura 3.** Porcentajes de enraizamiento de explantes de hipocotilos de tomate de árbol, obtenidos en medio MS con BAP combinado con dosis de 2,4-D, AIA, y ANA.

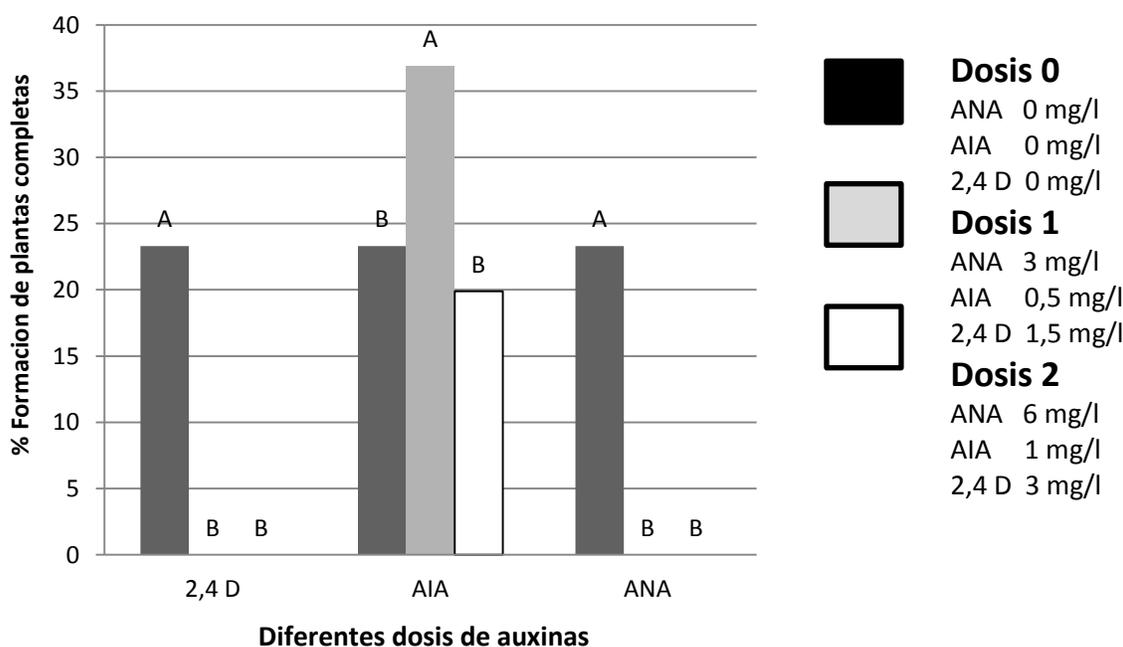
**Porcentaje de formación de plantas completas (FPC).** La formación de plántulas completas se presentó en el testigo sin reguladores y con la utilización de AIA en el medio MS. En la micropropagación de plantas, el efecto principal de las auxinas es la formación de raíces y crecimiento de callos (Gonzales, 2003), procesos que se presentan de acuerdo al tipo y concentración del fitorregulador que se utilice (Smith, 2000).

La prueba de comparación de medias indicó que sin BAP la aplicación de AIA (0,5 mg.L<sup>-1</sup>), indujo el mayor promedio de plántulas completas (36,9%) en comparación a la no aplicación o a la aplicación de AIA (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), cuyos promedios fueron 23,3 y 19,97%,

correspondientemente (Figura 4). Ningún tratamiento con inclusión de BAP condujo a la formación de plantas completas.

Por su parte Chacón *et al.*, (2013) al evaluar diferentes medios de cultivo para tomate de árbol, encontraron que la mejor respuesta en la obtención de raíz y tallo *in vitro* se obtuvo en los medios de cultivo MS suplementados con 6,0 g.L<sup>-1</sup> de agar y 3% de sacarosa y con 8,0 g.L<sup>-1</sup> de agar y 3% de sacarosa, los cuales mostraron los periodos de enraizamiento más cortos, el mayor número promedio de raíces y la mayor longitud promedio de raíz y tallo.

La prueba de comparación de medias mostro que cuando se aplicó 2,4 D (1,5 mg.L<sup>-1</sup> y 3, mg.L<sup>-1</sup>) y ANA (3,0 mg.L<sup>-1</sup> y 6,0 mg.L<sup>-1</sup>) no se presentó formación de plántulas, con diferencias estadísticas significativas al compararse con el testigo sin fitorreguladores el cual presento un promedio de 23,3%. Cuando se aplicó BAP (1,5 mg.L<sup>-1</sup> y 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) más las auxinas en cualquiera de sus dosis, no se obtuvo la formación de plántulas completas.



(Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes).

**Figura 4.** Porcentajes de formación de plantas completas obtenidas con las auxinas ANA, 2,4-D y AIA en diferentes dosis, sin aplicación BAP.

**Porcentaje de enraizamiento de brotes.** En la Tabla 3, se muestra el Análisis de Varianza (ANDEVA) para la variable porcentaje de brotes enraizados en medio MS + sacarosa al 3%, agar 7,0 g.L<sup>-1</sup> y AG<sub>3</sub> 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. En esta variable se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas. Teniendo en cuenta que el objetivo de mejorar la eficiencia en la multiplicación de plantas pasa por inducir un alto número de brotes para posteriormente enraizarlos, se procedió a promover la formación de plantas completas a partir de los brotes obtenidos en los tratamientos anteriormente evaluados.

**Tabla 3.** ANDEVA para la variable porcentaje de enraizamiento de brotes obtenidos a partir de hipocotilos de tomate de árbol (*C. betacea*).

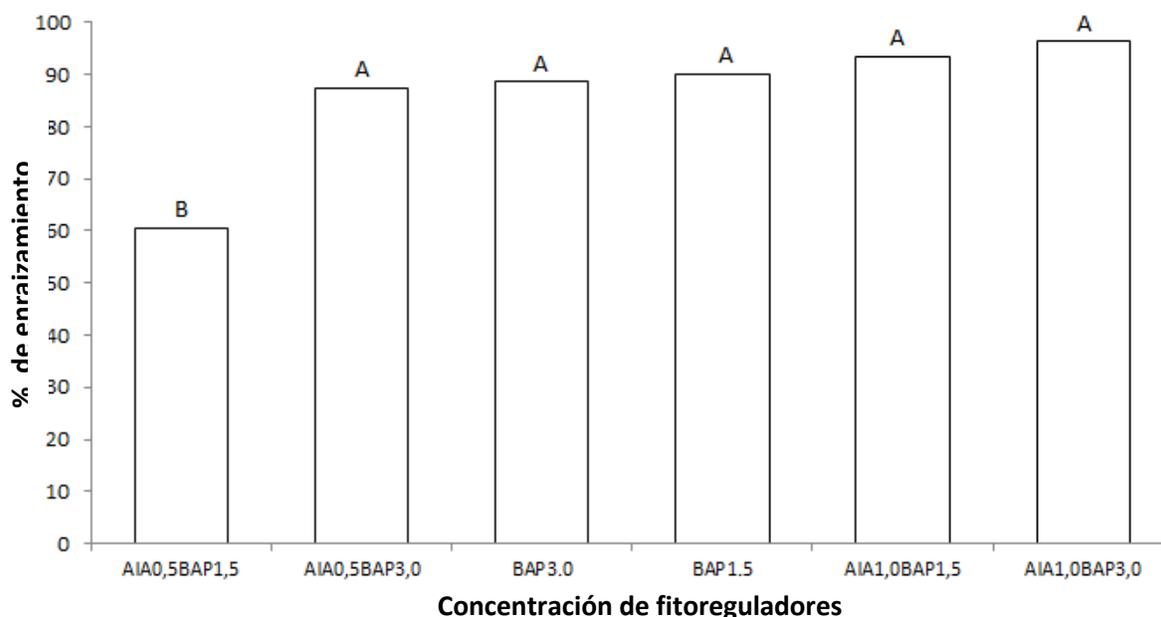
FV	GL	CM
TRATAMIENTO	9	788,7**
ERROR	75	19,23

\*\*= nivel de significancia al 99% de confiabilidad.

En la Figura 5 se presenta el porcentaje de enraizamiento de los brotes provenientes de explantes de hipocotilos sembrados con diferentes combinaciones hormonales; los mayores valores se obtuvieron con brotes obtenidos en el medio MS con la inclusión de AIA 1 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>, con un porcentaje de 96,23%. Cuando los brotes provenían de los tratamientos AIA 0,5 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>, BAP 3 mg.L<sup>-1</sup>, BAP 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, AIA 1,0 mg.L<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, los porcentajes de enraizamientos oscilaron entre 87,2 y 93,3% sin diferencias estadísticas entre ellos.

Los menores porcentajes de enraizamientos de brotes se observaron en aquellos provenientes de la combinación de AIA (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) y BAP (1,5 mg.L<sup>-1</sup>), con diferencias estadísticas respecto a los demás tratamientos (Figura 5); En este sentido Bhaskaran y Smith (1990) afirman que la alta concentración de auxinas favorece la aparición de raíces en los explantes y el posterior enraizamiento de los brotes en medio sin regulador de crecimiento, de la misma manera cabe destacar que existen interacciones de síntesis y degradación de AG<sub>3</sub> con otras hormonas, como el AIA. Se ha determinado que la presencia

de AIA estimula la síntesis de GA<sub>1</sub> provocando consiguiente crecimiento (Thomas *et al.*, 1999).



(Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes).

**Figura 5.** Porcentaje de enraizamiento de brotes obtenidos a partir de hipocotilos de tomate de árbol con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

**Fase de aclimatación.** Se obtuvieron plantas completas, regeneradas a partir de hipocotilos con un 96,6 % de supervivencia. La aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso, en la que se produce la mayor pérdida de plantas; es importante comenzar reduciendo gradualmente la humedad relativa para permitir un endurecimiento de la cutícula y disminuir la pérdida de agua; por otra parte, para tener mejores resultados en el establecimiento *in vivo* es necesario el desarrollo radicular *in vitro* (Pierik, 1990).

Resultados similares obtuvieron Medina *et al.* (2008) con brotes adventicios provenientes de segmentos de hoja de *S. sessiliflorun* Dunal, utilizando medio de cultivo MS suplementado con Kinetina (0,25 a 2 mg.L<sup>-1</sup> y 0,01 a 1 mg.L<sup>-1</sup>AIA). Los brotes obtenidos fueron inducidos para formar raíz por trasferecia a un medio con BA y ANA (0,5 mg.L<sup>-1</sup>y

1 mg.L<sup>-1</sup>) respectivamente. Las plantas enraizadas fueron exitosamente trasferidas al campo. Al respecto, Contreras y Almeida (2003) afirman que el manejo *ex vitro* del tomate de árbol es de relativa facilidad, por que tanto el periodo de endurecimiento como el desarrollo de las plantas en condiciones de invernadero ocurre en corto tiempo.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo más eficiente para la proliferación de brotes de tomate de árbol (*C. betacea*) a partir de hipocotilos fue el medio básico MS suplementado con BAP ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) solo o con AIA ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y AIA ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

El fitorregulador AIA fue el más efectivo para la inducción de enraizamiento en explantes de hipocotilos de tomate de árbol sembrados en MS; por el contrario, la inclusión de BAP en el medio, inhibió el enraizamiento de los explantes.

Los brotes generados *in vitro* a partir de los tratamientos con BAP y con la combinación de BAP + AIA ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) mostraron altos porcentajes de enraizamiento en un medio MS con AG<sub>3</sub> ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Las plantas de tomate de árbol regeneradas *in vitro* obtenidas a partir de hipocotilos, presentaron altos porcentajes de supervivencia, obteniéndose plantas vigorosas en invernadero.

## BIBLIOGRAFÍA

AGRONET. 2013. Red De Información y Comunicación Del Sector Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. En: Evaluaciones Agropecuarias, [http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte25\\_2011.aspx?cod=25](http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte25_2011.aspx?cod=25;).;Consulta: Junio de 2015.

Apraez, J.; Romo, J y Lagos, T. 2012. Regeneracion de Plantas de Tomate De Árbol (*Cyphomandra betacea*. Cav Sendt.) Mediante organogénesis inducida a partir de callos. Revista de Ciencias Agrícolas. 29 (2): 108-115

Barba, A. 1991. Reguladores del crecimiento vegetal, pp. 48 - 66. En: Trillas. Cultivo de Tejidos Vegetales. Primera edición. México.

Ben-Jacob, J., Ackerman, A., Tal, E y Jacobs, G. 1991. Vegetative propagation of *Albertya magna* by tissue culture and grafting. Hort Science, 26:74.

Bonnet, J. y Cárdenas, J. (2012). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). En: Produmedios (Eds.), Manual para el cultivo de frutas en el trópico. Bogotá, Colombia: Gerhard Fischer. 600 - 626 pp.

Calva, G. y Pérez, J. 2005. Cultivo de Células y Tejidos Vegetales. Revista. Digital Universitaria. 6 (11):1-16.

CIAT. Centro Internacional De Agricultura Tropical. 2003. Field performance and fruit quality of in vitro propagated plants of *solanum betaceum* Cav. Sendt and their use as elite clone materials by farmers. 300-305 p.

Coenen, C. y Lomax, T. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends Plant Science 2 (1): 351-356.

Contreras, I. y Almeida, J. 2003. Micropropagación del Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.), Solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forest.* 47 (2): 9-13

Chacón, R.; Mora, D.; Marchena, L.; Schmidt, A. y Ulloa, C. 2013. Cultivo in vitro del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. *Revista VI Encuentro de Investigación.* 6 (4): 45-55.

Espinoza, J.; Trillos, O.; Afanador, L. y Correa, G. 2005 Potencial de propagación in vitro de tomate de árbol partenocarpico (*Cyphomandra betacea* cav). *Revista De Agronomía.* 58(2): 2685- 2695.

Ferl, R. y Paul, A. 2000. Genomeorganization and expression. pp. 312-357. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* USA: American Society of Plant Physiologists.

Giraldo, A. y Martinez, D. 1998. Establecimiento de estructuras callosas y suspensiones celulares de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). p. 49-51 *En: Seminario de Frutales De Clima Frío Moderado.* Centro De Desarrollo Tecnológico De Frutales. Manizales, Colombia.

Gonzales, S. 2003. Medios de cultivo. En: Departamento de biología vegetal, facultad de biología, universidad de la Habana, <http://www.fbio.uh.cu/webfb//docencia//tema5//doc> Consulta: Junio 2015.

Guimarães, M.; Tomé, M. y Cruz, G. 1996. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 35 (4): 120-137.

Howell, S.; Lall, S. y Che, P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science.* 8: 453- 459.

Humphries, E. 1960. Kinetin inhibited root formation on leaf petioles of detached leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant*, 13:659-663.

Kaparakis, G. y Alderson, P. 2002. Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77: 186-190.

Kothari, S., Joshi, A.; Kachhwaha, S. y Ochoa, N. 2010. Chilli peppers. A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances.* 28:35-48

Kurshid, A.; Singh, A.; Jaadep, S. y Satbir, S. 2008. Genotype, explant and culture medium effects on somatic embryogenesis in eggplant (*solanum melogena* L). *Genetic and Biotechnology.* 49 (3) 182-187

Lee, T. 1974. Cytokinin control in subcellular localization of indoleacetic acid oxidase and peroxidase. *Phytochemistry*, 13:2445-2453.

Litz, R. y Jarret, R. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos, embriogénesis somática y organogénesis. P.143-172. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Cali, Colombia.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497

Mantell, S.; Mague, H. y Chandler, F. 1993. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. p. 481 – 494 En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Cali, Colombia.

Media, M; Sepulveda, N. y Murillo, M. 2008. Regeneración in vitro de plantas a partir de explantes foliares del lulo chocoano, *Solanum sessiliflorum* Dunal vía organogénesis. Revista Institucional Universidad Tecnológica del Choco 27 (1): 92-95.

Obando, M. y Jordan, M. 2001. Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo) cultivated in vitro. Acta Horticulture. 560: 429 - 432.

Pierik, R. 1990. In vitro. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher.

ProColombia, Frutas Exóticas, principales oportunidades. <http://www.procolombia.co/node/1256> consulta: Noviembre de 2015.

Pringle, G. y Murray, B. 1991 Interspecific Hybridization Involving The Tamarillo, *Cyphomandra betacea* (cav) sendt. (Solanacea). New Zeland Journal of Crop and Horticultura Science. 19: 103-111

Raven, P., Evert, R. y Eichhorn, S. 1992. Biology of plant, fourth edition, Worth publishers, New York, 751 p.

Rout, G. y Mohapatra, S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances. 24:531-560.

Smith, R. 2000. Plant tissue culture. Second edition, Department of soil and Crop Science, Texas. 455 p.

Thomas, S., Phillips, A. y Hedden, P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellins 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 4698-4703.