

**REGENERACION DE PLANTAS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea*
Cav. Sendt.) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS INDUCIDA A PARTIR DE CALLOS**

**JOSE JULIÁN APRAEZ MUÑOZ
JANIO FABIÁN ROMO DELGADO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
PASTO – COLOMBIA
2012**

**REGENERACION DE PLANTAS EN TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea*
Cav. Sendt.) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS INDUCIDA A PARTIR DE CALLOS**

**JOSE JULIÁN APRAEZ MUÑOZ
JANIO FABIÁN ROMO DELGADO**

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

**Presidente de tesis:
Tulio César Lagos Burbano I.A., M.Sc., Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
PASTO-COLOMBIA
2012**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1^o del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Firma del Presidente de tesis

Firma del jurado

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2012

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
CONCLUSIONES.....	18
AGRADECIMIENTOS.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19

REGENERACION DE PLANTAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt.) MEDIANTE ORGANOGÉNESIS INDUCIDA A PARTIR DE CALLOS

**REGENERATION OF TREE TOMATO PLANTS (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt.)
INDUCED BY ORGANOGENESIS FROM CALLUS**

José Julián Apraez Muñoz¹, Janio Fabián Romo Delgado², Tulio Cesar Lagos Burbano³

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener plantas de tomate de árbol (*C. betacea*) bajo condiciones *in-vitro*, mediante la organogénesis inducida en callos. Se Evaluaron los medios MS (testigo), MS+2,4-D5 μ M, MS+2,4-D10 μ M y MS+2,4-D15 μ M, para los tratamientos dos tres y cuatro se agrego 13 μ M de cinetina. Se utilizo un diseño de Bloques Completos al Azar con cuatro repeticiones, para un total de 16 unidades experimentales. Cada unidad experimental está compuesta por diez frascos con capacidad de 120 ml cada uno. En cada frasco se agregaron 20 ml de medio de cultivo, sembrándose tres callos de aproximadamente 5 mm de diámetro, teniendo 120 callos por unidad experimental. El mayor porcentaje de plantas regeneradas (14,66 %) se obtuvo con MS+2,4-D5 μ M y el menor porcentaje de plantas regeneradas (2,91%) se obtuvo con MS+2,4-D15 μ M. La mayor cantidad de raíces, tallos, hojas y plantas formadas fue con MS+2,4-D5 μ M, con valores 0,52, 0,14, 0,15 y 0,05 respectivamente y el menor valor se obtuvo con MS+2,4-D15 μ M con valores 0,09, 0,04, 0,008 y 0 respectivamente.

Palabras clave: in-vitro, hormonas, medio de cultivo, morfogénesis, Murashige y Skook.

¹ Estudiantes de Ingeniería Agronómica. Universidad de Nariño. E-mail: julianrap@hotmail.com.

² Estudiantes de Ingeniería Agronómica. Universidad de Nariño. E-mail: nioro10@hotmail.com.

³ I. A. M.Sc. PhD. Decano Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. E-mail:tclagos@udenar.co

ABSTRACT

This work was carried out with the objective to obtain tree tomato plants (*C. betacea*) under conditions *in-vitro*, through organogenesis in callus induced. MS (control), MS+2,4-D5 μ M, MS+2,4-D10 μ M, MS+2,4-D15 μ M, medias were evaluated. For the second third and fourth treatment was added 13 μ M of kinetin. Design was used randomized complete block with four replications, for a total of 160 experimental units. Each experimental unit consists of ten bottles of 120 ml everyone. In each jar were added 20 ml of culture medium, sowing three calluses of approximately 5 mm in diameter, taking 120 calluses per experimental unit. The highest percentage of regenerated plants (14.66%) was obtained with MS+2,4-D5 μ M, and the lowest percentage of regenerated plants (2.91%) was obtained with MS+2,4-D15 μ M. Most roots, stems, leaves and plants with was formed with MS+2,4-D5 μ M with values 0.52, 0.14, 0.15 and 0.05 respectively and the lowest value was obtained with MS+2,4-D15 μ M with values 0.09, 0.04, 0.008 and 0 respectively.

Keywords: *in-vitro*, hormones, growth medium, morphogenesis, Murashige and Skook.

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*C. betacea*) ha comenzado a tomar gran importancia económica en nuestro país debido al alto consumo en las diferentes presentaciones y al contenido de vitaminas y demás compuestos que ayudan a prevenir enfermedades. Este cultivo genera 642 jornales/ha, lo que significa que una hectárea requiere de 0,89 personas trabajando 261 días al año; es decir, se necesita cultivar 1,23 ha para generar un empleo permanente por año (Agrocadenas, 2008). Además, su incorporación en sistemas de cultivo para la exportación, hace necesario que se desarrollen tecnologías que permitan obtener plantas de buena calidad sanitaria para los agricultores. En Nariño, los trabajos de propagación *in-vitro* de tomate de árbol son escasos. La propagación *in-vitro* es vital para la producción masiva de genotipos superiores, que se generen en programas de mejoramiento genético de la especie.

En el caso de frutales leñosos, el período de fitomejoramiento es substancialmente mayor respecto a cultivos anuales, lo que dificulta el desarrollo de nuevas variedades. Esta limitante de tiempo puede ser superada complementando el fitomejoramiento convencional con la micropropagación masiva de cultivares elite libres de patógenos, a través de la técnica de cultivos de tejidos *in-vitro* (Lasso, 2007).

Hoyos (1996) logró obtener callos friables de tomate de árbol a partir de explantes de hojas cultivadas *in-vitro* en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,1 mg/l de 2,4-D (Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético) y 0,05 mg/l de BAP (6 Benzilaminopurina), con el fin de producir suspensiones embriogénicas necesarias para la generación de material resistente a la acción de las toxinas producidas por el hongo *Colletotrichum acutatum* Penz, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.

Brotes de tomate de árbol subcultivados en presencia de 1,07 μ M ANA (Ácido Naftalenacético), 0,88 μ M BA y 0,58 μ M GA3 (Ácido Giberélico) iniciaron la formación de raíces, luego de 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%. Estas produjeron 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).

También pueden usarse las técnicas de micropropagación con ventajas sobre los métodos convencionales. Entre estas técnicas, la embriogénesis somática se puede utilizar en la producción de plantas en gran escala (Chaparro, 2005), regeneración de plantas transgénicas a partir células competentes (Dandekar, 1995) y la posibilidad de producción de la semilla artificial (Deverno, 1995).

En la actualidad, el establecimiento y estandarización de protocolos *in-vitro* con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de

micropropagación masiva y para facilitar la tecnología de transformación genética. En varias especies frutales y forestales se han hecho estudios para obtener plantas *in-vitro* por medio de organogénesis indirecta (Dalzoto y Docampo *et al.*, 1997).

Los cultivos *in-vitro* han mostrado las siguientes ventajas en comparación con la propagación vegetativa convencional:

- A. importante ahorro de tiempo.
- B. Mejores características de crecimiento de las plantas propagadas *in-vitro*.
- C. Posibilidad de mayor previsión en la planificación de las siembras. La micropropagación permite reducir un número predecible de plantas en cualquier momento y aplicar por ello sistemas industriales de planificación, ya que la producción de las plantas se independiza de las condiciones climáticas (Guimarães *et al.*, 1996).

Con base en lo anterior, este trabajo busca contribuir al conocimiento de la propagación *in-vitro* en plantas de tomate de árbol. Evaluando diferentes medios de cultivo para la regeneración *in-vitro* de plantas a partir de callos.

MATERIALES Y METODOS

Localización. El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones de Tejidos vegetales de la Universidad de Nariño – UDENAR –, localizado en la Ciudad Universitaria Torobajo (Pasto) a una altitud de 2540 msnm, 01° 12'13" LN y 77° 15'23" LO, bajo una temperatura promedio de 20°C, una humedad relativa de 75% y un fotoperiodo de 16 horas luz.

Fase de laboratorio. Se sembraron callos provenientes de material de tomate de árbol (*C. betacea*) existente en el laboratorio de tejidos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, en recipientes de vidrio de 120 ml. los callos tenían un diámetro aproximado de 5 mm.

Medios de cultivo. Los callos sometidos a organogénesis formados a partir de cultivo de hipocotílos y yemas de tomate de árbol se evaluaron en los medios basados en modificaciones hormonales del medio básico MS + ANA (5 ml/l) + Cinetina (2 ml/L) + Sacarosa (30 g/l) + Agar (6 g/l) a un pH = 5,7. Los tratamientos estudiados para la organogénesis a partir de callos fueron: MS (Testigo), MS+5 μ M2,4-D, MS+10 μ M2,4-D, MS+15 μ M2,4-D, la concentración de cinetina (kinetina) en los tratamientos dos, tres y cuatro fue de 13 μ M. La variación de los tratamientos se presenta en concentraciones de 5, 10 y 15 μ M de 2,4-D.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar con cuatro repeticiones, para un total de 160 unidades experimentales. Cada unidad experimental está compuesta por diez frascos con capacidad de 120 ml. En cada frasco se agregaron 20 ml de medio de cultivo, sembrándose tres callos de aproximadamente 5 mm de diámetro, teniendo 30 callos por unidad experimental.

Variables a evaluar. Las variables a evaluar corresponden a: peso de callos en gramos (PC), volumen de callos en ml (VC), callos con morfogénesis en porcentaje (CM), plantas regeneradas en porcentaje (PR); número de órganos (NO), número de raíces (RAIZ), número de tallos (TALLOS), número de hojas (HOJAS), Plantas formadas por callo (PLANTAS).

Análisis estadístico. Las variables evaluadas se someterán al Análisis de Varianza bajo el modelo de Bloques Completos al Azar, una prueba de comparación de Tukey, En aquellas, donde se encuentren diferencias significativas entre tratamientos, se aplicará la prueba de comparación de medias DMS (Diferencia Mínima Significativa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa el efecto de los tratamientos MS, MS+5 μ M2,4-D, MS+10 μ M2,4-D y MS+15 μ M2,4-D sobre callos de *C. betacea* para el peso de los callos (PC), volumen de los callos (VC), numero de órganos (NO) y porcentaje de callos con morfogénesis (CM) de *C. betacea*.

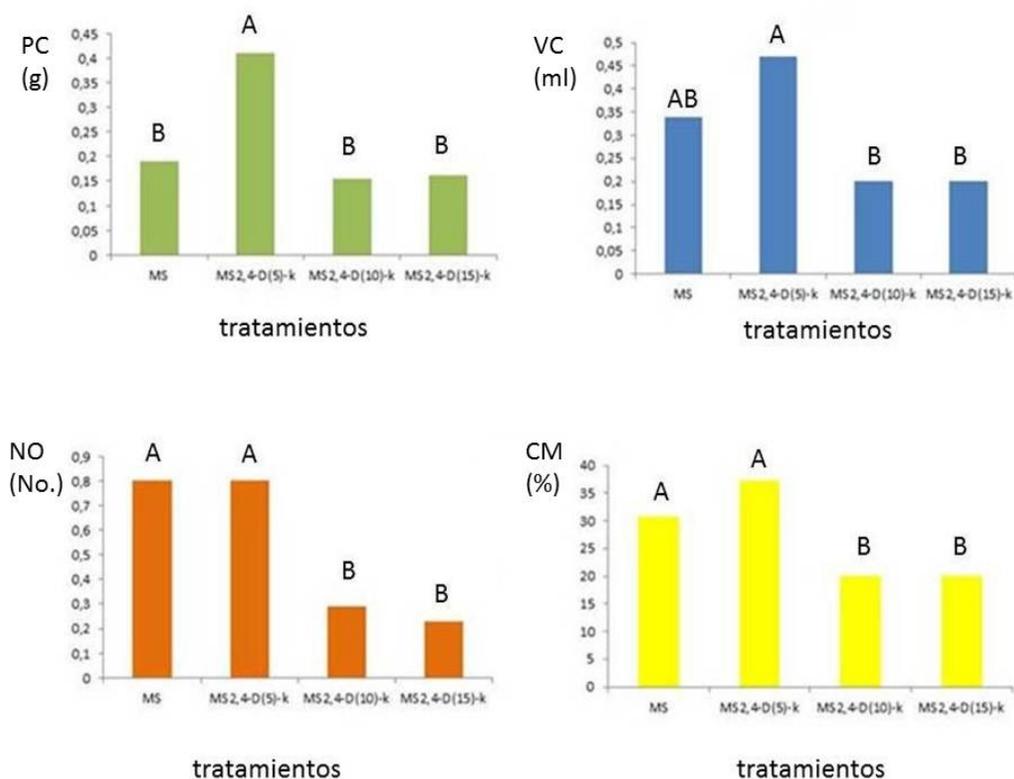


Figura 1. Resultado de las variables peso de los callos (PC), volumen de los callos (VC), numero de órganos (NO), porcentaje de callos con morfogénesis (CM), para los medios de cultivo.

Peso de callos (PC). Para el PC se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El mayor promedio se presentó con el tratamiento MS+5 μ M2,4-D (0,41g). Esto sugiere, que la concentración más baja de 2,4-D influyó en el incremento de PC. Dado que el tratamiento mencionado presentó diferencias significativas con el resto. Entre los demás tratamientos no se

encontraron diferencias significativas (Figura 1). Esto concuerda con los hallazgos de Bornman y Vogelmann (1984) quienes afirman que el aumento en la concentración de auxinas, puede dar lugar a descensos en la tasa de proliferación de brotes, lo cual se relaciona con una reducción en la absorción de cinetinas y de iones por cambios en el potencial de agua en el medio de cultivo haciendo que el desarrollo del callo sea mas lento. Por otro lado, los resultados corroboran lo señalado por Calderón y Rotella (1998), quienes determinaron que con una baja concentración de auxinas, o en ausencia de éstas, se consigue una mayor elongación.

Volumen de los callos (VC). En VC se presento diferencias significativas, entre el tratamiento MS+5 μ M2,4-D (0,46 ml) y los medios MS (0,34 ml), MS+10 μ M2,4-D (0,2 ml) y MS+15 μ M2,4-D (0,2 ml). Los últimos tres tratamientos no tienen diferencias estadísticas. Como en PC, los mayores valores se obtuvieron con la menor concentración de 2,4-D (Figura 1), lo cual es corroborado por Roca y Mroginski (1991) quienes en *Agave* sp. Encontraron que las diferencias entre los medios obedecieron a ligeros cambios en la concentración de 2,4-D, presentando mejores resultados los tratamientos con menor contenido de reguladores de crecimiento, para este caso auxinas.

Numero de órganos (NO). En NO, entre los tratamientos MS (0,8) y MS+5 μ M2,4-D (0,8), no se presentaron diferencias, al igual que entre MS+10 μ M2,4-D (0,29) y MS+15 μ M2,4-D (0,23). Pero las diferencias se observaron entre los dos primeros y los dos últimos (Figura 1). Como en los casos anteriores, los tratamientos con menores concentraciones de 2,4-D fueron los de mayor NO. Barceló *et al* (1995) afirman que al aplicar hormonas (auxina/cinetina) al medio de cultivo, debe existir un balance entre ambas; así, al aumentar la cantidad de cinetina respecto a la auxina, se induce la formación de brotes.

Callos con morfogénesis (CM). En CM se observaron diferencias significativas entre MS+5 μ M2,4-D (37%), MS (30,79%) y los tratamientos MS+10 μ M2,4-D (20,08%) y MS+15 μ M2,4-D (20%). Es de anotar que no existieron diferencias entre los dos primeros ni entre los dos últimos tratamientos (Figura 1). Al igual que para las anteriores variables, los medios con menor contenido de 2,4-D (MS+5 μ M2,4-D) mostraron mejor respuesta de morfogénesis. Esto

concuerta con el trabajo de George y Sherrington (1984) quienes determinaron que las cinetinas también influyen en la morfogénesis en el cultivo de tejidos. La conservación del crecimiento de callos indiferenciados es generalmente lograda con concentraciones aproximadamente similares de cinetina y auxina. Una alta relación molar de cinetina sobre auxina tiende a inducir desarrollo de estructuras, mientras que una alta relación de auxina sobre cinetina induce poco desarrollo, por lo tanto, su balance debe ser esencial para el desarrollo de los diferentes órganos.

Plantas regeneradas (PR). Acorde con la Figura 2, el porcentaje de PR fue diferencial entre los tratamientos, presentándose igual comportamiento que en las variables anteriores. Los mayores valores de PR se observaron en MS (15,75%) y MS+5 μ M2,4-D (14,66%), los cuales no mostraron diferencias entre sí. Igualmente, los medios MS+10 μ M2,4-D (5,08%) y MS+15 μ M2,4-D (2,91%), no se diferenciaron significativamente entre sí, pero si presentaron diferencias con los dos primeros tratamientos, lo que permite inferir que hay un efecto limitante de 2,4-D, dado que a medida que aumenta su contenido en el medio, los valores de PC, VC, NO, CM y PR son menores a medida que se aumenta su concentración, esto concuerda con lo manifestado por Powers y Backhaus (1989) quienes trabajaron con la regeneración de plantas a través de organogénesis y determinaron que el medio MS más 2,4-D en una dosis de 1,4 μ M fue el mejor para la generación de tejido calloso y la diferenciación de brotes. Con dosis de 4,4 a 5,4 μ M de 2,4-D, fueron limitantes para el crecimiento.

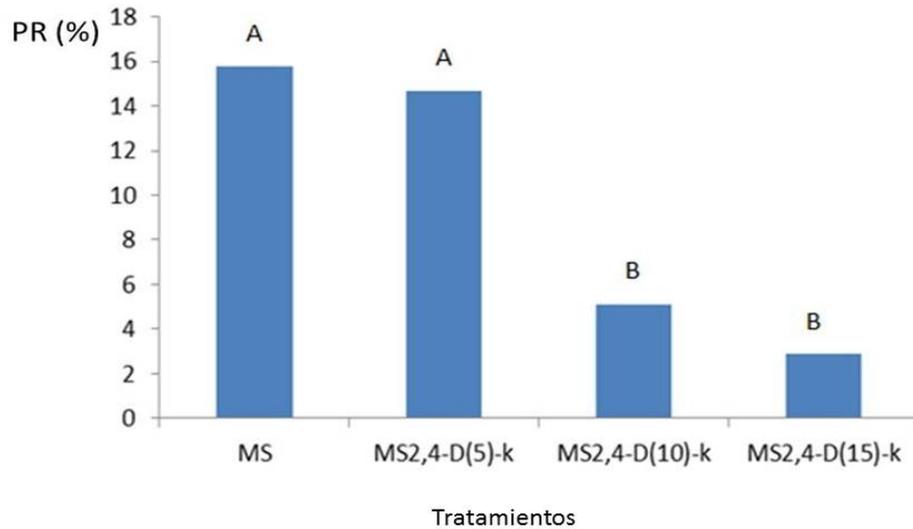


Figura 2. Efecto de los tratamientos MS, MS+5µM_{2,4-D}, MS+10µM_{2,4-D} y MS+15µM_{2,4-D} sobre callos de *C. betacea* en el porcentaje de regeneración de plantas (PR).

Regeneración de rices. Tallos, hojas y plantas. Los resultados de la Figura 3 revelan que en un 99,48% no ocurrió organogénesis. Los tratamientos MS y MS+5µM_{2,4-D} mostraron mayor generación de brotes que MS+10µM_{2,4-D} y MS+15µM_{2,4-D}. En comparación al trabajo de Hamidah *et al.* (1997) quienes lograron inducir gran número de estructuras con 0,1 mg/l de 2,4-D, se podría afirmar entonces que el comportamiento observado está relacionado con el tipo y la concentración de auxina utilizada ya que hubo menor crecimiento con altos contenidos de 2,4-D.

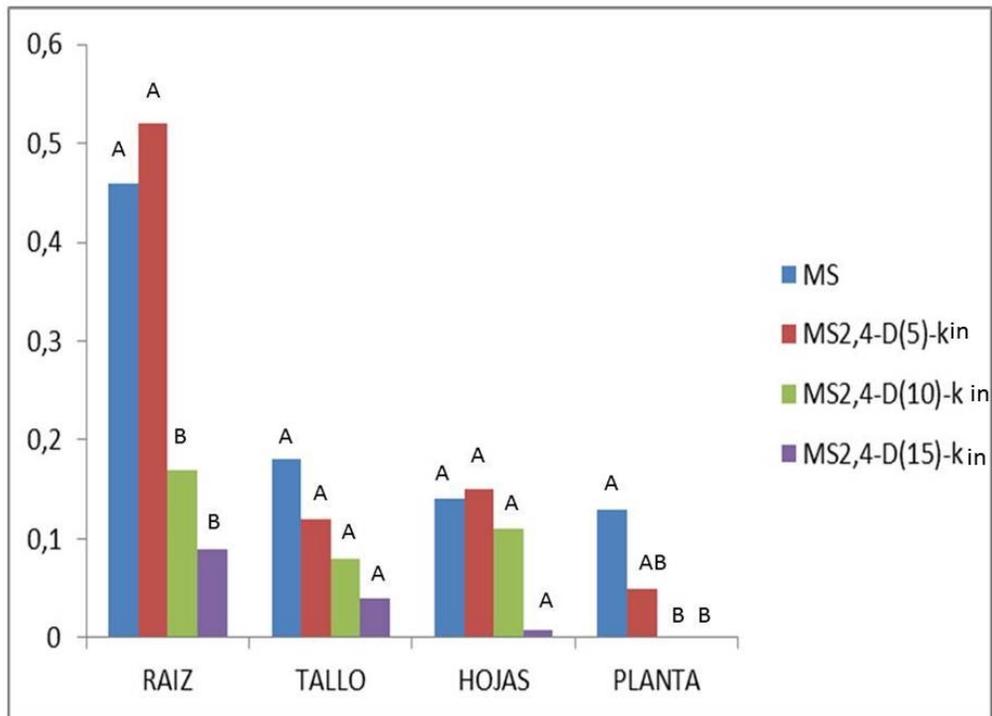


Figura 3. Organogénesis observada en *C. betacea* con los tratamientos MS, MS+5µM 2,4-D, MS+10µM y MS+15µM 2,4-D.

En raíces se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos MS+5µM 2,4-D (0,52), MS (0,46) y los medios MS+10µM 2,4-D (0,17) y MS+15µM 2,4-D (0,09) (Figura 3), lo que implica que el contenido de la hormona 2,4-D interviene de manera directa en la formación de estructuras radicales, siendo las dosis evaluadas limitantes para la formación de raíces, en este caso el diseño de tratamientos incluyó dosis extremadamente bajas. Según Margara (1988) en la rizogénesis *in-vitro* pueden presentarse dos situaciones diferentes; el explante inicial puede ser apto para la rizogénesis, o el explante puede ser inicialmente no apto para la rizogénesis. Un cierto número de factores actúan en interacción para desencadenar la rizogénesis: aportación de auxinas, de un azúcar, presencia de sales minerales, aportación eventual de ácido giberélico, luz y temperatura.

El tipo y concentración de auxina tiene un papel decisivo en la inducción radical, ya que el AIA en las dos concentraciones utilizadas en combinación con las sales de medio MS tanto a 50 como a 100%, redujo el crecimiento de raíces. (Lee Hilda, Cruz Juan, 2003).

Tanto en Tallos como en hojas no se presentaron diferencias significativas (Figura 3). El número de Tallos osciló entre 0,04 y 0,18 y el número de Hojas osciló entre los valores 0,008 y 0,15.

En este orden de ideas, Burch y McGaw (1993) señalan que el incremento endógeno en auxinas produce cambios en el desarrollo de la senescencia de las hojas o el incremento del crecimiento del brote.

En Plantas no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos MS y MS+5 μ M2,4-D. Los medios MS+10 μ M2,4-D y MS+15 μ M2,4-D, no formaron plantas (Figura 3). Es de anotar, que la proliferación de plantas, depende del balance de la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, puesto que el medio con menor concentración de 2,4-D presentó un mayor número de plantas. Resultados que no concuerdan con lo planteado por Muñoz (2003) quien señala que un aumento en la concentración hormonal origina la proliferación de una gran cantidad de brotes. Según Vieitez y Vieitez (1982), a concentraciones de 1 ó 2 mg/l de 2,4-D se obtiene el máximo número de brotes en material juvenil, por lo que concluyeron que la concentración óptima para la proliferación de órganos se encuentra entre 0,1-0,5 mg/l y que la multiplicación de brotes en medio de cultivo carente de 2,4-D es prácticamente nula.

En la figura 4 se observa diferentes tipos de organogénesis obtenidos con los diferentes tratamientos en el cultivo de callos de *C. betacea*.

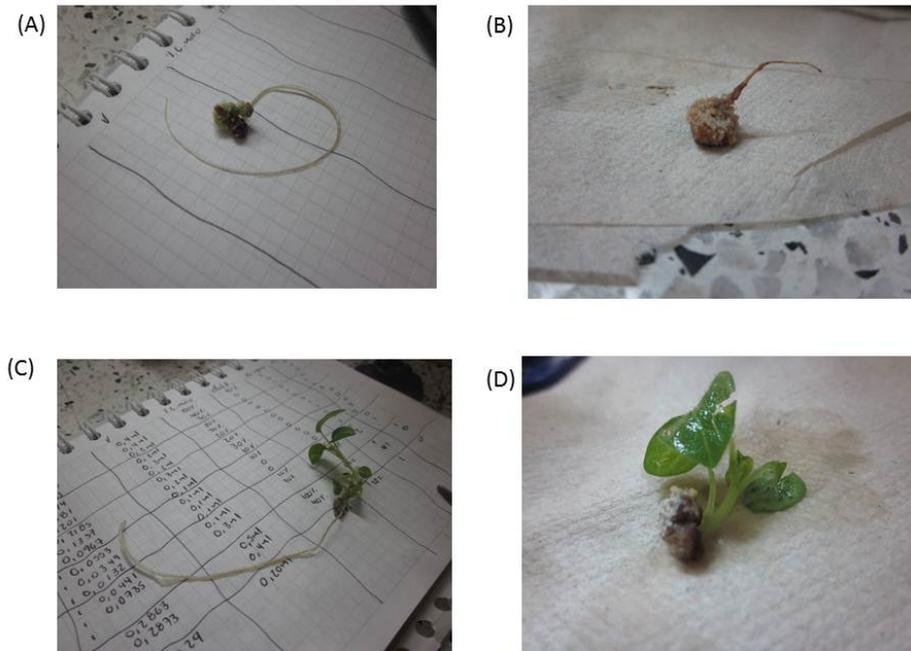


Figura 4. Estructuras obtenidas con los diferentes medios de cultivo en *C. betacea*, raíces (A), tallos (B), plantas (C), hojas (D).

Estos resultados permiten plantear que el alto contenido hormonal puede ocasionar que los callos no se desarrollen y se fenolicen dando lugar a que no haya proliferación ni crecimiento de los mismos, como lo reporta el trabajo de Gutiérrez-Miceli *et al.* (2002) según los cuales, para inducir la rediferenciación de los callos, éstos se deben cultivar en medio MS, sin 2, 4-D. Bajo estas condiciones, los brotes desarrollaron raíces y plántulas.

Se pudo comprobar que en todos los medios de cultivo utilizados no se obtuvo una buena diferenciación celular, concluyéndose que la combinación de hormonas utilizadas no fue la adecuada, lo que condujo a que los tejidos utilizados entren en un proceso de inactividad, como lo reporta Arredondo (2000) al señalar que para obtener desarrollo de callos, es necesario que el medio de cultivo sea suplementado con una menor concentración de cinetinas, ya que con esto se

logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas, que en este caso fue demasiado bajo. Esto confirma lo descrito por Kyte y Kleyn (1996), en cuanto a que una mayor concentración de cinetinas induce la formación de brotes más pequeños.

Onamu *et al* (2003) quienes sostienen que los reguladores de crecimiento pueden inducir procesos de morfogénesis en el tejido, también pueden ocasionar una respuesta inhibitoria de dicho proceso, además de influenciar las características físicas de los brotes obtenidos, hecho que se evidenció en este trabajo, en la respuesta inhibitoria presentada en los tratamientos hormonales, donde a pesar de reportar una alta producción de brotes organogénicos, estos presentaban anomalías morfológicas como albinismo y arosetamiento.

CONCLUSIONES

Las concentraciones hormonales de 5, 10 y 15 μM de 2,4-D y 13 μM kin (cinetina) fueron inadecuadas para lograr la morfogénesis a partir de callos de *C. betacea*. La mejor proliferación de brotes, volumen de callos, peso de callos y porcentaje de callos con morfogénesis se obtuvo con la menor concentración de 2,4-D y un nivel de 13 μM de kinetina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo expresan su agradecimiento a Dios, al grupo de Investigación de Frutales Andinos de la Universidad de Nariño por su colaboración en la realización de este proyecto, igualmente a todos los docentes de la facultad de Ciencias Agrícolas por su colaboración y en especial al decano de la facultad de Ciencias Agrícolas el Doctor Tulio Cesar Lagos el cual fue clave en esta investigación.

BIBLIOGRAFIA

- AGROCADENAS. 2008. Análisis - Estadísticas. [En línea]. 2008. [citado 1 mar., de 2011]. Disponible en Internet: <[http:// www.Agronet.gov.co /Agronetweb/ AnalisisEstadisticas/ tabid/73/Default.aspx](http://www.Agronet.gov.co/Agronetweb/AnalisisEstadisticas/tabid/73/Default.aspx)>.
- ARREDONDO, A. Establecimiento de cadenas proliferativas y enraizamiento *in-vitro* de *Juglans regia* L. a partir de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 2000. 55 p.
- BARCELO, J., G. NICOLAS, B. SABATER, R. SANCHEZ. Fisiología Vegetal. 6ª ed. Madrid: Ediciones Pirámide S.A. 1995. 662 p.
- BORNMAN C H, T C VOGELMANN (1984) Effect of rigidity of gel médium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in-vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61:505-512.
- BURCH, L., B. MCGAW. Fisiología y Bioquímica Vegetal. In: AZCON-BIETO, J., M. TALON. Madrid, España: McGraw-Hill., 1993, p. 319-325.
- CALDERON-BALTIERRA X., A. ROTELLA. Establecimiento *in-vitro* de *Beilschmiedia berteroana* (Gay) Kostermans (Lauraceae). *Información Tecnológica*, 1998, Vol. 9, N° 5, p. 269-275.
- CALDERON-BALTIERRA X., A. ROTELLA. Establecimiento *in-vitro* de *Beilschmiedia berteroana* (Gay) Kostermans (Lauraceae). *Información Tecnológica*, 1993, Vol. 9, N° 5, p. 269-275.
- CHAPARRO C., P.V. 2005. Some effects of abscisic acid on the development of embryos from caraway cells in suspension culture. *Amer. J. Bot.* 60 (supl):22-23.

- DAL ZOTTO, A. y DOCAMPO, D. 1997. Micropropagación de los portainjertos de ciruelo Mariana 2624 (*Prunus cerasifera* x *Prunus musionana*) y Pixy (*Prunus insistia* L.) de sanidad controlada. *Phyton*. (60):127-135.
- DANDEKAR, L.L., 1995. Genetic transformation of angiosperms. In: S.M. Jain *et al.* (Eds.). *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol. 1, pp. 193-226. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- DEVERNO, L.L., 1995. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis. In: S.M. Jain *et al.* (Eds.). *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol. 1, pp. 361-377. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- GEORGE, E and SHERRINGTON, P. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. 1a. ed. Basingstoke, Exegetics Limited. 709p.
- GUIMARÃES, M.L., M.C. TOMÉ & G.S CRUZ, 1996. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 35, pp.120-137. Trees IV. Springer Verlag. Berlin.
- GUTIÉRREZ-MICELI, F. A., M. A. RODRÍGUEZ-MENDIOLA, N. OCHOA-ALEJO, R. MÉNDEZ-SALAS, L. DENDOOVEN, AND C. ARIAS-CASTRO. 2002 a. Relationship between sucrose accumulation and activities of sucrose-phosphatase, sucrose synthase, neutral invertase and soluble acid invertase in micropropagated sugarcane plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 24: 441-446.
- HAMIDAH M, A GHANI, P DEBERGH (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48:189-193.

- HOYOS, R. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt *in-vitro* vía organogénesis. *En: Seminario orientacion estrategica de la investigacion agropecuaria en la universidad nacional de colombia sede medellin* (1996: Medellín). TRABAJOS PRESENTADOS. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1997. p. 50.
- KYTE, L., J. KLEYN. *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation*. 3ª ed. U.S.A. Portland: Timber Press. 1996. 240 p.
- LASSO, Miguel. Propuesta para la creación de una cooperativa comercializadora de productos derivados del Tomate de Árbol orgánicos en el municipio de Funes de Nariño, Colombia. Tesis de Grado, Universidad de Nariño. p 45 – 58. 2007.
- LEE-ESPINOSA H., CRUZ-CASTILLO J. y GARCIA-ROSAS; *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 26 (4),2003.
- MARDONES, L. Recuperación de genotipos de avellano chileno (*Gevuinaavellana* Mol.), mediante cultivo *in-vitro* de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 1999. 40 p.
- MARGARA, J. 1988. *Multiplicación Vegetativa y Cultivo in-vitro*. Madrid, Mundi-Prensa. 236p.
- MUÑOZ M. Multiplicación *in-vitro* de clones selectos de *Castanea sativa* Mill. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 2000. 39 p.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

- OBANDO, M. and JORDAN, M. Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo) cultivated *in-vitro*. *En: Acta Horticulture*. No. 560 (2001); p. 429 - 432.
- ONAMU, R. OBUKOSIA, S. MUSEMBI, N. AND HUTCJINSON, M.. Efficacy of Thidiazuron *In-vitro* propagation of carnation shoot tips: Influence of Dose and Duration of Exposure. *African Crop Science Journal*. 11(2): 125-132 p (2003).
- POWERS, D.E., BACKHAUS, R.A., *In-vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16, págs. 57-60, 1989.
- ROCA, M. Y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali. 970 p.
- VIETEZ A., M. VIETEZ. Castanea sativa plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *ScienciaHorticulturae*, 1982, Vol. 18, p. 343-351.