

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE TERMOTERAPIA, ELECTROTERAPIA Y  
PROPAGACIÓN POR MERISTEMOS EN TOMATE DE ÁRBOL *Solanum betaceum*  
Cav.**

**JOSÉ EVER MELO CERÓN I.A.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS  
SAN JUAN DE PASTO**

**2018**

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE TERMOTERAPIA, ELECTROTERAPIA Y  
PROPAGACIÓN POR MERISTEMOS EN TOMATE DE ÁRBOL *Solanum betaceum*  
Cav.**

**JOSÉ EVER MELO CERÓN I.A.**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magister en Ciencias  
Agrarias con Énfasis en Producción de Cultivos**

**Director de Trabajo  
HERNANDO CRIOLLO ESCOBAR Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS  
SAN JUAN DE PASTO  
2018**

### **Nota de Responsabilidad**

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° de acuerdo 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

**Nota de Aceptación**

---

**Luis Alfredo Molina. MSc.**  
**Jurado delegado**

---

**Jaime Benavides. MSc.**  
**Jurado**

---

**Sandra Lorena Alvarez. MSc.**  
**Jurado**

---

**Hernando Criollo Escobar. Ph.D.**  
**Presidente**

San Juan de Pasto, Agosto de 2018

**Dedicatoria**

*A mi hijo Jose Gabriel*

*A mis padres Flor Alba y José E.*

*A mi esposa Paula Andrea*

*A mi tía Betty Cerón*

## **Agradecimientos**

*A la Universidad de Nariño, laboratorio de tejidos y laboratorio de biología molecular.*

*A Hernando Criollo Escobar Ph.D., por su apoyo incondicional, su amistad y sus aportes al trabajo de investigación y mi formación académica.*

*A mis Jurados de Tesis Luis Alfredo Molina MSc., Jaime Benavides MSc. y Sandra Lorena Alvarez MSc, por sus aportes para la culminación de esta investigación.*

*A Karolina Martinez Ph.D., Por su apoyo y colaboración en laboratorio de Biología molecular*

*A los colaboradores en Laboratorio Vanesa Lopez I.A., Lady Zambrano I.A., Cristina Narvaez I.A., Katherine Insuasti I.A. y Fernando Criollo I.A. por su amistad, colaboración y apoyo.*

*Y a todas las personas que de alguna u otra forma me ayudaron en este largo y arduo proceso.*

*A todos muchas gracias.*

## Resumen

El cultivo de tomate de árbol tiene gran importancia en Nariño y Colombia y su área sembrada supera las 9000 has; una de las principales limitantes del cultivo la constituyen los problemas sanitarios, presentados principalmente por enfermedades sistémicas que pueden ser transmitidas en el material de propagación, las cuales son de difícil manejo en el campo. La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar alternativas para el manejo de enfermedades sistémicas en el material de propagación, valorando la germinación, supervivencia y regeneración de semillas o explantes después de efectuados los tratamientos in vitro. Se utilizaron métodos de propagación de meristemos, termoterapia (48°C, 68°C y 88°C) y electroterapia (2 volt, 5 volt, 10 volt y 15 volt) tanto en semillas sexuales como a plántulas y tejidos producidos in vitro; los tratamientos térmicos y los eléctricos se aplicaron con diferentes periodos de tiempo (12h, 24h, 36h, 48h y 72h). Además, los tratamientos térmicos en semillas se aplicaron en condición húmeda y en seco. El control estuvo conformado por semillas y plántulas sin tratamientos de calor o de electricidad.

El mejor tratamiento para la producción de plántulas a partir de meristemos fue el medio MS suplementado con AIA (0,5 mg. L<sup>-1</sup>), BAP (1,5 mg. L<sup>-1</sup>) y AG<sub>3</sub> (1,0 mg. L<sup>-1</sup>). La germinación de semillas de tomate no se afectó con el tratamiento térmico en húmedo no mayor a 48°C y 36 h que presentó un porcentaje de germinación de 89%; cuando el calor se aplicó en seco, las semillas resistieron hasta los 68°C y 72 h sin reducciones significativas en su germinación (85%). De igual manera, las semillas de tomate no se vieron disminuidas en su germinación cuando se sometieron a voltajes inferiores a 15 voltios, sin influir el tiempo del tratamiento hasta los 15 minutos evaluados. Cuando se aplicó el tratamiento térmico a plántulas in vitro, éstas sobrevivieron a un tratamiento de 40°C por 24 h y a la electroterapia hasta 10 voltios y 15 minutos de exposición; la supervivencia en la fase de aclimatación de estas plantas fue del 100%, la biomasa seca al cabo de 28 días, osciló entre 0,06g en las plantas de meristemos y 0,23g en aquellas sometidas a electroterapia.

**Palabras claves:** Enfermedad, termoterapia, electroterapia, germinación, supervivencia.

### Abstract

Tree tomato cultivation is very important in Nariño and Colombia, its planted area exceeds 9000 hectares; one of the main limitations of the crop is the health problems presented mainly by systemic diseases that can be transmitted in the propagation material, which are difficult to manage in the field. The present investigation was carried out with the objective of evaluating alternatives for the management of systemic diseases in the propagation material, calculating the germination, survival and regeneration of seeds or explants after in vitro treatments. Meristem propagation methods, thermotherapy (48°C, 68°C and 88°C) and electrotherapy (2 volt, 5 volt, 10 volt and 15 volt) were used in both sexual seeds and in seedlings and tissues produced in vitro. The thermal and electrical treatments were applied with different periods of time (12h, 24h, 36h, 48h and 72h). Furthermore, heat treatments were applied in seeds in a wet condition and dry. The control consisted of seeds and seedlings without heat or electricity treatments.

The best treatment for the production of seedlings from meristems was the MS medium supplemented with AIA (0,5 mg. L<sup>-1</sup>), BAP (1,5 mg. L<sup>-1</sup>) and AG3 (1,0 mg. L<sup>-1</sup>). The germination of tomato seeds was not affected with the thermal treatment in humid no greater than 48°C and 36 h that presented a percentage of germination of 89%; when the heat was applied dry, the seeds resisted up to 68°C and 72 h without significant reductions in germination (85%). In that some way, tomato seeds were not diminished in their germination when subjected to voltages below 15 volts, without influencing the time of treatment until the 15 minutes evaluated. When heat treatment was applied to in vitro plantlets, they survived a treatment of 40°C for 24 h and electrotherapy up to 10 volts and 15 minutes of exposure; the survival in the acclimatization phase of these plants was 100%, the biomass dried after 28 days, ranged between 0,06g in the meristem plants and 0,23g in those subjected to electrotherapy.

**Keywords:** Disease, thermotherapy, electrotherapy, germination, survival.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Título .....	16
2. Marco Teórico .....	17
2.1 Generalidades del cultivo de Tomate de árbol .....	17
2.1.1 Clasificación y origen. ....	17
2.1.2 Descripción Botánica. ....	17
2.1.3. Condiciones agro climatológicas .....	18
2.2. Principales plagas del Tomate de árbol <i>S. betaceum</i> Cav. ....	19
2.3. Principales patógenos del tomate de árbol <i>S. betaceum</i> Cav.....	19
2.3.1. Nematodos .....	19
2.3.2. Hongos .....	20
2.3.3. Oomycetes.....	20
2.3.4. Bacterias.....	21
2.3.5. Virus.....	21
2.4. Propagación in vitro.....	22
2.4.1. Medios de Cultivo para propagación In vitro .....	24
2.4.2. Fitohormonas .....	24
2.5. Métodos para la eliminación de enfermedades .....	27
2.5.1 Tratamiento con calor .....	27
2.5.2 Electroterapia .....	28
2.5.3 Cultivo de meristemas .....	29
2.6. Determinación de biomasa .....	29
2.7. Estudios relacionados a la eliminación de enfermedades en tomate de árbol .....	30
3. Materiales y métodos .....	34
3.1. Localización.....	34
3.2 Selección de frutos.....	34
3.2.1 Obtención, desinfección y siembra de la semilla.....	34

3.3. Evaluación de terapias utilizadas en semillas de tomate de árbol .....	35
3.3.1 Termoterapia en semillas .....	35
3.3.2 Electroterapia en semillas .....	36
3.4. Terapias en explantes de tomate de árbol.....	37
3.4.1 Termoterapia en explantes .....	37
3.4.2 Electroterapia en explantes .....	38
3.5. Propagación por meristemos .....	39
3.6. Fase de aclimatación.....	41
3.7. Variables evaluadas .....	42
3.7.1. Porcentaje de germinación de semillas .....	42
3.7.2. Porcentaje de supervivencia de los explantes .....	42
3.7.3 Porcentaje de sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatación.....	43
3.7.4. Biomasa.....	43
4. Resultados y Discusión .....	44
4.1. Efecto de la termoterapia sobre el porcentaje de germinación de semillas .....	44
4.2 Efecto de la Electroterapia sobre el porcentaje de germinación de semillas.....	47
4.3. Efecto de la termoterapia sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes .....	49
4.4. Efecto de la electroterapia sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes.....	52
4.5 Propagación por meristemos .....	54
4.6 Fase de aclimatación.....	58
5. Conclusiones .....	61
Bibliografía.....	62

**Lista de Tablas**

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Fitoregularores y concentraciones utilizados para la siembra de meristemos en medio de cultivo MS. ....	40
Tabla 2. Análisis de varianza para la variable germinación de semillas de tomate de árbol (%) con tratamientos térmicos, duración del tratamiento y condición de humedad de la semilla durante el tratamiento. ....	44
Tabla 3. Análisis de varianza para la variable germinación de semillas de tomate de árbol (%) con tratamientos eléctricos (V) y diferentes tiempos de duración del tratamiento. ....	48
Tabla 4. Análisis de varianza para la variable supervivencia de explantes de tomate de árbol (%) con tratamientos térmicos y duración del tratamiento. ....	50
Tabla 5. Análisis de varianza para la variable supervivencia de explantes de tomate de árbol (%), con tratamientos eléctricos y duración del tratamiento. ....	53
Tabla 6. Análisis de varianza para la variable regeneración de meristemos de tomate de árbol (%) con diferentes concentraciones de hormonas. ....	55
Tabla 7. Análisis de varianza para la variable peso seco de las plantas de tomate de árbol (g) después de la fase de aclimatación con tratamientos de electroterapia, termoterapia y cultivo de meristemos. ....	59

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Planta de tomate de árbol <i>S. betaceum</i> . A. Hojas y tallo, B. Flores, C. Frutos. Fotografías: Melo, E. (2018). .....	18
Figura 2. Tratamiento de electroterapia en semillas de tomate de árbol <i>S. betaceum</i> . Fotografías: Melo, E. (2016). .....	36
Figura 3. Tratamiento de termoterapia en plantas de tomate de árbol <i>S. betaceum</i> . Fotografías: Melo, E. (2016). .....	38
Figura 4. Tratamiento de electroterapia en tallos de tomate de árbol <i>S. betaceum</i> . Fotografías: Melo, E. (2016). .....	39
Figura 5. Extracción del meristemo en tomate de árbol, crecimiento y desarrollo del callo y brotes en medio de cultivo MS. (A, B, C, D, E) extracción del meristemo, (F) brote desarrollado listo para siembra a medio de cultivo MS. Fotografías: Melo, E. (2016). .....	40
Figura 6. Fase de endurecimiento en invernadero: (A) planta de 21 días después de la siembra en medio MS (B) trasplante a turba en bandeja de 50 alveolos (C) plantas de nueve días después del trasplante (D) micro túnel de policarbonato (E) Plantas 28 días después del trasplante. Fotografías: Melo, E. (2016). .....	41
Figura 7. Comportamiento de la germinación de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes temperaturas durante 48°C, 68 °C, y 88 °C bajo condición húmeda. ....	45
Figura 8. Comportamiento de la germinación de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes temperaturas durante 48°C, 68 °C, y 88 °C bajo condiciones secas. ....	46

Figura 9. Porcentaje de germinación in vitro de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes voltajes (2, 5, 10, 15V). .....	48
Figura 10. Comportamiento de la supervivencia de los ex plantes de tomate de árbol in vitro sometidos a diferentes temperaturas por cuatro periodos de tiempo. ....	50
Figura 11. Comportamiento de la regeneración de meristemos de tomate de árbol sometidos a diferentes concentraciones hormonales.....	56
Figura 12. Peso seco de plantas de tomate de árbol, 28 días después de la aclimatación.....	59

## Introducción

La fruticultura nacional se ha incrementado considerablemente en los últimos años, este comportamiento obedece a una tendencia mundial gracias a la demanda nacional e internacional de frutas exóticas (Asohofrucol, 2016). Dentro del grupo de frutas exóticas de importancia en Colombia se encuentran varias de la familia Solanaceae, como: uchuva, lulo y tomate de árbol.

El cultivo de tomate de árbol *Solanum betaceum*, es importante para los agricultores de clima medio y frío moderado, gracias a la demanda creciente de esta fruta, en especial para consumo en fresco y para la preparación de jugos. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2018), para el año 2016 se sembraron en Colombia alrededor de 9.335 hectáreas, distribuidas en 18 departamentos y se cosecharon alrededor de 186.032 toneladas. El departamento con mayor aporte en cuanto a la producción fue Antioquia con más del 60,28% seguido de Cundinamarca con un 17,10% y Tolima con un 6,0 %; Nariño tiene una participación nacional del 1,6% (Agronet, 2018).

A pesar que en los últimos años el área sembrada se ha incrementado paulatinamente, el rendimiento por unidad de superficie se ha reducido, una de las causas más comunes que favorece esta disminución se debe a la explotación intensiva de este cultivo, lo que genera que los problemas fitosanitarios sean una limitante para su producción. Actualmente, se reportan plagas como: el pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis*, el chinche patón *Leptoglossus zonatus*, el áfido *Aphis gossypii* y moscas de la fruta como *Anastrepha* spp. (Díaz *et al.*, 2013), y patógenos que causan enfermedades como: antracnosis *Colletotrichum acutatum*, nematodos *Meloydogine incognita*, gota *Phytophthora infestans*, mildes *oidium* sp., muerte descendente *Phoma* sp., *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas* Starr y complejos virales que involucran a: PLRV, CMV, TSWV, AMV, PVY, TaLMV, CMV y ToMV (Alvarez *et al.*; 2011 y Saldarriaga *et al.*, 2008).

La mayor limitante que enfrentan los productores de Nariño y Putumayo, es la ausencia de semillas certificadas que garanticen la sanidad de las plantas desde el vivero. Alvarez *et al.*, (2011), comprobaron que enfermedades como la virosis del Tomate de árbol se transmiten por

semilla sexual tomada de plantas aparentemente sanas (asintomáticas), lo cual implica que los nuevos cultivos estén infectados en un gran porcentaje desde el semillero, propagándose rápidamente a todo el cultivo por vectores como áfidos, nematodos y posiblemente por ácaros (Agrios, 2002).

Para la obtención de material vegetal sano, Conci (2004) menciona que existen diferentes métodos como la electroterapia, termoterapia, quimioterapia que solas o en combinación con cultivos de meristemas pueden funcionar bien para la erradicación de algunos patógenos sistémicos. De esta manera, el objetivo propuesto en esta investigación fue evaluar el efecto de los métodos utilizados en tratamientos de enfermedades sistémicas de tomate de árbol en la germinación, supervivencia y regeneración de plantas *in vitro*.

## **1. Título**

“EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE TERMOTERAPIA, ELECTROTERAPIA Y PROPAGACIÓN POR MERISTEMOS EN TOMATE DE ÁRBOL *Solanum betaceum* Cav”.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Generalidades del cultivo de Tomate de árbol

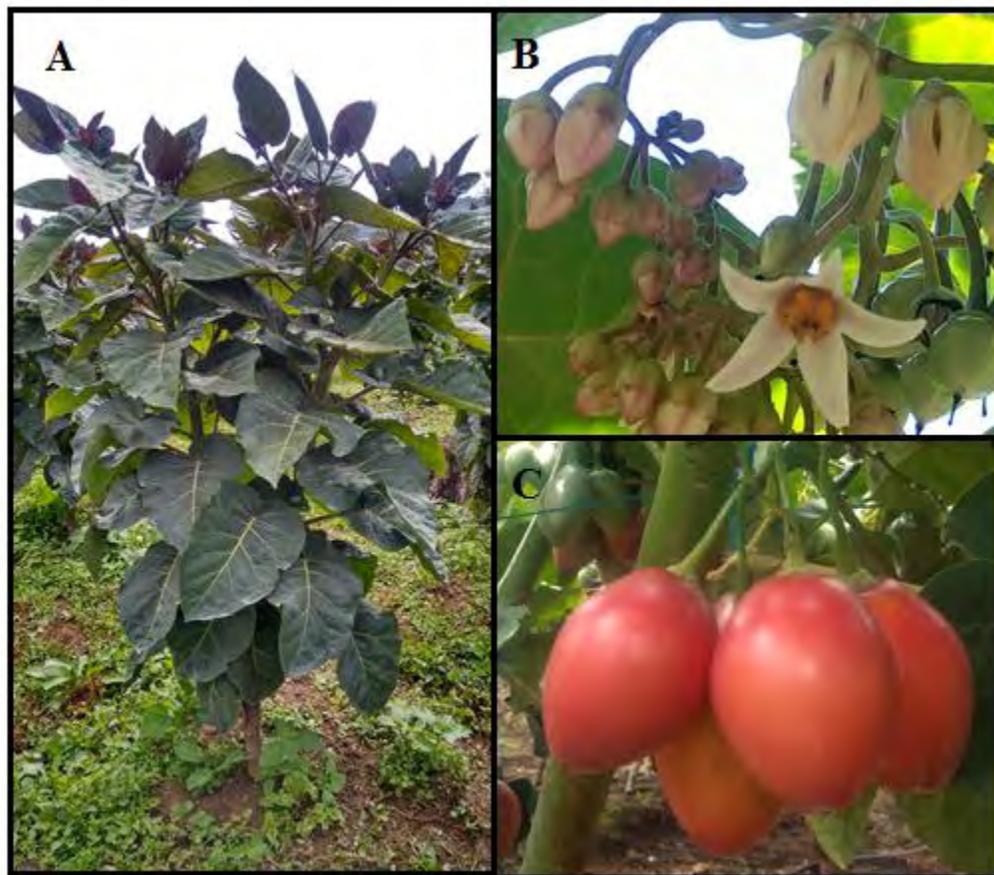
El tomate de árbol *S. betaceum*, es un frutal exótico, que se conoce con diferentes nombres: tomate de árbol, tamarillo, tomate de agua, tomate cimarrón (Boyes y Strübi, 2010).

#### 2.1.1 Clasificación y origen.

El tomate de árbol *S. betaceum* Cav., pertenece a la familia de las solanáceas, es una planta originaria de América del sur. Su centro de origen ubica en los bosques de la reserva de Tucumano entre Bolivia y el norte de Argentina, debido a la alta diversidad genética encontrada en esta región. Actualmente se cultiva en Chile, norte de Argentina, Ecuador, Brasil y Colombia, con la finalidad de exportar y aprovechar sus frutos comestibles (Lester y Hawkes, 2001; Bohs y Nelson, 1997).

#### 2.1.2 Descripción Botánica.

Es un árbol pequeño de 2 a 3 metros de altura, con un tallo semileñoso ramificado a diferentes alturas (Figura 1A). Hojas simples, sin estípulas y alternas de 17 a 30 cm de longitud (Figura 1A), flores hermafroditas, lo que le permite un alto porcentaje de auto polinización, el cáliz persistente en el fruto, corola blanco-rosada, con los ápices reflexos, estambres conniventes, más cortos que la corola, anteras amarillas, dehiscentes por dos poros apicales, estilo emergente entre las anteras (Figura 1B). Fruto de 5 a 7 cm de largo, ovoide, glabro, de color amarillo verdoso a anaranjado con jaspes longitudinales; mesocarpo anaranjado, el peso de los frutos varía entre 70 a 100 gramos y cada fruto posee alrededor de 240 semillas (Figura 1C). La planta es perennifolia y la emisión de hojas es continua. Sin embargo, las hojas inferiores caen sucesivamente, quedando el tallo principal y la parte inferior de las ramas desprovistas de hojas (Santillán, 2001; Feican *et al.*, 1999; Bohs, 1994 y 1991).



**Figura 1.** Planta de tomate de árbol *S. betaceum*. A. Hojas y tallo, B. Flores, C. Frutos. Fotografías: Melo, E. (2018).

### 2.1.3 Condiciones agro climatológicas

El cultivo de tomate de árbol, en la región andina de Colombia se desarrolla más eficientemente en clima frío moderado, con temperaturas que oscilan entre los 13°C a 20 °C; temperaturas superiores a los 25° C, e inferiores a los 10° C durante el período de floración generan caída de la flor y afectan el cuajado del fruto. De forma silvestre, crece entre los 1.200 a 3.000 msnm; sin embargo, entre los 1.800 a 2.600 msnm se desarrolla de forma óptima. La humedad relativa para el cultivo ha de oscilar entre 70% al 80%, para favorecer la polinización (Mortón, 1982; Feicán *et al.*, 1999 y Santillán 2001). La precipitación promedio anual debe ser entre 1.500 a 2.000 mm distribuidos uniformemente a lo largo del año, teniendo en cuenta que la planta no es tolerante al déficit del agua que pueden generar bajos rendimientos y perjudicar la calidad del fruto (Bonnet y Cárdenas, 2012). El cultivo de tomate de árbol es sensible a

radiaciones solares intensas, por lo que se desarrolla mejor en condiciones de nubosidad, característica de las zonas de la región andina de donde proviene (Acosta-Quezada *et al.*, 2011).

El desarrollo óptimo de este cultivo se da en suelos con textura media franca a franco arenosa, permeables, profundos y con buen contenido de materia orgánica y que no presenten altos contenidos de arcilla o arena. Se adapta bien a suelos ligeramente ácidos, con un pH entre 5.5 y 6.5. El cultivo no tolera suelos compactados y sin oxigenación (Bonnet y Cárdenas, 2012). El drenaje debe ser adecuado ya que el exceso de humedad en el suelo, puede causar “amarillamiento” general de la planta y causar la muerte del sistema radical por anaerobiosis (Feicán *et al.*, 2016).

## **2.2. Principales plagas del Tomate de árbol *S. betaceum* Cav.**

Según Arévalo *et al.*, (2011) y Díaz *et al.*, (2013) las principales plagas que más afectan a este cultivo son: pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis*, el chinche patón *Leptoglossus zonatus*, moscas de la fruta del género *Anastrepha* spp. y *Ceratitis* sp., e insectos chupadores como mosca blanca y áfidos los cuales pueden ser vectores de virus.

## **2.3. Principales patógenos del tomate de árbol *S. betaceum* Cav.**

### **2.3.1. Nematodos**

Uno de los agentes causales de enfermedades radiculares son los nematodos, los cuales constituyen problemas limitantes a nivel radicular, se han identificado diferentes géneros de nematodos asociados al sistema radicular, en el cual las raíces del cultivo presentan diferentes grados de incidencia y severidad de nudosidades, que disminuyen el rendimiento y generan gran impacto económico en el cultivo (Angulo, 2008). En Nariño García *et al.*, (2004) reportan cuatro especies del género *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. hapla*, *M. exigua* y *M. arenaria*, formadores de nudos en cultivos de tomate y lulo. La presencia de nematodos en las raíces reduce la durabilidad de los árboles en el campo y la eficiencia de fertilizantes; cuando está asociado con la bacteria *Ralstonia solanacearum*, puede ocasionar la muerte de la planta. Los nematodos de los

géneros: *Xyphinema* sp, *Trichodorus* sp y *Longydorus* sp., pueden ser transmisores de virus (Agrios, 2002).

### 2.3.2. Hongos

Damm *et al.*, (2012) menciona que la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum acatatum*, es una enfermedad que según Saldarriaga *et al.*, (2008) tiene una amplia distribución y todas las variedades cultivadas son susceptibles a ella. La antracnosis incrementa su incidencia y severidad cuando las lluvias son frecuentes y la humedad relativa es elevada (Gañán *et al.*, 2015; Korsten y Jeffries, 2000). Ataca a los frutos en cualquier estado de desarrollo y también a ramas y hojas. Los frutos afectados presentan lesiones iniciales negras que pueden llegar a cubrir todo el fruto, poseen bordes definidos y el centro hundido. Los frutos se secan o momifican y pueden caer al suelo o permanecer adheridos al árbol. La enfermedad se disemina por el viento e insectos como el chinche patón *Leptoglossus zonatus* (Areválo *et al.*, 2011; Maita, 2011 y Bernal, 1994).

### 2.3.3. Oomycetes

Otra de las enfermedades más comunes es la gota causada por *Phytophthora infestans*, esta enfermedad se desarrolla rápidamente bajo condiciones de lluvias frecuentes y humedad relativa alta. Se disemina por el viento. Si no hay un control adecuado puede ser devastadora en cultivos comerciales. Ataca al follaje y ramillas de plantas adultas y al ápice, follaje y tallos de plantas jóvenes, ocasionando defoliación intensa. Produce lesiones de color negro brillante, de consistencia ligeramente acuosa en los tallos y manchas redondeadas de color café – negruzcas en el haz y en el envés de las hojas, desde los bordes hacia adentro, con ondulaciones concéntricas a manera de oleaje formadas por un polvillo blanquecino (Feican *et al.*, 2016).

Revelo *et al.*, (2008) mencionan que otras enfermedades fungosas que se presentan en este cultivo son: mildes *Oidium* sp, mancha anillada *Phoma* sp, tizón temprano *Alternaria* sp, moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum*, entre otras.

#### 2.3.4. Bacterias

La dormidera o marchitez del tomate de árbol, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* Smith, origina marchitez, clorosis, pérdida del vigor y anclaje de las plantas; cuando la enfermedad ha avanzado, ocasiona defoliación y muerte de las plantas. La agalla de la corona y tallo, causada por *Agrobacterium* Conn, y la mancha plateada asociada a *Xanthomonas* Starr son consideradas enfermedades de menor importancia observándose periódicamente en los cultivos (López y Castaño, 2013 y Angulo, 2008).

#### 2.3.5. Virus

Los virus son parásitos obligados, incapaces de crecer o dividirse por sí mismos, debido a que carecen de la información genética que codifica la maquinaria para generar energía metabólica y la síntesis de proteína (Carrington y Dougherty, 1987). La estructura de un virus está compuesta de una cubierta proteica o cápside y un ácido nucleico que conforma su genoma; algunos virus de plantas pueden tener una cubierta externa formada a partir de bicapas lipídicas procedentes de las células que infectan. Según Arhana *et al.*, (2010) y Agrios (2005) y existen virus con DNA y RNA, los cuales pueden ser transmitidos de planta a planta mediante diversas formas como la propagación vegetativa e injertos, mecánicamente a través de la savia y por medio de semillas, polen, insectos, ácaros, nematodos, la cuscuta y los hongos.

En la actualidad, Nariño y todos los departamentos productores de esta fruta reportan la presencia de la virosis del tomate en mayor o menor grado, causando pérdidas en los cultivos hasta en un 100% de las cosechas (Alvarez *et al.*, 2011; Ayala *et al.*, 2010). Los principales síntomas asociados a la virosis del tomate de árbol corresponden a mosaicos foliares acompañados de ampollamiento, engrosamiento y amarillamiento de venas, cambios en la coloración y textura de los frutos, reducción en la producción y disminución de la longevidad de las plantas afectadas (Ayala *et al.*, 2010; Revelo *et al.*, 2008 y Betancourth *et al.*, 2003).

La presencia de mezclas de virus que afectan el Tomate de árbol se ha reportado en países como Nueva Zelanda y Ecuador, donde se han detectado miembros de las familias *Potyviridae*,

*Flexiviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Luteoviridae* y *Comoviridae* como agentes causales de las enfermedades virales de este cultivo (Eagles *et al.*, 1994 y Vizquete, 1991).

Dentro de los virus que se han reportado afectando cultivos de Tomate de árbol en Colombia se encuentran los géneros: *Potyvirus* Potato virus Y (PVY), *Cucumovirus* Cucumber mosaic virus (CMV), *Alfavirus* Alfalfa mosaic virus (AMV), *Polerovirus* Potato leafroll virus (PLRV), *Nepovirus* Tomato ringspot virus (ToRSV), *Tospovirus* Tomato spotted wilt virus (TSWV), *Tobamovirus* Tomato mosaic virus (ToMV) (Agrios, 2005; Astier *et al.*, 2007; Betancourth *et al.*, 2003; Hull, 2004; ICTV, 2006a; ICTV, 2006b; Khan y Dijkstra, 2006 y Mumford *et al.*, 1996).

#### **2.4. Propagación in vitro**

Sharry *et al.*, (2015) definen el cultivo de tejidos vegetales como un conjunto de herramientas biotecnológicas con muchas ventajas y aplicaciones, que se basa en la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, que a partir de una célula en medio de cultivo nutritivo se puede crear una nueva planta completa. Involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales; consiste en regenerar plantas a partir de explantes (ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen) cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (Mroginski *et al.*, 2010 y Hartung, *et al.*, 2002).

Las ventajas del cultivo in vitro según Mejia y Vitorelli (1988) y Roca y Mroginski, (1991) son:

- a). Obtención de plantas libres de enfermedades.
- b). Facilitar la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- c). Permitir la ampliación de la base genética de una especie, para establecer programas de mejoramiento genético.

**d).** Propagación de clones en cualquier época del año.

e). El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios.

f). Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.

g). Permitir someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales).

Según Sharry *et al.*, (2015), a través del cultivo *in vitro*, se obtiene una descendencia genéticamente uniforme. Entre los explantes más utilizados se encuentran las yemas vegetativas, las cuales se siembran en recipientes de vidrio que contienen un medio de cultivo semi sólido con los nutrientes necesarios para su desarrollo, los cuales dependen de la especie que se vaya a propagar.

Una de las aplicaciones más importantes de la propagación *in vitro* es el cultivo de callos, el cual puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal. La producción de callo requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, principalmente de trozos de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros, y en otros casos estambres, pétalos y ovarios (Correia y Canhoto 2010; Stefanello *et al.*, 2005).

En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento (Fitohormonas) como también su concentración y combinación (Larson *et al.*, 2006, Feeney *et al.*, 2007, Rashmi y Trivedi, 2014), por ejemplo, para la inducción del crecimiento del callo se requiere inicialmente una cantidad elevada de auxinas (Trabelsi *et al.*, 2010).

### 2.4.1. Medios de Cultivo para propagación In vitro

Para el desarrollo y crecimiento de los tejidos vegetales in vitro, un recurso de vital importancia es contar con el medio de cultivo adecuado que proporcione todos los nutrientes que requiera el explante para su desarrollo. Los primeros intentos de diseño de un medio de cultivo fueron realizados por Sacks y Knops, quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, que pueden contener cerca de 40 compuestos, entre los cuales se encuentran sales, minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Roca y Mroginski, 1991; Doods y Robert, 1988). George y Sherrington (1984) reportan que hacia el año 1934, White logra obtener raíces de tomate en un medio de cultivo compuesto a base de extracto de levadura.

Huang y Murashige (1977) y Dixon (1985) realizaron estudios comparativos de la composición salina de varios medios comerciales de cultivo de tejidos vegetales, estos autores destacaron que:

1. El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio.
2. El medio B5 (Gamborg *et al.*, 1976) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio.
3. Los medios MS y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) presentan altas concentraciones de sales comparados con el medio de White del año 1963.
4. Los medios MS y SH contienen hierro formando un quelato con EDTA.
5. Los medios de White (1963) y de Heller (1953) contienen sulfato y cloruro férrico, respectivamente.

### 2.4.2. Fitohormonas

Una hormona vegetal es un compuesto producido internamente por una planta, que trabaja en muy bajas concentraciones y cuyo principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales. Se reconocen cinco grupos de fitohormonas principales: las estimuladoras de crecimiento (auxinas, giberelinas (GA) y citoquininas (CK)) y las inhibidoras de crecimiento (etileno y ácido abscísico (ABA)) (Kamiya, 2010).

#### **2.4.1.1. Auxinas**

Fueron las primeras fitohormonas en ser descubiertas, químicamente es el ácido indolacético (AIA). Las auxinas se encuentran en toda la planta, pero se producen principalmente en las regiones meristemáticas de crecimiento activo de división celular (ejemplo: ápices), lo cual está relacionado con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (Srivastava, 2002).

En cuanto a los mecanismos de transporte, se conoce un mecanismo polar (más lento) en tallos y raíces, exclusivo de auxinas, que depende de proteínas transportadoras específicas para esta hormona (la familia de transportadores PIN-FORMED), y no polar en el floema (más rápido) donde se encontraría asociado con procesos de división del cambium y ramificación de raíces. Las auxinas generalmente son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta, alejándose del punto apical hacia la base (basípeto) en el tallo y en el sentido contrario (acrópeto) desde la raíz (Lira, 2013 y Zhao, 2010).

A nivel comercial, se utilizan para el enraizamiento de estacas y son muy usadas en el ámbito de los injertos y para la generación de callos, dado su efecto cicatrizante. Por ejemplo, los esquejes de vid se propagan usando sustancias auxínicas puras (Indolbutílico, indolacético, naftalenacético) en concentraciones muy bajas. El uso de auxinas persistió en actividades de propagación de plantas, los más utilizados son derivados del naftaleno como el ácido naftalenacético (NAA) utilizado para promover la formación de raíces laterales en cultivo de tejidos (Jordán, y Casaretto, 2006).

#### **2.5.1.2. Giberelinas**

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides que se definen más por su estructura que por su actividad biológica. Se conocen alrededor de 130, todas presentes en plantas superiores e inferiores, y existe un gran número de compuestos de uso comerciales. Son tantas que se las señala con números, pero sólo cuatro son fisiológicamente activas: las giberelinas 1, 3, 4 y 7 (Yamaguchi, 2000).

En general, se encuentran mayores niveles de giberelinas en las partes reproductivas en comparación con las vegetativas, y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Se encuentra con facilidad en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación. Posteriormente, son translocadas vía floema al resto de la planta. Las raíces también las producen, exportándolas al tallo vía xilema (Ueguchi-Tanaka, 2007). Entre las principales funciones de las giberelinas se destacan: interrumpir el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar, inducir la brotación de yemas, estimulan la germinación del polen y pueden producir frutos partenocárpicos (Marín, 2017).

Actualmente, el compuesto de mayor uso comercial es el ácido giberélico (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>) o giberelina 3 (AG<sub>3</sub>), pero también se usan combinaciones y las giberelinas pueden transformarse unas en otras. En gran parte de los vegetales la aplicación de AG<sub>3</sub>, en cultivos in vitro se utiliza para estimular el crecimiento vegetativo ya que provoca elongación celular y desarrollo de brotes, aunque además induce diferenciación celular (Taiz y Zeiger, 2007). El mayor efecto de la aplicación de giberelina sobre los tejidos se manifiesta en la elongación por lo que los internudos siempre se alargan con la aplicación de esta hormona (Yamaguchi, 2000).

### ***2.5.1.3. Citoquininas***

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. Los diferentes tipos de Citoquininas son Zeatina, Kinetina y Bencil aminopurina (BAP). Entre sus principales efectos fisiológicos se encuentran los procesos de división celular (formación y crecimiento de brotes axilares), inducen la formación de órganos en cultivo de tejidos (morfogénesis), activan el crecimiento de yemas laterales, retardan la senescencia en las hojas, estimulan la movilización de nutrientes y la pérdida de agua por transpiración y el rompimiento de la dormancia (Klee y Estelle, 1991) y también el control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales (Sakakibara, 2006). Se cree que las citoquininas son sintetizadas en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces de leguminosas, semillas en germinación, especialmente en endospermas líquidos y frutos jóvenes; desde donde se transportan vía xilema

hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos (Srivastava, 2002).

Actualmente se han reconocido sus mecanismos de biosíntesis y de señalización, debido al uso de técnicas moleculares modernas que han permitido la identificación de los genes que codifican para las enzimas y proteínas que controlan los puntos clave de estos procesos (Taiz y Zeiger, 2007). La biosíntesis y homeostasis de citoquininas, están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otras fitohormonas y las fuentes de nitrógeno inorgánico; además, su mecanismo de translocación está relacionado con el mismo sistema de transporte de purinas y nucleósidos tanto a nivel de toda la planta, como a nivel celular (Sakakibara 2006).

## **2.5. Métodos para la eliminación de enfermedades**

Una de las alternativas más utilizadas para el control y eliminación de enfermedades es el uso de métodos físicos los cuales contribuyen a erradicar el patógeno o a reducir su cantidad; estos métodos comprenden el uso de temperaturas altas o bajas, el uso de las radiaciones, uso de electricidad y propagación por meristemas (Achicanoy, 2001).

### **2.5.1 Tratamiento con calor**

El tratamiento con calor es eficiente y ampliamente utilizado para el control de fitopatógenos del suelo y de material de propagación (semilla sexual y asexual). Los tratamientos del suelo con calor, por lo general se realizan en pequeñas áreas como invernaderos y semilleros debido principalmente al costo invertido. Se puede hacer mediante esterilización, pausterización, acolchado y solarización (Achicanoy, 2001).

#### **2.5.1.2. Termoterapia.**

Achicanoy (2001), menciona que la sanidad del material de propagación como las semillas, tubérculos, bulbos, plántulas, cormos, rizomas, esquejes, yemas, injertos, portainjertos, es de gran

importancia en el control de las enfermedades por lo que se debe hacer todo esfuerzo por obtener y utilizar material propagativo libre de patógenos.

Existen varios sistemas para sanear integralmente una planta eliminando los microorganismos que las infestan; sólo uno de ellos, la termoterapia no necesita condiciones *in vitro* para aplicarse. Consiste en la incubación del espécimen a sanear en un ambiente con alta temperatura (35 a 40°C) y alta humedad, durante periodos de 20 días a varios meses, este método se aplica con éxito en frutales (Van Loenen *et al.*, 2003).

La Termoterapia está dirigida fundamentalmente a enfermedades virales y bacteriales (Achicanoy, 2001). Quak (1977) reporta que el tratamiento de plantas con temperaturas elevadas (termoterapia) lleva a una reducción en la concentración del virus en la planta.

El tratamiento con calor a vegetales para liberarlos de patógenos ha sido aplicado como tal antes del uso del cultivo de meristemos. Muchos virus han sido eliminados por medio de esta técnica. Los materiales usados para los tratamientos pueden ser partes vegetales en dormancia, o bien en crecimiento vegetativo. En el primer caso se suele utilizar agua caliente (35 a 54 °C) durante minutos u horas, según los casos; para los restantes el calor se aplica mediante aire (35 a 42 °C). La termoterapia puede utilizarse combinada con el cultivo de meristemos, siendo a veces la única posibilidad de regenerar plantas libres de virus. En los casos en que no es imprescindible, permite aumentar el tamaño de los explantes mejorando la tasa de regeneración de plantas (Panta y Golmirzaie, 1997).

### **2.5.2 Electroterapia**

Wagele (1978), patentó las primeras experiencias sobre el uso de corriente eléctrica para influir en el crecimiento de células, tejidos, bacterias, animales, así como en sustancias nutritivas. Posteriormente, (Galliteli *et al.*, 1980), al aplicar corrientes eléctricas a estacas de almendros que mostraban síntomas de mosaicos producidos por virus, obtuvieron hasta un 90% de plantas sanas, por lo cual recomendaron estos tratamientos para el control de virus como: Virus del mosaico del pepino, *Arabia Mosaic Virus*, *Gravepine Franleaf Virus*, *Chicory Yellow Mottle* y Virus del

mosaico del tabaco. El Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INVIT) de Cuba, ha establecido que la aplicación con 15 volts durante cinco minutos se eliminan enfermedades virales del grupo de los Potivirus en ñame *Dioscorea* spp (Pérez *et al.*, 2005). Igarza *et al.*, (2001), evaluaron la electroterapia como una alternativa para saneamiento del virus en plantas de malanga *Colocasia esculenta* L. del clon México 8. Los tratamientos fueron 5, 10 y 20 Volts durante 5 minutos. El mejor tratamiento fue el de 5 V durante 5 min, logrando una desinfección del 100% de las plantas, siendo diferente significativamente a los demás tratamientos: además, este tratamiento aceleró el crecimiento del material vegetativo.

### **2.5.3 Cultivo de meristemas**

En el año 1934 White observó que un virus del tabaco se distribuía desigualmente a lo largo de la planta, Limasset y Cornuet (1949), propusieron que el meristemo podría estar libre del virus, ya que los meristemas no poseen tejido vascular lo que los mantiene parcialmente aislados del resto de la planta. Teniendo en cuenta que los virus y bacterias que son endopatógenos de las plantas se movilizan por los haces vasculares. Por esta razón se usa el cultivo *in vitro* de meristemas en la propagación de plantas, para que tengan mayor oportunidad de estar libres de patógenos (Sharry *et al.*, 2015). Morel y Martin (1952) cultivaron meristemas de dalias infestadas por virus y obtuvieron plantas libres de dichos virus. Côte *et al.*, (1999) mencionan que a través de esta técnica se producen plántulas asépticas, las cuales se originan de brotes axilares aislados del ápice vegetativo. El ápice se cultiva en un recipiente que contiene un medio nutritivo artificial, se mantiene bajo condiciones controladas y es inducido a producir brotes adventicios por eliminación de la dominancia apical y el uso adecuado de reguladores de crecimiento (Thorpe y Harry, 1997); en horticultura y fruticultura, se han dedicado muchos esfuerzos en este campo y hoy día es una técnica de aplicación rutinaria en varias especies de plantas cultivadas.

### **2.6. Determinación de biomasa**

La asimilación de materia seca y su distribución dentro de la planta, son procesos importantes que determinan la productividad de un cultivo. El estudio de los patrones de asignación de materia seca hacia las diferentes partes de la planta, la variabilidad de estos patrones entre

cultivares y el efecto de las condiciones ambientales en el proceso, pueden ayudar a maximizar la productividad y a seleccionar cultivares para un propósito particular (Tekalign y Hammes, 2005a).

El crecimiento se puede referir a un incremento irreversible de materia seca o volumen, cambios en tamaño, masa, forma o número, como una función del genotipo y el complejo ambiental, dando como resultado un aumento cuantitativo del tamaño y peso de la planta. El desarrollo es la composición de eventos que causan cambios cualitativos en forma y función de la planta y, por ende, en la formación del producto (Krug, 1997). Dada la íntima relación crecimiento-diferenciación que se pone de manifiesto en el proceso de desarrollo en las plantas, ambos no pueden separarse bajo ninguna circunstancia, ya que su interacción unido a factores externos e internos son los que propician (Ñústez *et al.*, 2009).

La acumulación de materia seca es comúnmente usada como parámetro para caracterizar el crecimiento, porque usualmente tiene un gran significado económico. La producción de asimilados por las hojas (fuente) y el punto hasta el cual pueden ser acumulados por el vertedero que representan los órganos que son cosechados, influencia significativamente el rendimiento de un cultivo (Tekalign y Hammes, 2005b). Un estudio del patrón de distribución de materia seca entre los órganos de la planta, es importante para la evaluación de la tasa de crecimiento, la productividad y el nivel de rendimiento de diferentes solanáceas (Nganga, 1982).

## **2.7. Estudios relacionados a la eliminación de enfermedades en tomate de árbol**

Existen diferentes estudios relacionados con la eliminación de enfermedades en tomate de árbol por métodos de propagación *in vitro* como el cultivo de meristemas, entre las investigaciones más destacadas se encuentran:

Guimaraes *et al.*, (1988) reportaron por primera vez éxito en la inducción de embriogénesis somática en el tomate de árbol, mediante el cultivo de embriones zigóticos maduros e hipocotilos de plántulas. En un posterior estudio, los mismos investigadores describieron la regeneración de

plantas de tomate de árbol mediante organogénesis y embriogénesis somática empleando diferentes clases de explantes.

En el año de 1993, Atkinson y Gardner obtuvieron plantas de tomate de árbol que fueron cultivadas a partir de semillas sexuales, desinfectando las semillas en hipoclorito de sodio al 1,5 % por 10 minutos y utilizando un medio basal que contenía: sales, MS (Murashige y Skoog, 1962), vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 30 g/l de sacarosa y 0,8% de agar (gelatina N Davis, Z.). Todos los medios se ajustaron a pH 6,2 con KOH (pH después de la esterilización en autoclave fue medido a 5,8) y en autoclave a 103 kPa durante 20 min. Las hormonas utilizadas en este estudio fueron BA (6-bencilaminopurina), IAA (indol-3-ácido acético), IBA (-3-indol butírico ácido), NAA (naftalenoacético ácido) y zeatina, las hormonas se añadieron en su caso a los medios antes de la esterilización en autoclave. La cefotaxima (Roussel), kanamicina monosulfato (Sigma) y acetosiringona (3', 5' dimetoxi-4'-hidroxiacetofenona; Aldrich) se esterilizaron con filtro y se añadió a los medios de cultivo después de la esterilización en autoclave.

Los mismos autores propagaron tomate de árbol por cultivo de tejidos vegetales en cámara de crecimiento a 24 °C bajo un fotoperíodo de 16 h (47 panolm-2s-1). Las plantas obtenidas fueron micropropagadas, colocando de los brotes (2-3 cm de longitud) en TR-1 medio (bm + IBA 1 mg L<sup>-1</sup>). El enraizamiento fue mayor al 80% después de 4-6 semanas. Las plantas fueron trasplantadas a mezcla de tierra comercial (una mezcla 1:1 de turba: piedra pómez, Western Viveros, Auckland) y colocadas en cámaras de crecimiento. Las plantas se aclimataron bajo cubiertas de plástico individuales durante al menos 10 días antes de la exposición gradual a condiciones de cámara de crecimiento (Atkinson y Gardner, 1993).

Cruz *et al.*, (1988), extrajeron embriones cigóticos, los cuales fueron se diseccionados a partir de semillas previamente remojadas durante 48 horas en agua estéril; se tomaron segmentos de hipocótilo (0,5 cm de largo) de 20 días de edad, una vez las plántulas germinaron fueron cultivadas asépticamente en la oscuridad, a 25 °C, en un medio basal MS. Callos embriogénicos fueron inducidos a partir de ambos tipos de explantes en MS basal, el medio suplementado con

2,4 - D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) . El pH de todos los medios se ajustó a 5,6 y agar Difco Bacto (0,8 % w / v) añadido antes de la esterilización en autoclave.

En estudios más recientes Almeida y Contreras (2003), cultivaron cotiledones e hipocotilos de plántulas germinadas *in vitro* en medio nutritivo básico de MS, añadiéndole (mg\*1-1): inositol 100, ácido nicotínico 0,5, glicina 2,0; tiamina 1,0, piridoxina 0,5; sacarosa 30000. Los inductores de la morfogénesis fueron: Bencil Adenina (BA) (2,0- 3,5 -5,0) + Ácido Indol Acético (AIA) (0,5-0,75-1,0) y Zeatina (Z) sola (1,0-2,0). Los cultivos fueron incubados a  $27 \pm 2$  ° C y luz continua (750 - 2.000 lux). Después de tres semanas, tanto los cotiledones como los hipocotilos mostraron pequeñas protuberancias las cuales se diferenciaron directamente como yemas en los medios que contenían BA 2,0 + AIA 0,5 y Z sola 2,0, de ambos tipos de explantes.

Espinosa *et al.*, (2005) evaluaron 10 medios de cultivo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de Tomate de árbol partenocárpico, los cuales contenían sales de MS, BAP de 0,17 a 5,82 mg/l, y AIA de 0,19 a 2,31 mg/l y una mezcla de tres sustancias antioxidantes: cisteína, ácido ascórbico y caseína hidrolizada (100 mg/l de cada una). Los explantes utilizados fueron esquejes de nudo de 1,5 a 2,0 cm de longitud. En este estudio se determinó el punto óptimo para la variable longitud de brotes con reguladores de crecimiento (0,17 mg/l de BAP y 0,19 mg/l de AIA), en el material proveniente del altiplano Norte de Antioquia, Colombia y en el material procedente del Oriente de Antioquia-Colombia, no se pudo determinar el punto óptimo.

Borrero, en el año 2007, menciona que la regeneración de retoños a partir de explantes provenientes de hojas es posible utilizando una combinación hormonal de la auxina ANA y la citoquinina BAP, estableció una concentración específica de la auxina ANA (0,07 pmm), sin embargo, no encontró una concentración específica para la hormona BAP; en el estudio las variedades utilizadas no respondieron de la misma manera, encontrándose mejor respuesta con los genotipos amarillo y negro.

Arhana *et al.*, (2010), estandarizaron un protocolo para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas, y la obtención de plantas viables de Tomate de árbol. La eficiencia de formación de

callos a partir de los protoplastos aislados fue baja con valores en promedio de 0,11%. Sin embargo, la regeneración de retoños a partir de los callos obtenida fue exitosa y se lograron valores de hasta el 68%. Los resultados de esta investigación demuestran que la regeneración de retoños a partir protoplastos en Tomate de árbol es eficaz.

El estudio realizado por Criollo *et al.*, (2016), evaluaron diferentes alternativas de micropropagación para determinar la opción más eficiente de multiplicación masiva de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) libres de enfermedades. Se evaluaron tres auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en diferentes dosis, concluyendo que el mejor medio de cultivo para la proliferación de brotes de tomate de árbol a partir de hipocotilos estuvo constituido por el medio básico MS suplementado con BAP (3 mg L<sup>-1</sup>) solo o con AIA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) y AIA (1,0 mg L<sup>-1</sup>), el fitorregulador AIA se comportó como 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 mg L<sup>-1</sup> y 1,0 mg L<sup>-1</sup>) mostraron altos porcentajes de enraizamiento en un medio MS con AG<sub>3</sub> (0,5 mg L<sup>-1</sup>) Finalmente. Las plantas de tomate de árbol regeneradas in vitro obtenidas a partir de hipocotilos, tuvieron altos porcentajes de supervivencia, obteniéndose plantas vigorosas bajo invernadero.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Localización**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales e 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 y 24 ° C, respectivamente.

#### **3.2 Selección de frutos**

Los frutos fueron colectados en una finca productora de tomate de árbol ubicada en el municipio de Samaniego (Nariño) a una altitud de 2350 msnm y una temperatura entre 18°C y 21°C; se seleccionaron frutos fisiológicamente maduros del genotipo conocido como “manzano”.

##### **3.2.1 Obtención, desinfección y siembra de la semilla**

La semilla de tomate de árbol, *S. betaceum* Cav., se obtuvo a partir de frutos en estado de madurez, completamente rojos, seleccionados de un mismo árbol, los cuales se dejaron en reposo por dos días. Posteriormente, se realizó la extracción de las semillas de forma manual, se dejaron fermentar por dos días y se lavaron con abundante agua, se secaron a la sombra por tres días y finalmente se almacenaron en un ambiente controlado (2-4 °C) en recipientes herméticos hasta el inicio de los ensayos.

La desinfección de las semillas para la siembra in vitro se realizó según la metodología utilizada por Criollo *et al.*; (2016), mediante la inmersión en yodo al 5% durante 10 minutos seguido de tres lavados con agua estéril, inmersión en hipoclorito de sodio al 1,5% durante 15 minutos y lavado por cinco veces con agua estéril. La siembra se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 125ml, bajo condiciones de cámara de flujo laminar colocando veinticinco semillas por frasco, conteniendo 20 ml de medio de cultivo 1/2 MS.

### **3.3. Evaluación de terapias utilizadas en semillas de tomate de árbol**

Para cada tratamiento evaluado se utilizaron 100 semillas distribuidas en cuatro repeticiones de 25 semillas cada una, colocadas en frascos de vidrio. Las semillas una vez fueron sometidas a termoterapia, electroterapia y el testigo se colocaron a germinar en medio de cultivo 1/2 MS (20 ml por frasco) en la zona de incubación del laboratorio de tejidos; una vez las semillas emitieron radícula se estimó su porcentaje de germinación.

La unidad experimental en todos los tratamientos evaluados consistió en un frasco con 25 semillas con cuatro repeticiones.

#### **3.3.1 Termoterapia en semillas**

La evaluación de termoterapia se adaptó de acuerdo al protocolo de Hernández y Mancipe (1995) y los rangos de temperatura evaluados se adaptaron teniendo en cuenta el estudio de Auld y Ooi, (2009).

Se trabajó con base en un diseño trifactorial (3 x 5 x 2) + 1 conformado por los siguientes factores y niveles:

- Temperatura del ensayo: 48, 68 y 88 °C.
- Tiempo de duración del tratamiento térmico: 12, 24, 36, 48 y 72 horas.
- Condiciones del tratamiento térmico: en húmedo y en seco.
- Testigo: semillas sin tratamiento térmico

El factor temperatura en sus tres niveles se aplicó mediante una incubadora de secamiento. En el caso del factor condiciones del tratamiento térmico en húmedo, las semillas se empacaron en papel filtro el cual se humedeció antes de proceder a la aplicación de los tratamientos, la humedad fue monitoreada dos veces al día observando el grado de humedad del papel y aplicando agua estéril cuando fue necesario.

### 3.3.2 Electroterapia en semillas

Para la aplicación de este método se siguió el protocolo de Hernandez *et al.*, (1997). Las semillas sometidas a electroterapia se trabajaron con base en un diseño bifactorial (4 x 3) + 1 conformado por los siguientes factores y niveles:

- Voltaje: 2, 5, 10 y 15 Voltios
- Tiempo de duración de los tratamientos: 5, 10 y 15 minutos
- Testigo: semillas sin ningún tratamiento

Para el factor voltaje las semillas se colocaron en un frasco de vidrio conteniendo agua estéril más sal al 1% y se sometieron a corriente eléctrica mediante una fuente de voltaje lineal continua (Figura 2). Una vez tratadas las semillas se desinfectaron y sembraron en medio de cultivo MS bajo condiciones de cámara de flujo laminar.



**Figura 2.** Tratamiento de electroterapia en semillas de tomate de árbol *S. betaceum*. Fotografías: Melo, E. (2016).

### 3.4. Terapias en explantes de tomate de árbol

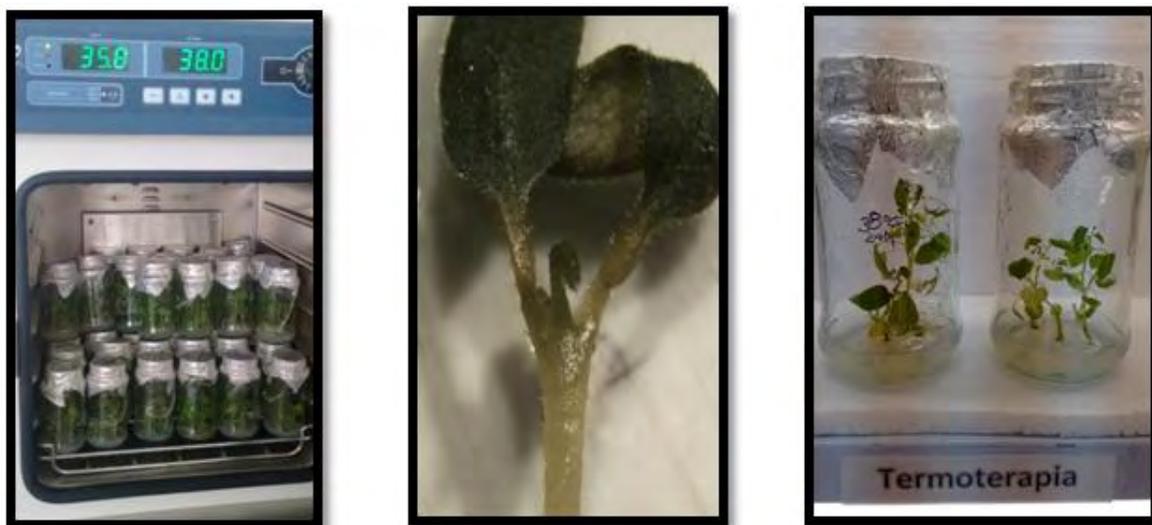
Los explantes para las diferentes pruebas se obtuvieron a partir de plantas propagadas in vitro provenientes de semillas obtenidas y tratadas según el procedimiento descrito en el numeral 3.2.1., una vez se aplicaron los tratamientos se cortaron los nudos y se sembraron en medio de cultivo MS.

#### 3.4.1 Termoterapia en explantes

Cuando las plántulas propagadas in vitro presentaron entre 10 y 15 cm de altura fueron sometidas a cinco diferentes temperaturas y cuatro tiempos de duración por tratamiento manteniendo las plantas dentro de los frascos, utilizando para ello una incubadora de secamiento (Figura 3) adaptando el protocolo de Hernández y Mancipe (1995). Una vez finalizado el tratamiento térmico se extrajeron las plantas de los frascos, se eliminaron las hojas, se cortaron los nudos y se sembraron en medio de cultivo MS siguiendo la metodología adaptada por Criollo *et al.*, (2016).

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño bifactorial (5 x 4) + 1 con cuatro repeticiones conformadas por envases de vidrio que contenían cuatro explantes; los factores analizados y sus niveles correspondientes fueron:

- Temperaturas evaluadas: 30, 35, 38, 40 y 50 °C.
- Tiempo de duración del tratamiento: 12, 24, 48 y 96 horas.
- Testigo: explantes sin tratamiento



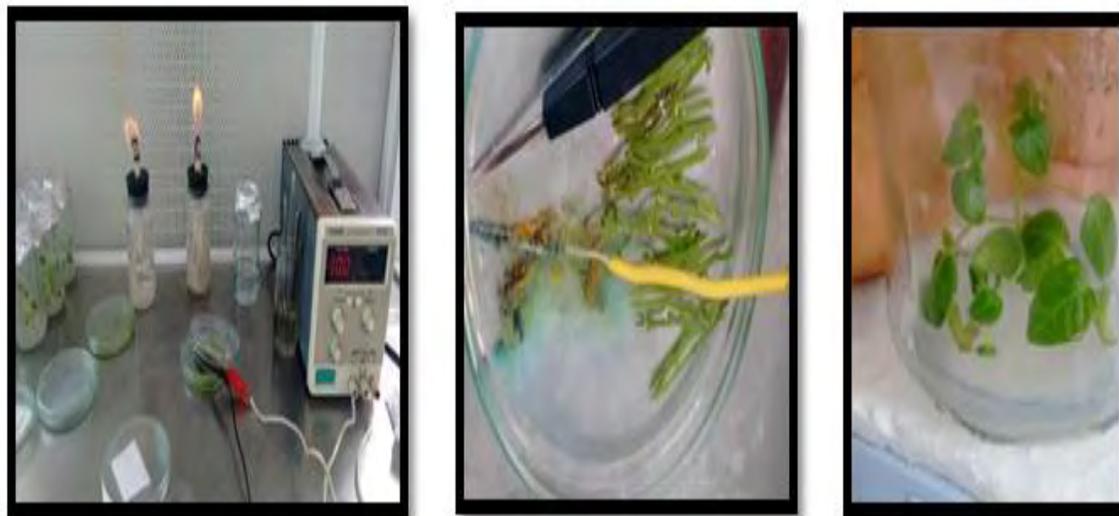
**Figura 3.** Tratamiento de termoterapia en plantas de tomate de árbol *S. betaceum*. Fotografías: Melo, E. (2016).

### 3.4.2 Electroterapia en explantes

Para evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre el material de propagación se utilizó una fuente de voltaje continúa, para ello se extrajeron los tallos de las plantas propagadas in vitro y se colocaron en una caja petri con agua y sal al 1% aplicando la corriente eléctrica directamente a la solución; una vez realizado el tratamiento se lavaron los tallos con agua estéril, se cortaron y sembraron los nudos en el medio de cultivo MS (Figura 4).

Los explantes sometidos a electroterapia se trabajaron con base en un diseño bifactorial (3 x 3) + 1 con cuatro repeticiones conformadas por frascos que contenían cuatro segmentos nodales; los factores analizados y sus niveles correspondientes fueron:

- Voltaje: 2, 5 y 10 Voltios
- Tiempo de duración del tratamiento: 5, 10 y 15 minutos
- Testigo: explantes sin voltaje



**Figura 4.** Tratamiento de electroterapia en tallos de tomate de árbol *S. betaceum*. Fotografías: Melo, E. (2016).

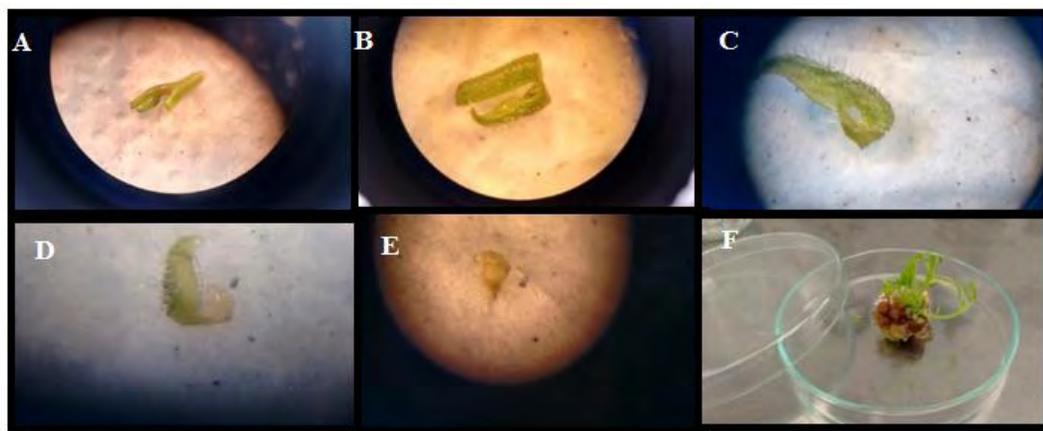
### 3.5. Propagación por meristemas

Para la propagación de meristemas se siguió la metodología establecida por Cerda *et al.*, (2014). Los meristemas se extrajeron de las plantas obtenidas *in vitro* (numeral 3.4), con la ayuda un estereoscopio, agujas hipodérmicas y bisturí. El tamaño de los meristemas fue menor a 0,5 mm (Figura 5), los cuales una vez extraídos, fueron sembrados en el medio de cultivo MS (20 ml por frasco) suplementado con diferentes concentraciones de hormonas (Tabla 1); una vez emergieron los brotes y alcanzaron una altura de 5 cm aproximadamente fue evaluado el porcentaje de regeneración de las plantas.

La unidad experimental correspondió a un frasco en el cual se sembraron cuatro meristemas con 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 240 unidades experimentales. Para el análisis estadístico se utilizó el diseño irrestrictamente al azar (DIA), en el cual se evaluaron 6 tratamientos (Tabla 1) con 10 repeticiones para cada uno de ellos.

Tabla 1. Fitoregularores y concentraciones utilizados para la siembra de meristemos en medio de cultivo MS.

TRATAMIENTO	MEDIO	HORMONA	CONCENTRACIÓN (mg/l)
T1	MS	AIA	0.5
		BAP	1.5
		AG3	1
T2	MS	AIA	1
		BAP	1.5
		AG3	1
T3	MS	BAP	3
		NAA	0.5
T4	MS	CINETINA	0.004
		AIA	0.5
		AG3	0.1
T5	MS	BAP	1
T6	MS	AIA	1
		BAP	3



**Figura 5.** Extracción del meristemo en tomate de árbol, crecimiento y desarrollo del callo y brotes en medio de cultivo MS. (A, B, C, D, E) extracción del meristemo, (F) brote desarrollado listo para siembra a medio de cultivo MS. Fotografías: Melo, E. (2016).

Los brotes obtenidos en laboratorio después de los tratamientos se cortaron y sembraron en medio básico MS (1962), suplementado con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>); una vez obtenidas las plantas se llevaron a endurecimiento bajo condiciones de invernadero.

### 3.6. Fase de aclimatación

De las plantas obtenidas después de aplicados cada uno de los tratamientos (Termoterapia, electroterapia y meristemas) y el testigo, se tomaron 16 plantas al azar por tratamiento, las plantas fueron extraídas del medio de cultivo, se removió el agar de las raíces y se pasaron a bandejas plásticas de 50 alveolos y se sembraron bajo condiciones de invernadero utilizando turba como sustrato (Figura 6), este proceso se realizó según los protocolos establecidos para tomate de árbol por Criollo *et al.*, (2016).



**Figura 6.** Fase de endurecimiento en invernadero: (A) planta de 21 días después de la siembra en medio MS (B) trasplante a turba en bandeja de 50 alveolos (C) plantas de nueve días después del trasplante (D) micro túnel de policarbonato (E) Plantas 28 días después del trasplante. Fotografías: Melo, E. (2016).

Esta prueba permitió evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas y el vigor a través de la biomasa. La unidad experimental correspondió a un alveolo en el cual se sembró una planta con cuatro repeticiones por tratamiento, para un total de 64 unidades experimentales.

Para el análisis estadístico se utilizó el diseño irrestrictamente al azar (DIA), en el cual se evaluaron tres tratamientos y el testigo (Tabla 1) con cuatro repeticiones para cada uno. Los tratamientos correspondieron a:

- Plantas sometidas a termoterapia
- Plantas sometidas a electroterapia
- Plantas obtenidas a partir de meristemas
- Testigo: plantas obtenidas sin tratamiento alguno

### 3.7. Variables evaluadas

#### 3.7.1. Porcentaje de germinación de semillas

Para determinar el potencial de germinación de las semillas, se realizaron pruebas de germinación in vitro donde se utilizaron dos cajas Petri por tratamiento (termoterapia, electroterapia y testigo) que contenían medio de cultivo ½ MS, en cada una de ellas se sembraron 50 semillas divididas en dos grupos de 25 semillas; cada tratamiento correspondió a 100 semillas distribuidas en dos cajas. Se hizo un seguimiento diario de las semillas desde la siembra hasta el día de aparición de la radícula, se consideró como semilla germinada aquella que emitió radícula y el par de hojas cotiledonares en estado normal. El porcentaje de germinación se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula propuesta por las Reglas Internacionales para ensayos de semillas (1977).

$$\% \text{ germinación} = \frac{(\text{semillas germinadas})}{(\text{semillas evaluadas})} \times 100$$

#### 3.7.2. Porcentaje de supervivencia de los explantes

Los explantes sometidos a los tratamientos de electroterapia, termoterapia y propagación por meristemas se sembraron en medio de cultivo según el tratamiento para cada caso, una vez sembrados e iniciada la emisión de las nuevas plantas se realizó el conteo. Se contaron como

plántulas las estructuras que desarrollaron raíces y hojas, hasta los 25 días después de la siembra, tiempo en el cual se calculó el porcentaje de supervivencia y regeneración de las plantas.

El porcentaje de regeneración de los explantes se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula propuesta por las Reglas Internacionales para ensayos de semillas (1977), adaptada para el presente trabajo de investigación.

$$\% \text{ de Supervivencia} = \frac{\text{explantes regenerados}}{\text{explantes evaluados}} \times 100$$

### **3.7.3 Porcentaje de sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatación**

Las plántulas obtenidas en laboratorio después de los tratamientos, se sembraron en bandejas de germinación con turba canadiense y se colocaron en condiciones de invernadero con reducción del 40% de luminosidad, 25°C y más del 80% de humedad relativa; 28 días después se procedió a evaluar el porcentaje de sobrevivencia durante la fase de aclimatación con base en el número de plántulas vivas en sustrato/ plántulas transferidas.

### **3.7.4. Biomasa**

Una vez terminada la fase de aclimatación, 28 días después del trasplante se tomaron las plantas y se sometieron a desecación en un horno a una temperatura de 70 °C por 24 horas con el objetivo de conocer el peso seco.

## **3.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza según los modelos correspondientes al diseño propuesto y pruebas de significancia de Tukey al 95% en aquellas variables que presentaron diferencias estadísticas significativas.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Efecto de la termoterapia sobre el porcentaje de germinación de semillas

Las diferentes temperaturas a que se sometieron las semillas, durante periodos de tiempo progresivos y bajo condición húmeda y en seco, mostraron respuestas significativas en la germinación, de igual manera se observó diferencias significativas para todas las interacciones (Tabla 2), determinando de esta forma que los tratamientos aplicados tienen influencia en los diferentes tratamientos aplicados.

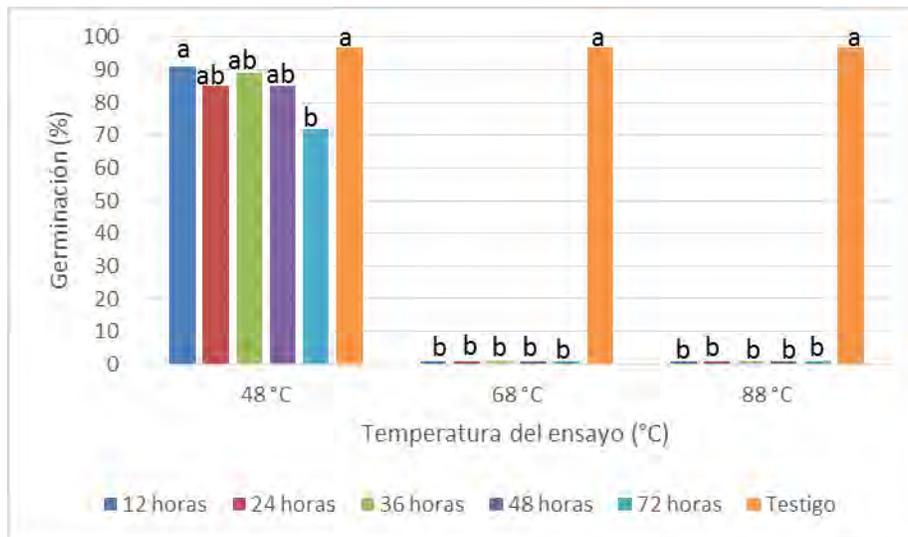
Al respecto García *et al.*, (2006), definen la germinación como el proceso principal de recuperación de la actividad biológica de la semilla; para que tenga lugar, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: disponibilidad de agua, suficiente oxígeno que permita la respiración aerobia y temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y desarrollo de la plántula.

**Tabla 2.** Análisis de varianza para la variable germinación de semillas de tomate de árbol (%) con tratamientos térmicos, duración del tratamiento y condición de humedad de la semilla durante el tratamiento.

F. VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Rep	3	133,80	44,60 <sup>ns</sup>	2,37	0,0767
Temp	3	159037,42	53012,47**	2815,38	<.0001
Temp*rep	9	102,99	11,44 <sup>ns</sup>	0,61	0,7870
Humed	1	28954,13	28954,13**	1537,69	<.0001
Temp*hum	2	52148,26	26074,13**	1384,74	<.0001
Tiempo	4	537,66	134,42**	7,14	<.0001
Temp*tiempo	8	615,33	76,92*	4,98	0.004
Humedad*tiempo	4	114,2	28,55 <sup>ns</sup>	1,52	0.2052
Tem*hum*tiem	8	376,40	47,05*	2,50	0,0177
Error	81	1525,20	18,83	306,03	
Total	123	243545,41			

\*Diferencia significativa al 95%; \*\* diferencia altamente significativa al 95%; ns: no significativo.

La interacción temperatura por tiempo por condición húmeda permitió observar un comportamiento diferencial entre los diferentes niveles de los tres factores; con el tratamiento de 48°C y condición húmeda se observaron diferencias significativas entre el tratamiento sometido a 72 horas que presentó el 72 % de germinación y el tiempo de 12 horas y el testigo que presentaron una germinación del 91% y 97% respectivamente (Figura 7).; resultados similares a los de esta investigación fueron reportadas por Fichino *et al.*, (2012) en semillas de Pasto *Syngonanthus nitens*, que fueron sometidas a varias temperaturas (60°, 100 °C, 150 °C y 200 °C ) en diferentes tiempos (1, 3 y 5 minutos) encontrando que las mayores tasas de germinación (>85%) se presentaron a temperaturas menores a 100 °C.

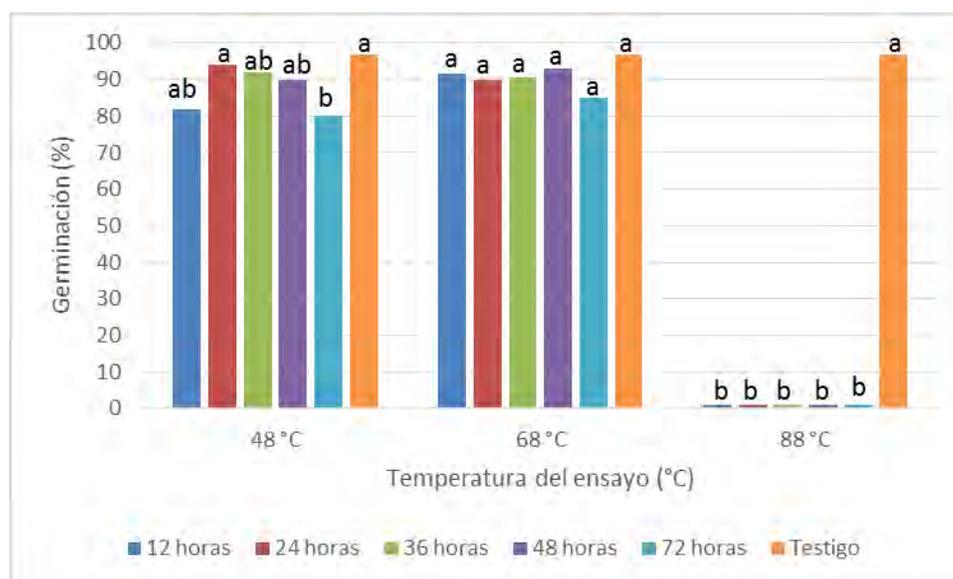


**Figura 7.** Comportamiento de la germinación de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes temperaturas durante 48°C, 68°C, y 88°C bajo condición húmeda.

Por otra parte, los tratamientos en condición húmeda sometidos a temperaturas de 68°C y 88°C en los diferentes tiempos (12, 24, 36, 48 y 72 horas respectivamente), presentaron una germinación del 0% y por tanto diferencias significativas frente al testigo que presentó el 97% de germinación (Figura 7). Matilla (2003) menciona que cada especie tiene una condición de temperatura diferente para germinar, pero que temperaturas altas, como en el caso de esta investigación que superaron los 68 °C provocan la muerte del embrión y como resultado la germinación es nula.

Resultados similares fueron encontrados por Auld y Ooi, (2009) quienes sometieron semillas de cinco especies de *Darwinia* sp., a varios rangos de temperatura (40-120°C) encontrando que las semillas que fueron sometidas por encima de 80°C, no germinaron, al igual que las semillas de tomate que en esta investigación fueron sometidas a 88°C y en las cuales tampoco se observó germinación.

Una de las condiciones para la germinación óptima de las semillas, como es el caso de las semillas de tomate de árbol, mencionada por Baskin y Baskin (2001) es la temperatura, es así como en la figura 8, se observa que las semillas sometidas a 48°C y condición seca durante 24 horas, mostraron una germinación del 94% con diferencias significativas en relación con el tratamiento de 72 horas que presentó el 80% de germinación.



**Figura 8.** Comportamiento de la germinación de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes temperaturas durante 48°C, 68°C, y 88°C bajo condiciones secas.

Los tratamientos en condiciones secas con una temperatura de 88°C y diferentes tiempos (12, 24, 36, 48 y 72 horas), presentaron el 0% de germinación, con diferencias significativas al compararse con el testigo que presentó una germinación del 97%, 24 días después de la siembra.

El alto porcentaje de germinaciones obtenido con estos tratamientos, permite inferir que las semillas de tomate de árbol obtenidas para el ensayo presentaron condiciones de alto potencial germinativo; en un rango óptimo de: 28-68°C en condiciones secas, con tiempos de duración de

12 a 48 horas. Se considera que la calidad de la semilla depende fuertemente de las condiciones ambientales que prevalecen durante la formación de la misma, de la cosecha y el almacenamiento, ya que en estas etapas sufren daños fisiológicos y genéticos que interactúan en forma compleja y dinámica en el tiempo, afectando la capacidad de la semilla para germinar (Herrera *et al.*, 2006 y Russo *et al.*, 2010).

El alto porcentaje de germinación obtenido con determinados tratamientos térmicos probablemente esté influenciado por las condiciones brindadas a las semillas durante y después de la cosecha. Russo *et al.*, (2010), asegura que la germinación está influenciada tanto por factores internos como externos; dentro de los factores internos esta la viabilidad del embrión, la cantidad y la calidad del tejido de reserva de la semilla y en los factores externos encontramos la humedad relativa, la luz, la temperatura y el aire (Herrera *et al.*, 2006).

#### **4.2 Efecto de la Electroterapia sobre el porcentaje de germinación de semillas**

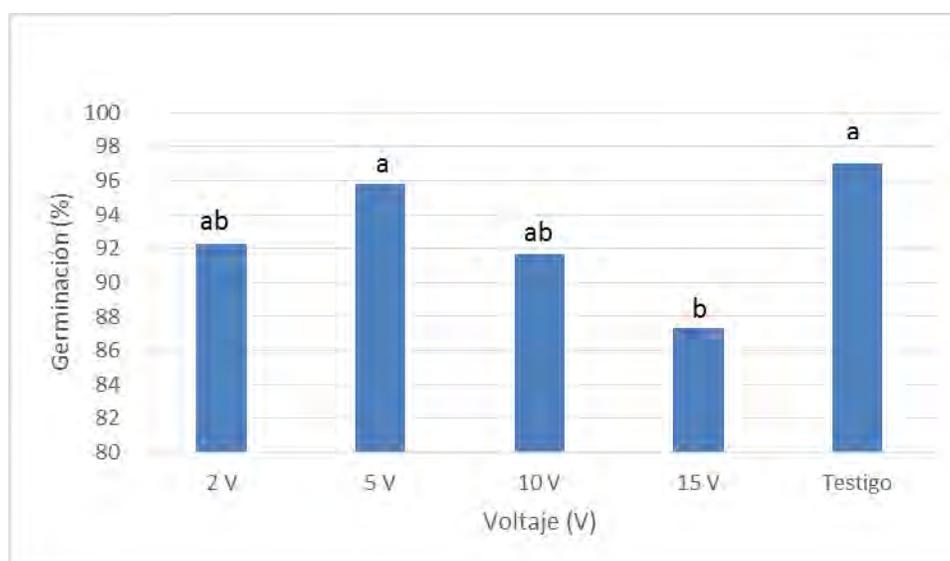
En la Tabla 3 se puede observar que las semillas sometidas a diferentes niveles de electricidad durante periodos de tiempo progresivos, presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto porcentaje de germinación, para el factor voltaje; sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas para el factor tiempo y la interacción voltaje por tiempo.

El factor voltaje presentó diferencias estadísticas significativas cuando se aplicó a las semillas: el tratamiento 15 V presentó un porcentaje de germinación del 87,3% frente a los tratamientos 5 V y el testigo quienes alcanzaron porcentajes de germinación del 95,8 y 97% respectivamente (Figura 9). Wahab *et al.*, (1980) mencionan que tratamientos con corriente eléctrica inician cambios fisiológicos y bioquímicos que se reflejan en los procesos de crecimiento y desarrollo en plantas, y que en algunos casos pueden tener efectos en la eliminación de enfermedades causadas por virus.

**Tabla 3.** Análisis de varianza para la variable germinación de semillas de tomate de árbol (%) con tratamientos eléctricos (V) y diferentes tiempos de duración del tratamiento.

F. VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	Pr>F
<b>Rep.</b>	3	220,54	73,51 <sup>ns</sup>	1,32	0,2848
<b>Vol.</b>	4	662,96	165,74 <sup>*</sup>	2,97	0,0328
<b>Tiemp.</b>	2	56,63	28,32 <sup>ns</sup>	0,51	0,6068
<b>Vol*tiem</b>	6	405,17	67,53 <sup>ns</sup>	1,21	0,3251
<b>Error</b>	35	1955,49	55,87		
<b>Total</b>	50	3300,79			

\*Diferencia significativa al 95%; ns: no significativo.



**Figura 9.** Porcentaje de germinación in vitro de semillas de tomate de árbol sometidas a diferentes voltajes (2, 5, 10, 15V).

La aplicación de la electroterapia en semillas con el objetivo de eliminar o disminuir los problemas presentados por algunos patógenos requiere conocer los niveles de voltaje y los tiempos críticos de tolerancia que puedan tener las semillas ante diferentes tratamientos, con el fin de establecer esos rangos y aplicar terapias que no afecten la calidad de las mismas. Conocer el efecto de la electroterapia sobre la germinación de la semilla es fundamental en el momento de establecer protocolos que permitan una adecuada germinación de estas semillas; procedimiento que podría ser utilizado con éxito en la obtención de plantas a gran escala para prevenir o tratar

enfermedades transmitidas por semillas (Hormozi-Nejad *et al.*, 2010; Bera *et al.*, 2006 e Igarza *et al.*, 2001).

Los resultados de esta investigación demuestran que voltajes de 2, 5 y 10 V aplicados hasta por 15 minutos a semillas de tomate de árbol, no causaron alteraciones en los porcentajes de germinación (92,3%, 95,8%, y 91,7% respectivamente), al ser comparados con el testigo (97%); Estos datos coinciden con los reportados por Lutkova y Oleshko, (1972) quienes estudiaron el efecto del estímulo eléctrico en la semilla midiendo: la viabilidad, el vigor, la germinación y el crecimiento de plántulas de manzana *Malus domestica*, encontrando resultados positivos en las variables estudiadas, demostrando que este tratamiento puede resultar efectivo para mejorar estos aspectos (Bera *et al.*, 2007). La técnica de electroterapia podría ser utilizada con éxito como terapia para la producción de plantas de tomate de árbol, gracias a que el tratamiento no presenta efectos negativos en la germinación de las semillas.

El alto porcentaje de germinación de los tratamientos es corroborado igualmente por Bera *et al.*, (2006), quienes demuestran que la electroterapia aplicada a las semillas puede mejorar la germinación y el rendimiento de los cultivos; estos autores realizaron pruebas de germinación con semillas de cucurbitáceas sin tratamiento y otras sometidas a campos eléctricos de 2 a 16 kV/cm, con tiempos de exposición de 1 a 30 s, obteniendo un 30% y 99% de germinación respectivamente.

Las semillas sometidas a 15 V disminuyeron el porcentaje de germinación (87,3%) con respecto a los otros tratamientos; al respecto, Kalinin *et al.*, (2005), Tarek (2005) y Chen *et al.*, (2006) encontraron que semillas sometidas a una exposición excesiva con altos voltajes puede ocasionar daños irreversibles causando la muerte del embrión.

### **4.3. Efecto de la termoterapia sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes**

Los esquejes producidos *in vitro* y sometidos a diferentes temperaturas durante periodos de tiempo progresivos, mostraron respuestas en la supervivencia tanto en el factor temperatura como en la duración del tratamiento térmico y en la interacción temperatura por tiempo (Tabla 4). La

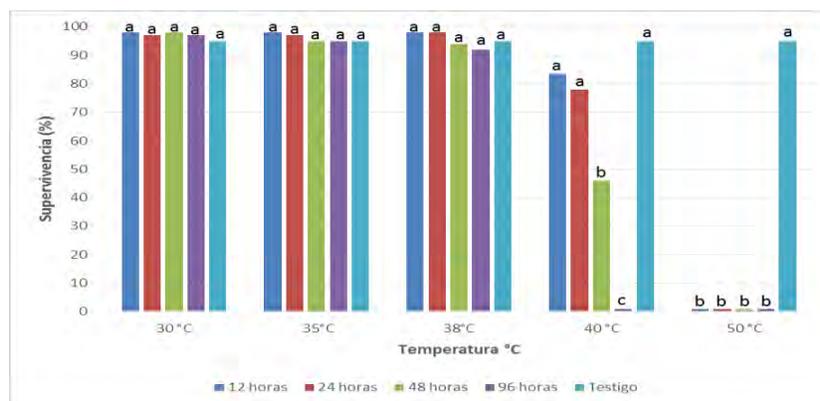
interacción temperatura por tiempo permitió observar el comportamiento entre las diferentes temperaturas y los tiempos del tratamiento. Los explantes sometidos a temperaturas de 30°C, 35°C y 38°C a diferentes tiempos del calentamiento no afectaron la supervivencia.

**Tabla 4.** Análisis de varianza para la variable supervivencia de ex plantes de tomate de árbol (%) con tratamientos térmicos y duración del tratamiento.

F. VARIACIÓN	GL	SC	CM	FC	Pr>F
<b>Rep</b>	3	6,24	2,08 <sup>ns</sup>	0,17	0,9173
<b>Temp</b>	5	119664,25	23932,85 <sup>**</sup>	1938,51	<,0001
<b>Tiempo</b>	3	4388,95	1462,98 <sup>**</sup>	118,50	<,0001
<b>Temp*tiemp</b>	12	13382,80	1115,23 <sup>**</sup>	90,33	<,0001
<b>Error</b>	60	740,76	12,35		
<b>Total</b>	83	138183			

\*\* Diferencia estadística significativa al 99%; ns: no significativo

Cuando las plantas se sometieron a una temperatura de 40°C se observó que la supervivencia no presentó diferencias entre 12 (83,5%) y 24 horas (78,0%) de tratamiento (Figura 10); sin embargo, mostraron diferencias estadísticas con los tratamientos realizados durante 48 y 96 horas con un bajo porcentaje de supervivencia (46% y 0,0%, respectivamente); de igual forma el tratamiento a 50 °C presentó un 0% de supervivencia para todos los periodos de tiempo utilizados. Solo aquellos tratamientos sometidos a 40°C por 48 horas y 96 horas (46%), 50 °C por 12, 24, 48 y 96 °C (0%), presentaron diferencias estadísticas con la supervivencia del testigo, sin tratamiento térmico (95%).



**Figura 10.** Comportamiento de la supervivencia de los ex plantes de tomate de árbol in vitro sometidos a diferentes temperaturas por cuatro periodos de tiempo.

La determinación de temperaturas críticas de supervivencia de los tejidos es indispensable para definir protocolos seguros para ser aplicados en tratamientos de termoterapia a los esquejes, sin riesgo de perder su viabilidad. Según lo manifiesta Ibáñez (2004) es importante determinar estos aspectos ya que el mejor tratamiento de termoterapia será aquel que permita la mayor inmovilización de un patógeno sin afectar el desarrollo normal de brotes; además, la duración del tratamiento térmico depende del tipo de patógeno, de la especie y de la variedad vegetal (Refatti *et al.*, 1999); la temperatura y el tiempo de exposición están determinados por el tejido a tratar y el patógeno a eliminar.

En esta investigación se utilizaron temperaturas constantes (30, 35, 38, 40 y 50 °C), por periodos de tiempo cortos (12, 24, 48 y 96 horas); de acuerdo con Tan *et al.*, (2010), este tipo de tratamientos influye mucho en el crecimiento de las plantas y disminuye significativamente la tasa de supervivencia de la planta a medida que se incrementa el tiempo de duración del ensayo; este autor al aplicar temperaturas de 37 °C a plantas cultivadas in vitro de pera durante 50 días obtuvo un bajo porcentaje de regeneración de las plantas.

De igual manera, tratamientos de calor fueron aplicados por Monette (1986) en plantas de vid para eliminar los virus del entrenudo corto infeccioso y el virus del Mosaico de arabis con un tratamiento de termoterapia in vitro durante 40 días alternando diariamente temperaturas de 39°C durante 6 horas y 22°C durante 18 horas. Ramírez *et al.*, (2006), aplicaron tratamientos secuenciales a 32°C durante una semana, 36°C durante 2 semanas y 38°C durante 3 semanas, afectando la sobrevivencia de los explantes de ajo, con porcentajes de supervivencia de los explantes del 36,5 %, logrando entre 63% y 70,9% de los explantes libres de potyvirus.

La termoterapia se utiliza rutinariamente para la eliminación de patógenos en cebolla, ajo, puerro y otras liliáceas comerciales (Conci y Nome, 1991), fresa (Converse y Tanne, 1984), yuca (CIAT, 1982), pera (Postman, 1994), y en papa y camote (Golmirzaie *et ál.*, 1994).

Los periodos cortos en los cuales se utilizó tratamiento térmico de las plantas no afectaron su supervivencia; no obstante, al incrementar la temperatura y el tiempo, las plantas no sobrevivieron; según Díaz y Chaparro (2012), para el saneamiento vegetal se utiliza

fundamentalmente, tratamientos con calor a los tejidos infectados lo cual altera la síntesis viral y retarda la translocación del agente viral en la planta. Tan *et al.*, (2010) verificaron que el virus ACLSV podría eliminarse de la pera por un período de tratamiento térmico 5 días más corto que el de la erradicación de ASGV y ASPV, por otra parte Conci (2004), afirma que la termoterapia por sí solo no garantiza el saneamiento total de las plantas, mantener las plantas enfermas por períodos prolongados en termoterapia disminuye la concentración de virus, pero al llevar las plantas nuevamente a condiciones normales, en poco tiempo recuperan la concentración original; por tanto, una práctica muy usada es la combinación de la termoterapia y el cultivo de meristemos.

Los resultados de esta investigación permiten confirmar el efecto de las diferentes temperaturas evaluadas en diferentes periodos de tiempo sobre el porcentaje de supervivencia de las plantas; para el control de patógenos de tipo sistémico podría suponerse que cuanto más largo es el tratamiento de calor, este resulta más efectivo; sin embargo, no siempre es así. En algunas especies como el crisantemo y en ajo se conoce que tratamientos de 10-30 días pueden ser efectivos para la liberación de algunos virus; en cambio, tratamientos más prolongados no siempre producen mayor porcentaje de plantas sanas. Estos tratamientos prolongados, por otra parte, dificultan la implantación *in vitro* del tejido, lo cual se traduce en un número más reducido de plantas obtenidas (Conci, 2004).

#### **4.4. Efecto de la electroterapia sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes**

Los esquejes producidos *in vitro* y sometidos a diferentes niveles de electricidad durante periodos de tiempo progresivos no mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, tanto en el factor voltaje como en la duración del tratamiento y la interacción voltaje por tiempo (Tabla 5).

La interacción voltaje por tiempo no presentó diferencias estadísticas significativas, los diferentes niveles de electricidad (2 V, 5 V, y 10 V), y diferentes tiempos de tratamiento (5 min, 10 min y 15 min), aplicados directamente a los esquejes no afectaron la supervivencia de los explantes. El porcentaje de supervivencia mínimo fue del 93% y el máximo del 96%, el testigo presentó un porcentaje de supervivencia del 95%.

**Tabla 5.** Análisis de varianza para la variable supervivencia de explantes de tomate de árbol (%), con tratamientos eléctricos y duración del tratamiento.

<b>F. VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;F</b>
Rep	3	7,60	2,53 <sup>ns</sup>	0,25	0,86
Vol	3	8,40	2,80 <sup>ns</sup>	0,28	0,84
Tiemp	2	18,67	9,33 <sup>ns</sup>	0,94	0,40
Vol*tiem	4	13,33	3,33 <sup>ns</sup>	0,34	0,85
Error	27	268,4	9,94 <sup>ns</sup>		
Total	39	316,4			

ns: no significativo

Sabry *et al.* (2009), señala que determinar los voltajes críticos de supervivencia de los tejidos permitirá definir protocolos seguros para ser aplicados en tratamientos de electroterapia a las plántulas *in vitro*, sin riesgo de perder su viabilidad. El éxito de la electroterapia como técnica para la producción de plantas libres de patógenos depende de la tasa de multiplicación de las plantas y el desarrollo de las mismas; por lo general, este indicador depende de varios factores, incluido el genotipo, el estado fisiológico del explante, el medio de cultivo, las condiciones de cultivo y las interacciones entre estos factores

Los altos porcentajes de supervivencia observados para los tratamientos evaluados, ratifican lo expresado por Aguilar (2001), cuando indica que el tratamiento de electroterapia puede estimular el desarrollo de las plantas gracias a que las membranas celulares tienen propiedades de resistencia eléctrica y capacitancia, lo que les permite mantener el voltaje (potencial de membrana) y regular el flujo de corriente a través de ellas. La influencia fisiológica del crecimiento de las plantas en el entorno de un campo eléctrico prevalece en todo momento y en todas partes; esta comunicación muestra que altos campos eléctricos tienen un efecto definitivo en el crecimiento vegetal y la respuesta de crecimiento (Murr, 1965).

De la misma manera se han encontrado respuestas positivas de la electroterapia para la estimulación del crecimiento meristemas apicales, segmentos nodales y brotes de tubérculos en plantas de papa que fueron expuestas a intensidades de corriente eléctrica de 5-25 mA durante un período de tiempo de 5 y 25 minutos cultivados en medio MS. El porcentaje de sobrevivencia

fluctuó entre el 78,47% y el 92,35%, resultados similares a los encontrados en esta investigación (Singh y Kaur, 2016). Águila *et al.*, (2004), reportan porcentajes de regeneración de las plantas de 42,5% al 78% dependiendo del tratamiento eléctrico y de la variedad; estos autores destacan además que la electroterapia aceleró el crecimiento del material vegetal. El material tratado sufre menos daño, las plantas obtenidas *in vitro* logran tener mayor tamaño y peso, además de eliminar algunos virus y viroides.

Lozoya *et al.*, (1996), trabajaron con tallos de papa infectado con PVX, aplicaron diferentes intensidades de corriente eléctrica a los explantes, encontraron que la regeneración más alta fue en aquellos que se colocaron por cinco minutos a 15 mA. Resultados similares fueron encontrados por Hormozi-Nejad *et al.*, (2010) en frijol cuando los explantes nodales fueron sometidos a una corriente eléctrica de 15 mA por diez minutos. Pérez, *et al.*, (2005) determinaron que los tratamientos de 30 V por 5 minutos no afectan la regeneración de las plantas pero a 60 V produce la muerte de las plantas en yuca. Se asume que existe un límite de sobrevivencia que no debe ser sobrepasado ni utilizado para el saneamiento para cada cultivo

#### **4.5 Propagación por meristemos**

La regeneración de meristemos *in vitro* bajo las diferentes concentraciones hormonales presentó diferencias estadísticas significativas (Tabla 6). Según Megías *et al.*, (2016) las células meristemáticas presentan las características citológicas de células indiferenciadas, lo que hace que sean idóneas para realizar cultivos de meristemos, el cual puede utilizarse solo o combinado con la termoterapia o electroterapia para el saneamiento de enfermedades de tipo sistémico en algunas plantas (Panta y Golmirzaie, 1997).

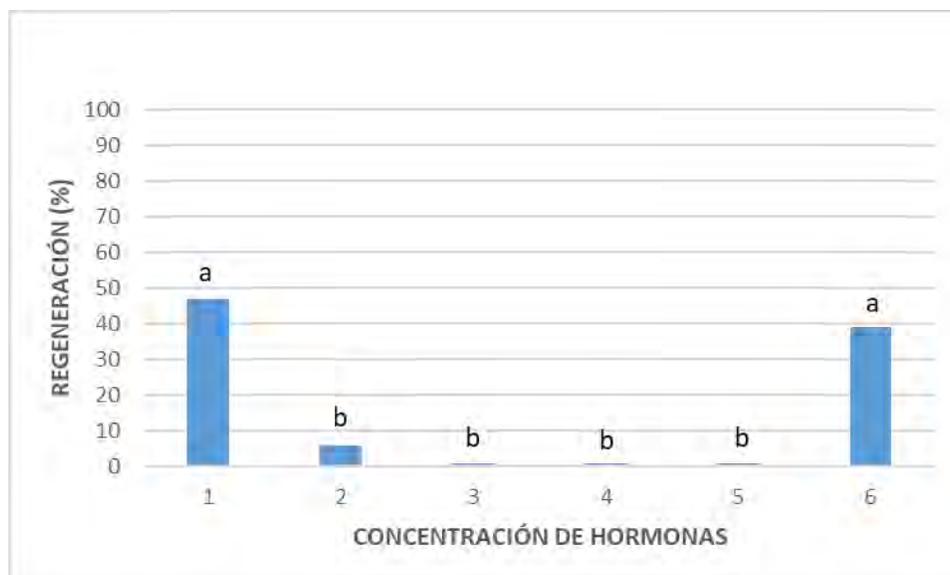
**Tabla 6.** Análisis de varianza para la variable regeneración de meristemos de tomate de árbol (%) con diferentes concentraciones de hormonas.

<b>F. VARIACIÓN</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;F</b>
<b>Rep.</b>	3	176	58,67 <sup>ns</sup>	1,07	0,3922
<b>Trat.</b>	5	9421,33	1884,27 <sup>**</sup>	34,30	<.0001
<b>Error</b>	15	824	54,93		
<b>Total corregido</b>	23	10421,33			

\*\* Diferencias estadísticas significativas al 99%; ns: no significativo

Los tratamientos uno y seis (T1: MS+AIA+BAP+AG<sub>3</sub> y T6: AIA+BAP) no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí, (Figura 11), y presentaron un porcentaje de regeneración del 47% y 39% respectivamente; sin embargo, estos dos tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 1), los cuales presentaron porcentajes de regeneración del 0 al 6% (Figura 11).

En esta investigación se sembraron explantes del domo meristemático con primordios foliares, según Conci (2010) el domo es una estructura de menos de 0,1 mm de diámetro muy difícil de extraer, el cual necesita un medio de cultivo con una concentración de nutrientes muy equilibrada y condiciones ambientales muy estrictas para su desarrollo, entre más pequeño sea el explante menos probabilidades de que sobrevivan (Kyte, 1987). En esta esta investigación los porcentajes de regeneración fueron inferiores al 50% a pesar de que se adicionaron fitohormonas en diferentes concentraciones (AIA, BAP y AG<sub>3</sub>) (Figura 11 y Tabla 1); contrario a este resultado, Abdelnour-Esquivel *et al.*, (2006) encontraron altos porcentajes de regeneración al agregar 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP al medio MS, con porcentaje de regeneración de los explantes del 85% en chayote *Sechium edule*.



**Figura 11.** Comportamiento de la regeneración de meristemos de tomate de árbol sometidos a diferentes concentraciones hormonales.

Resultados similares a esta investigación fueron encontrados por Marín *et al.*, (2009) quienes reportan que en medios constituidos por ANA  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  + AG<sub>3</sub>  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  + BA  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  no hubo desarrollo de raíces ni parte aérea, evidenciando unicamente un alto porcentaje de formación de callos (71%) en cultivares elites de yuca *Manihot esculenta* Crantz. Las concentraciones de AG<sub>3</sub> y BAP en esta investigación, para el tratamiento uno y dos fue de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1000 \mu\text{l}$ ) y  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1500 \mu\text{l}$ ) (Tabla 2) valores que están por encima de los reportados por Badoni y Chauhan (2009). Estos Autores al cultivar meristemos de papa, determinaron que el medio MS cuando contenía AG<sub>3</sub> a una concentración mayor a  $400 \mu\text{l}$  no respondieron bien y los porcentajes de supervivencia fueron bajos, en comparación con los medios en los cuales el contenido de AG<sub>3</sub> fue inferior a  $200 \mu\text{l}$ , los cuales produjeron buenas raíces y mayor número de hojas. Resultados similares fueron encontrados por Khan *et al.*, (2013) y Batool *et al.*, (2014) quienes reportaron que la aplicación de  $300 \mu\text{l}$  de AG<sub>3</sub> en el medio MS produjo mayor longitud de raíz y número de hojas en papa.

Según Espinosa *et al.*, (2005) las auxinas y citocinas regulan los procesos de morfogénesis en cultivos *in vitro*, el efecto de las auxinas en este caso el AIA y AG<sub>3</sub> y las citocinas BAP, pudieron haber presentado un efecto inhibitorio en el desarrollo de yemas y regeneración de meristemos,

resultados similares a los reportados por Criollo *et al.*, (2016) quienes encontraron que la combinación de BAP con AIA, no fue efectiva en la brotación de hipocotilos de tomate de árbol.

El mayor porcentaje de regeneración (47%) se presentó en el tratamiento uno (0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 1 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, Tabla 1), seguido por en tratamiento seis (39%) (1 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, Tabla 1). Alvarenga *et al.*, (1999), encontraron que la combinación 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> en medio de cultivo de meristemas fue el tratamiento más adecuado para la propagación de Chayote *Sechium edule* Jacq, resultados que concuerdan con los encontrados en el tratamiento uno en el cual se observó el mayor porcentaje de regeneración.

Otras investigaciones relacionadas realizadas por Singh y Kaur (2016) mencionan que encontraron un porcentaje de regeneración de 84,71% de meristemas apicales de papa en medio MS (enriquecido con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 0,1 mg L<sup>-1</sup> de NAA ), mientras que para Farhatullah *et al.*, (2007) y Batool *et al.*, (2014) el AG<sub>3</sub> tiene efectos de espectro relativamente amplio ya que juega un papel vital en la división y la ampliación celular y es utilizado ampliamente para la regeneración de meristemas en combinación con otros fitoreguladores como el NAA (Ácido naftalenacético) y BA (benciladenina). De acuerdo con Abe y Futsuhara (1986) es un hecho que el potencial de regeneración de plantas micropropagadas depende de la especie y del método in vitro. Finalmente estudios más recientes realizados por Ali *et al.*, (2018) mencionan que entre mayor sea la concentración de AG<sub>3</sub> la altura de la planta y la longitud de la raíz se incrementan significativamente en papa, pero inhibe la cantidad de nodos de las plantas en comparación con plantas que recibieron menor cantidad de AG<sub>3</sub> las cuales presentaron mayor número de hojas, concluyendo de esta forma que las dosis de AG<sub>3</sub> para la propagación in vitro de papa deben ser menores a 1 mg L<sup>-1</sup>, estos resultados confirman que el AG<sub>3</sub> tiene efectos significativos en la morfogénesis de las plantas pero la dosis puede variar dependiendo de la especie estudiada.

A pesar de que el tratamiento seis (1 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, Tabla 1-figura 11) no contenía AG<sub>3</sub>, presentó el segundo porcentaje más alto de regeneración (39%), sin presentar diferencias significativas con el tratamiento uno (0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP). Según Klee y Bencil (1991) la función principal del BAP es la formación y crecimiento de brotes

axilares, lo que puede indicar la importancia de este compuesto en la regeneración de los meristemas. En estudios realizados por Padron *et al.*, (2006) para la propagación in vitro de roble *Tabebuia rosea*, las mayores tasas de multiplicación de brotes se presentaron cuando el medio MS de los explantes fue suplementado con 17,76  $\mu\text{M}$  de BAP, resultados que coinciden con esta investigación. En oreganillo *Lippia micromera*, Capote *et al.*, (1999) encontraron que la combinación que permitió mayor eficiencia en el cultivo in vitro de esta especie fue la adición de 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA y 2  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP.

Por otra parte Pedroza (2009) menciona que el mejor desarrollo para la propagación in vitro de la orquídea *Epidendrum elongatum* Jacq, fue medio MS enriquecido con 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de AIA ya que estimuló la elongación celular de los protocormos cultivados, cantidades mayores de IAI disminuyeron el desarrollo del sistema radical, y el uso de IAI y BAP en el mismo medio de cultivo no fue positivo y obtuvieron la menor tasa de crecimiento de los protocormos, resultados que concuerdan con esta investigación teniendo en cuenta que si bien el tratamiento seis obtuvo un porcentaje de regeneración de explantes del 39% fue menor en comparación con el tratamiento uno. Salisbury y Ross (2000) afirman que cualquier fitoregulador es fisiológicamente funcional cuando se encuentra en bajas cantidades, y que a una concentración mayor estas sustancias ejercen efectos negativos sobre el desarrollo normal de la planta, debido a que el exceso de una hormona en lugar de inducir una respuesta específica por parte del tejido vegetal produce toxicidad del mismo. En esta investigación en el tratamiento dos al incrementar el IAI (1  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Tabla 1) bajo las mismas condiciones del medio, el porcentaje de regeneración de meristemas de tomate de árbol fue menor al 10%.

#### **4.6 Fase de aclimatación**

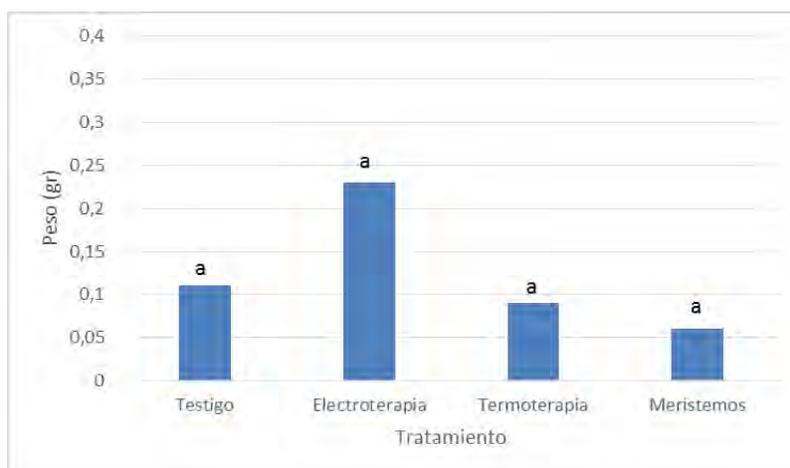
Todas las plantas sometidas a electroterapia, termoterapia y cultivo de meristemas se llevaron a una fase de aclimatación por 28 días, según el protocolo establecido para tomate de árbol por Sharry *et al.*, (2015). Posteriormente se determinó la biomasa teniendo en cuenta el peso seco. Según el análisis de varianza (Tabla 7) y la prueba de medias de Tukey (Figura 12) no se presentaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los tratamientos (electroterapia, termoterapia, plantas provenientes de meristemas y el testigo).

**Tabla 7.** Análisis de varianza para la variable peso seco de las plantas de tomate de árbol (g) después de la fase de aclimatación con tratamientos de electroterapia, termoterapia y cultivo de meristemos.

F. VARIACIÓN	GL	SC	CM	Fc	Pr>F
<b>Trat</b>	3	0,07	0,02 <sup>ns</sup>	2,2	0,1413
<b>Error</b>	13	0,13	0,01		
<b>Total</b>	19	0,19			

ns: no significativo

Según Hertmann *et al.*, (1997) la fase de aclimatación o endurecimiento, es el proceso mediante el cual las plantas obtenidas *in vitro* se transfieren gradualmente a un ambiente externo, en el caso de esta investigación la fase de aclimatación se llevó a cabo en un túnel de policarbonato por 28 días. Esta es una etapa crítica y una de las principales limitaciones en el proceso de micro propagación de diferentes especies (Debergh *et al.*, 1991); Olmos y Hallin, 1998 y Majada *et al.*, 2002) si no se tienen en cuenta las condiciones y requerimientos de las plantas.



**Figura 12.** Peso seco de plantas de tomate de árbol, 28 días después de la aclimatación.

El peso seco obtenido en todos los tratamientos fue igual estadísticamente, con valores de materia seca que oscilaron entre 0,23 g en el tratamiento de electroterapia y 0,006 g en la propagación por meristemos (Figura 12), con una supervivencia de las plantas trasplantadas de

laboratorio a invernadero fue del 100%, estos datos indican que las plantas sometidas a electroterapia y termoterapia no se vieron afectadas en el desarrollo de las mismas, de esta forma se puede considerar que el proceso de aclimatación de estas plantas fue exitoso. Resultados similares a esta investigación fueron reportados por Criollo *et al.*, (2016), Riofrió (2010) y Bazaldúa., *et al* (2008) quienes evaluaron diferentes alternativas de micropropagación en tomate y encontraron un porcentaje de supervivencia superior al 80%. En otras investigaciones al multiplicar explantes (apical, medial y basal) de olluco *Ullucus tuberosus* en medio MS y determinar la biomasa mediante el peso seco, Ali (2012) encontró que para los explantes medial y basal no se presentaron diferencias significativas, resultados que coinciden con esta investigación.

Por el contrario, al propagar in vitro cinco clones de Yuca *Manihot esculenta* Crantz (BRA 383, PER 183, CM 523-7, CM 3306-4 y SM 1565-15), Marín *et al.*, (2009) encontró diferencias estadísticas significativas en cuanto al peso seco del vástago y la raíz de las plantas en los tratamientos BRA 383 y CM 523-7, con respecto a los demás. Estas diferencias se deben a varias causas, la principal a que el periodo de evaluación en este caso fue después de ocho semanas de aclimatación, en donde las plantas tuvieron más tiempo para desarrollarse, en este estudio esta variable se determinó 28 días después de la fase de aclimatación; otra causa de esta inferencia puede explicarse en que en este caso se determinó el peso seco de la totalidad de la planta, frente al estudio referido en el cual se determinó para vástago y raíz.

## 5. Conclusiones

La temperatura, el tiempo de duración y la condición de humedad durante el tratamiento térmico influyen sobre la germinación las semillas de tomate de árbol; bajo condición humedad la temperatura máxima que soportaron las semillas sin afectar la germinación fue de 48 °C, mientras que bajo condiciones secas soportaron 68 °C.

La supervivencia de los explantes sometidos a termoterapia no se afecta cuando son sometidos a temperaturas de 38 °C por un tiempo de duración del tratamiento hasta de 96 horas, a 40 °C el tiempo de duración del tratamiento se reduce, disminuyendo el porcentaje de supervivencia a medida que el tiempo aumenta.

El tratamiento de electroterapia entre 2 y 10 voltios no afectaron la germinación ni la supervivencia en semillas y explantes de Tomate de árbol; por encima de 10 voltios la germinación de las semillas se redujo.

La técnica de propagación de plantas de tomate de árbol a partir de meristemos requiere de estrictas condiciones de composición hormonal; los mayores porcentajes de regeneración se lograron utilizando medio MS suplementado con una mezcla de AIA 0,5 mg L<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup> + AG<sub>3</sub> 1 mg L<sup>-1</sup> y AIA 1 mg L<sup>-1</sup> + BAP 3 mg L<sup>-1</sup>.

Los tratamientos de termoterapia, electroterapia y propagación por meristemos in vitro en semillas y explantes de tomate de árbol no afectaron el crecimiento y desarrollo de las plantas en la etapa de aclimatación.

### Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel, A., Bermudez, L. C., Rivera, C., y Alvarenga-Venutolo, S. 2006. Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica).77: 17-23.
- Abe, T. and Y. Futsuhara. 1986. Plant regeneration from suspension culture of rice (*Oryza sativa* L). Japan Journal Breeding. 36: 1-6. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.36.1>
- Achicanoy, H. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 54 (1 y 2): 1251-1273. DOI: 10.15446/rfnam
- Acosta-Quezada, P. G., Martínez-Laborde, J. B., & Prohens, J. 2011. Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. Genetic Resources and Crop Evolution. 58(6): 943-960. doi: 10.1007/s10722-010-9634-9
- Águila, L. G., Ponce, J. N. P., Urquiza, M. R., Pérez, B., Pérez, Y. M., & Hernández, Z. S. 2004. Conservación in vitro de plantas de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal. 4(2): 101-105.
- Aguilar M. 2001. Bioelectromagnetismo: Campos Eléctricos y Magnéticos y Seres Vivos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 241 p.
- Agrios, G. 2002. Fitopatología, primera edición, Limusa, Mexico, 890 p.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. University of Florida, Gainesville, U.S.A. 952 p.

- AGRONET. 2018. Estadísticas Agrícolas: Tomate de árbol. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. Consulta: Junio de 2018.
- Ali, S., Khan, N., Nouroz, F., Erum, S., Nasim, W., & Shahid, M. A. 2018. In vitro effects of GA 3 on morphogenesis of CIP potato explants and acclimatization of plantlets in field. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 54:(1), 104-111. <https://doi.org/10.1007/s1162>
- Ali, Y. 2012. Efecto de tres tipos de explantes en el desarrollo de olluco (*Ullucus tuberosus* Loz.) en condiciones in vitro (No. CIDAB-T-S608-V3e). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia). Facultad de Agronomía. 79 p.
- Almeida, J. y Contreras, I. 2003. Micropropagación del Tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* (Cav.) senndtn.), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forestal Venezolana*. 47(2): 9-13.
- Auld, T. D. & Ooi, M.K. 2009. Heat increases germination of water-permeable seeds of obligate-seeding *Darwinia* species (Myrtaceae). *Plant ecology*. 200(1):117-127. <https://doi.org/10.1007/s11258-008-9437-7>
- Alvarenga, S; Flores, D; Abdelnour-Esquivel, A. 1999. Micropropagación de fenotipos seleccionados de chayote (*Sechium edule*). *Tecnología en Marcha*. 13:9-15.
- Álvarez, J.; Cotes, J.; y Marín, M. 2011. Detección molecular de virus en material de siembra de Tomate de árbol en Colombia. *Revista Protección vegetal*. 26(2): 80-91.
- Angulo, R. 2008. El Cultivo de Tomate de árbol. Colciencias, Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 100 p.
- Areválo, A.; Bejonero, J.; Barreto, L.C. y Arévalo, E. 2011. Vigilancia epidemiológica del cultivo de tomate de árbol *Solanum betaceum* Cav. en el departamento de

Cundinamarca. Instituto Colombiano Agropecuario. -ICA. Subgerencia de protección vegetal. Dirección Técnica de epidemiología Agrícola y vigilancia fitosanitaria. Proyecto de Solanáceas. Bogotá D.C. 32 p.

Arhana, F.; Riofrío, R.; Arias, A.; y Torres, M. 2010. Regeneración de planas de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. Facultad de ciencias, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, USFQ, Quito. 36 p.  
<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/799>

Asohofrucol. 2016. Plan frutícola nacional. El cultivo de Tomate de árbol. Disponible en: <http://www.asohofrucol.com.co/bibliotecavirtual.php>. Consulta: Marzo de 2018.

Astier, S.; Albouy, J.; Maury, y.; Roboglia, C.; y Lecoq, H. 2007. Principles of Plant Virology, Genome, Pathogenicity, Virus, Ecology. Science Publisher. 472 p.

Atkinson, R., Gardner, R. 1993. Regeneration of transgenic tamarillo plants. Plant Cell Reports. 12(1):347-351. <https://doi.org/10.1007/BF00237433>

Ayala, M. González, E.; Gutiérrez, P.; Cotes, M.; Montoya, M. 2010. Caracterización serológica y molecular de potyvirus asociados a la virosis del Tomate de árbol en Antioquia (Colombia). Acta biológica Colombiana. 15(3): 145-164. DOI: 10.15446/abc

Badoni, A. and J.S. Chauhan. 2009. Effect of growth regulators on meristem-tip development and in vitro multiplication of potato cultivar '*Kufri Himalini*'. Nature and Science. 7(9):31-34.

Baskin, C.C. y Baskin, J. M. 2001. Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego: Academic Press. 666 p.

- Batool, A. S. I. A., Syed, S. H. Z., Muhammad, A., Ahsan, M., y Muhammad, N. 2014. Effect of growth regulators in meristem culture of Potato (*Solanum Tuberosum* L.). Science, Technology and Development. 33(2): 80-84.
- Bazaldúa, C.; Ventura, E.; Salcedo, G.; Maldonado, U. y López, A. 2008. Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de Tomate(*Physalis ixocarpa* Brot.), propagadas por cultivo de meristemas. Revista Chapingo. Serie horticultura. 14(2): 147-152.
- Bera, A.K.; Pati, M.K. y Bera, A. 2007. Electrotherapy of pre-sowing seed: A novel technique for yield improvement in crop plants. Indian Journal of Plant Physiology. 12(4): 301-311.
- Bera, A.; Pati, M.; y Ghanti, P. 2006. Effect of presowing electrical stimulus of seed on growth and yield of ridge gourd (*Luffa acutangula* Roxb.) and snake gourd (*Trichosanthes anguina* L.) Indian J. Plant Physiology. 11: 291-294.
- Bernal, J. 1994. Plagas y enfermedades del tomate de árbol. En: Plagas y enfermedades en frutales tropicales. Boletín Sanidad Vegetal No. 11. Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. Produmedios. Bogotá. 32 p.
- Betancourth, C.; Arturo, D.; y Goyes, R. 2003. Caracterización biológica de un virus del Tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt) en el departamento de Nariño. Fitopatología Colombiana. 27(1):7-10.
- Bohs L. 1991. Crossing studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and their systematic and evolutionary significance. American Journal Botany. 78:1683-1693. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb14532.x>
- Bohs L. 1994. *Cyphomandra* (Solanaceae). Flora Neotropica Monogr 63. The New York Botanical Garden, New York, Estados Unidos, 175 pp.
- Bohs, L. y Nelson A. 1997. *Solanum maternum* (Solanaceae), a new Bolivian relative of the tree tomato. Novon 7:341-345. DOI: 10.2307/3391759

- Bonnet, J. G., y Cárdenas, J. F. 2012. Manual para el cultivo de frutales en el trópico. pp. 825-850. En: Fischer, G. Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* sendt). Produmedios, Bogotá D.C. 873p.
- Borrero, E. 2007. Protocolo para la regeneración de plántulas a partir de explantes de hojas de cinco variedades ecuatorianas de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Tesis para obtener el título de BS en Biotecnología universidad San Francisco de Quito. Quito. 78 p.
- Boyes, S. y Strübi, P. 2010. Organic acid and sugar composition of three New Zealand grown tamarillo varieties (*Solanum betaceum* (Cav.)). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 25(1): 79-83. <https://doi.org/10.1080/01140671.1997.9513990>
- Capote, A.; Fuentes, V.; Blanco, N. y Pérez, O. 1999. Micropropagación y regeneración de plantas in vitro de oreganillo *Lippia micromera* Schau. in DC. var. helleri (Britt.) Mold. Revista del Jardín Botánica Nacional. 20:139-142.
- Carrington, J. y Dougherty, W. 1987. Processing of the tobacco etch virus 49 K protease requires autoproteolysis. Virology. 160: 355-362. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90006-7)
- Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. Serie 04SC-02.05. Cali, Colombia. 45 p
- Cerda, R.C.; Mora, D.F.; Marchena, L.A.; Durán, A.S. y Ulloa, C.A. 2014. Cultivo in vitro del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Fenotipo naranja) proveniente de Costa Rica. Tecnología en Marcha. 27(2): 10.
- Chen, C.; Smye, S.; Robinson, M. y Evans J. 2006. Membrane Electroporation theories: a review. Medical & Biological Engineering & Computing (Holanda). 44:5-14.
- Conci, V. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II: Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. Argentina. p. 481- 494.

- Conci, V. 2004. Obtención de plantas libres de virus. En: Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA, Parte VIII, Cap. 5: 303-312. ISBN 987-521-138-9.
- Conci, V. y Nome, S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants by thermotherapy and meristema-tip culture. *Journal Phytopathology* 132:186-192. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00111.x>
- Converse, R.H. y Tanne, E. 1984. Heat therapy and stolon apex culture to eliminate mild yellow-edge virus from Hood strawberry. *Phytopathology*. 74:1315-1316.
- Correia, S. M., & Canhoto, J. M. 2010. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma*. 242(1-4): 95-107. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0130-z>
- Côte, F., M. Folliot., R. Domergue y C. Dubois. 1999. Field performance of embryogenic cell suspension derived banana plants (*Musa* AAA, c.v. Grand Nain). In: May, G. (ed.). The International Symposium on the Molecular and Cellular Biology of Banana. Boyce Thompson Institute for Plant Research Inc. New York, EEUU. pp: 30 – 38.
- Criollo, H.; Insuasti, K., y Delgado, W. 2016. Regeneración in vitro de plántulas de Tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 252-261. Doi: <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>
- Cruz, S.; Guimaraes, M.; y De-Carvahlo, C. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant cell, tissue and organ culture*. 15: 161-167. <https://doi.org/10.1007/BF00035757>
- Damm, U.; Cannon, P. F.; Woudenberg, J. H. C. & Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, 73, 37-113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>

- Debergh, P.C. y Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation Technology and application. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. 479 p.
- Díaz-Granados, C. y Chaparro-Giraldo, A. 2012. Métodos de transformación genética de plantas. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 15(1): 49-61.
- Díaz, A.E.; Solis, A., y Kondo, T. 2013. The tomato fruit borer, *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée)(Lepidoptera: Crambidae), an insect pest of neotropical solanaceous fruits. CABI. 3, 137.
- Dixon, R. A.1985, Isolation and Maintenance of callus and cell suspension cultures. In: R.A. Dixon, Ed. Plant cell culture. A practical approach. pp. 1-20.
- Doods, J.H. y Robert, W. 1988. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University. Press Cambridge. 231 p.
- Eagles, R.; Gardner, R.; y Foster, R. 1994. Incidence and distribution of six viruses infecting tamarillo (*Cyphomandra betacea*) in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 22: 453-458. <https://doi.org/10.1080/01140671.1994.9513857>
- Espinosa, J. A.; Trillos-González, O.; Hoyos-Sánchez, R.A.; Afanador Kafuri, L., & Correa Londoño, G. 2005. Potential of in vitro propagation for the tomato tree partenocarpic *Cyphomandra betacea* Cav.(Sendt). Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 58(1), 2685-2695.
- Farhatullah, Z. A., Abbas, S. J., y Abbas, S. J. 2007. In vitro effects of gibberellic acid on morphogenesis of potato explants. International Journal of Agriculture and Biology. 9(1): 181-182.

- Feicán C., Encalada C., Larriva W. 1999. El cultivo del tomate de árbol. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, Cooperación Técnica del Gobierno Suizo, Estación Experimental Chuquipata. Programa de Fruticultura, Ecuador, 46 pp.
- Feeney, M.B.; Bhagwat, J. y Mitchell, W.L. 2007. Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium L.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 201–214. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9252-1>
- Feican, C.G.; Encalda, C.R. y Beceril, A.E. 2016. Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*). *Agroproductividad*. 9(8):78-86. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/312938646>
- Fichino, B.S.; Fidelis, A.T.; Schmidt, I., and Pivello, V.R. 2012. Efeitos de altas temperaturas na germinação de sementes de capim-dourado (*Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland, Eriocaulaceae*): implicações para o manejo. *Acta Botanica Brasílica*. 26(2): 508-511.
- Galliteli, D.; Quacquerrelli, A.; Sanimow, V.; y Pizzola, P. 1980. The use of electrical current (RACE) for obtaining Mosaic free Almonds. *Acta Phytopathologica. Academic Scientiarum Hungaricae*. 15(14):155-251. DOI: 10.17660/ActaHortic.1981.94.35
- Gamborg, O.L.; Murashige, T.; Thorpe, T.A. y Vasil I.K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro*. 12: 473-478. <https://doi.org/10.1007/BF02796489>
- Gamborg, O.; Miller, R.; Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* 50: 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gañán, L., Álvarez, E., y Zapata, J.C. 2015. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 39(152): 339-347. DOI: <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.192>

- García, F.; Roselló, J. y Santamarina, M. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Edt. Universidad Politécnica de Valencia. España. 181p.
- García, F., Obando, J., y García, C. B. 2004. Reconocimiento de especies de meloidogyne en tomate de árbol (*Solanum betacea*) y lulo (*Solanum quitoense*) en la zona norte del departamento de Nariño. Revista de Ciencias Agrícolas. 21(1): 28-40.
- George, F.E. y Sherrington D.P. 1984. plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial labs. 690 p
- Golmirzaie, A.M.; Panta, A. y Nopo, L.H. 1994. The contribution of tissue culture of roots and tubers to crop improvement in National Agriculture Research Systems (NARS). In: Advances in Tissue Culture Technology for Improved Planting Material. (4-1994, Kingston, Jamaica). Proceedings of Journal of Biotechnology. 4:98-105.
- Guimaraes, M.; Cruz, S.; y De-Carvahlo, C. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 15(2): 161-168. <https://doi.org/10.1007/BF00035757>
- Hartung, T.; Balls, M.; Bardouille, C.; Blanck, O.; Coecke, S.; Gstraunthaler, G. y Lewis D. 2002. Good Cell Culture Practice. ECVAM. Good Cell. Altern Lab Anim. 30(4):407-14.
- Hernández, C. y Mancipe, M. 1995. Evaluación de técnicas de termoterapia y cultivo de meristemas para la erradicación de enfermedades virales en Ajo (*Allium sativum* L.). Bogotá, Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencia y Educación. Departamento de Biología. Trabajo de grado (Licenciado en Biología). p. 73.
- Hernández, R.; Fontanella, J.; Noa, C.; Manso, R.; Pichardo, T.; Cárdenas, H. 1997. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnóstico por mMELISA. Centro Agrícola. 24 (1): 64-65

- Herrera, J.; Alizaga, R.; Guevara, E. y Jimenez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta: Fisiología de la producción de los cultivos. Ed. Universidad de Costa Rica. 108p.
- Hertmann, H., D. E. Kester, F.T., Davies Y R. Geneve., 1997. Plant Propagation principles and practices. 6a ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, U.S.A. 747 p.
- Hormozi-Nejad, M.; Mozafari, J. y Rakhshandehroo, F. 2010. Elimination of Bean common mosaic virus using an electrotherapy technique. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 117(5):201- 202. <https://doi.org/10.1007/BF03356361>
- Huang, L. C., & Murashige, T. 1977. Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation and some applications. *TCA Manual/Tissue Culture Association*, 3(1), 539-548. <https://doi.org/10.1007/BF00918758>
- Hull, R. 2004. Mathew's Plant virology. Fourth Edition. Elsevier Academic Press, USA.1001 p.
- Ibañez, A. 2004. Obtención de material vegetal libre de virus en uva de mesa de la región de Murcia y posterior micropropagación. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Comunidad Autónoma de la región de Murcia. 150p.
- ICTVdB Management. 2006a. Cucumber mosaic virus. Disponible en: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. Columbia University, New York, USA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>. Consulta: Mayo 2018.
- ICTVdB Management 2006b. Tomato mosaic virus. Disponible en: ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. Columbia University, New York, USA. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>. /. Consulta: Mayo 2018

- Igarza, J.; Hernández, R.; y Cruz, B. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMW en malanga. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica (CATIE). 60: 57-60. <http://hdl.handle.net/11554/6453>
- Jordán, M., y Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Squeo y Cardemil, L.(eds.). Fisiología Vegetal, 1-28.
- Kalinin, L.G.; Boshkova, I.L.; Panchenko, G.I. y Kolomičuk, S.G. 2005. The influence of a low- and high-frequency electromagnetic fields on seeds. Biofisika. 50(2): 361-366.
- Kamiya, Y. 2010. Plant hormones: Versatile regulators of plant growth and development.60: 7-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.60.031110.100001>.
- Khan, R.T.; G. Murtaza, S.R.; Abbas, I.; Hussain, M.R.; Abbas and Batool, A. 2013. Virus elimination, in vitro response and colonel multiplication Potato (*Solanum tuberosum*). Journal Natural Sciences. 1(1): 1-13.
- Khan, J. y Dijkstra, J. 2006. Handbook of plant virology. Food Product Press Oxford. 452.
- Klee, H., y Estelle, M. 1991.Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiology. 42: 529 – 551.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.002525>
- Korsten, L., y Jeffries, P. 2000. Potential for biological control of diseases caused by *Colletotrichum*. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. 266-291.
- Krug, H. 1997. Enviromental influences on development growth and yield. pp. 101-180. In: H.C. Wien (Ed.). The Physiology of Vegetable Crops. CABI Publishing, London. 662 p.
- Kyte, L. 1987. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press. Oregon, USA. p. 64-65

- Larson, C.C; Gómez, M. y Sánchez, D.R. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque* 27(3): 250-257. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002006000300004>
- Lester, R.N. y Hawkes J.G. 2001. Solanaceae. En: Hanelt P, Institute of Plant Genetics and Crop Reesearch (eds). Mansfeld.'s encyclopedia of agricultural and horticultural crops (except ornamentals) 4:1790–1856, Springer, Berlin, Alemania.
- Liakatas, A.; Clark, J.A. y Montieth, J.L. 1986. Measurements of the heat balance under plastic mulches. Part I. Radiation balance and soil heat flux. *Agricultural and Forest Meteorology*. 36: 227-239. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(86\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0168-1923(86)90037-7)
- Limasset, P., y Cornuet, P. 1949. Recherche Du Virus De La Mosaique Du Tabac (Marmor-Tabaci Holmes) Dans Les Meristemes Des Plantes Infectees. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*. 228(25): 1971-1972.
- Lira, R.H. 2013. Fisiología Vegetal. Segunda Edición. Trillas, México D.C. 237 p.
- López-Cardona, N. y Castaño-Zapata, J. 2013. Etiología de la Muerte descendente del tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.]. *Revista Agronomía*. 21(1):7-18.
- Lozoya-Saldaña, H., y García, G. 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *American potato journal*. 73(4):149-154. <https://doi.org/10.1007/BF02853073>
- Lozoya, S. H.; Abello. F. y García. G. 1995. Electrotherapy and shoot tip eliminate potato virus X (PXV) in potato. Reporte de investigación. Chapingo, México. 15 pp.
- Lutkova, I. y Oleshko, P. 1972. The effect of alternating current on the seeds of fruit crops during stratification. *Biologicheskii Shornik* 126: 85-98.

- MADR. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. 2018. Área, producción y rendimiento nacional por cultivo. Disponible en:  
<http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>. 31 mayo 2108.
- Majada, J.L.; Wang, M.Y. y Shen, D. 2002. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllis* L. Cultured in vitro. *In vitro y Developmental Biology*. 38: 272:278. <https://doi.org/10.1079/IVP2001271>
- Maita, S. 2011. Manejo del " ojo de pollo" o antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en el cultivo del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav). Editorial Universitaria de Cuenca – Ecuador. 62 p.
- Marín, A.; Albarrán, J.G.; Fuenmayor, F., y Perdomo, D. 2009. Evaluation of the growing regulator effect on the in vitro regeneration of five cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Científica UDO Agrícola*. 9(3): 556-562.
- Marín, E.E. 2017. Estudio de la función de las giberelinas en la iniciación y desarrollo de los óvulos en *Arabidopsis*. Universidad Politècnica de València. Departamento de Biotecnología. Tesis de maestría. Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas. 98 p
- Matilla, A. 2003. En: *Ecofisiología de la germinación de semillas*. Capítulo 29. pp. 901-922. En: Reigosa, M.J., N. Pedrol y A. Sánchez (eds.). *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. Ediciones Paraninfo, Madrid. 922p.
- Megías, M.; Molits, P. y Pombail, M.A. 2016. Órganos animales. En: *Atlas de histología vegetal y animal*. 13. p. España. Consulta: Julio de 2018. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-a-tegumento.pdf>

- Mejia, R, y Vitorelli, C. 1988. "Cultivo "in vitro" de plantas de papa". Primera edición. Lima - Perú. En: Gonzales Ortiz C.; Vilca Aquino J. 1998. Ed. Red Andina de Semillas Forestales. RASEFOR, COSUDE. Interoperación. Cajamarca. 112 p.
- Monette, P.; 1986. Elimination in vitro the two grapevine nepoviruses by an alternating temperature regime. *Journal Phytopathology*. 116:88-91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1986.tb00898.x>
- Morel, G., y Martin, C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Comptes Rendus Mathematique Academie des Sciences, Paris*. 235:1324-1325.
- Morton J.F. 1982. The tree tomato or. "tamarillo.", a fast-growing, early-fruited small tree for subtropical climates. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*.95:81-85.
- Mroginski, L., Sansberro, P., y Flaschland, E. 2010. Establecimiento de cultivos stablecimiento de cultivos de tejidos vegetales Pag: 17-25. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; y Mroginski L. (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal 2*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 644 p.
- Mumford, R. A. Barker, I. y Wood, K. R. 1996. The Biology of the Tospoviruses. *Annual applied Biology*. 128:159-183. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07097.x>
- Murashige, T. y Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473 – 479 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murr L.E. 1965. Plant growth response in electrostatic field. *Nature*. 38(3):109-121. <https://doi.org/10.1038/200490b0>

- Nganga, S. 1982. Physiological basis of potato crop yield: principles. pp. 13 – 16. In: Nganga, S. and F. Shideler (Eds.). Potato Seed Production for Tropical Africa. International Potato Center.
- Olmos, E. y Hallin, E. 1998. Ultraestructural differences of hyperhidric and normal leaves from regenerated Carnation plants. *Science Horticulturae*. 75: 91:101. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00096-X)
- Padron, E. S., & Avila, M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*. 11(2): 52-62. <https://doi.org/10.21897/rta.v11i2.645>
- Panta, A., y Golmirzaie, A. 1997. Cultivo de Tejidos para la Eliminación de Patógenos con fines de Producción de Semilla de Papa. Producción de tubérculos-Semillas de Papa. Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (*CIP*). Fascículo No.4: 1-8.
- Pedroza, J. 2009. Efecto del carbón activado, ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) en el desarrollo de protocormos de *Epidendrum elongatum* Jacq bajo condiciones in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1): 17-32
- Pérez, R.; González, Y. y Rojas, X. 2005. Sensibilidad de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) clon CMC-40 a la corriente eléctrica y su futuro uso en el saneamiento a enfermedades. *Centro Agrícola*. 32(1): 93.
- Postman, J.D. 1994. Elimination of viruses from clonal pear germplasm. *Acta Horticola*. 367:72-75. DOI: 10.17660/ActaHortic.1994.367.8
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus free plants. F. Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture. New York, springer verlag, 615 p.

- Ramírez-Malagón, R.; Pérez-Moreno, L.; Borodarenko, A.; Salinas-Gonzalez, G.J. and Ochoa-Alejo, N. 2006. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus free-garlic plants produced by tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86:103-110. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9102-6>
- Rashmi, R.M. y Trivedi, M.P. 2014. Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 172(5): 2562-2570. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0693-1>
- Refatti, E.; Loi, N.; Osler, R.; Carraro, L.; y Ermacora, P. 1999. Problemas relacionados con las enfermedades de los frutales producidas por fitoplasmas y transmitidas por psíidos: situación actual del pear decline, european stone fruit yellows y el apple proliferation, en Italia. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal.* 114: 159-162.
- Reglas Internacionales para ensayos de semillas. 1977. Ministerio de agricultura. Madrid: Danubio, 182 p.
- Revelo, J.; Mora, E.; Gallegos, P. y Garcés, S. 2008. Enfermedades, nematodos e insectos plaga del Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.): una guía para su identificación en el campo. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. Quito, Ecuador. 17 p.
- Riofrío, L. A. 2010. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betacea*) a partir de protoplastos. Universidad San Francisco de Quito. Tesis B.S. en biotecnología. 44 p.
- Roca, W.M. y Mroginski, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical -CIAT. Publicación N- 151. Cali, Colombia. 969 p.

- Russo, V.M.; Bruton, V.D. y Sams, C.E. 2010. Classification of temperature response in germination of Brassicas. *Industrial Crops and products*. 31: 48-51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.08.007>
- Sabry, Y.; Mahmoud, M.; Hosseney, H.; Mamdouh, H. y Ghaffar, A. 2009. Evaluation of some therapies to eliminate Potato Y Potyvirus from potato plant. In: *International Journal of Virology*. 5(2): 64-76. <https://scialert.net/abstract/?doi=ijv.2009.64.76>
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 431-449
- Saldarriaga, A.; Castaño, J.; y Arango, R. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en Tomate de árbol, manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 32(123):145-156.
- Salisbury, F., Ross, C. 2000. *Fisiología vegetal: desarrollo de las plantas y fisiología ambiental*. España: Thomson editores Paraninfo. 988p.
- Santillán S. 2001. *Manual del cultivo sustentable de tomate de árbol*. Universidad de Cuenca, Uediciones, Cuenca, Ecuador, 53 pp.
- Schenk, R.U., y Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. (1): 199-204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Sharry, S.; Adema, M. y Abedini, W. 2015. *Plantas de probeta; manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). La Plata, Argentina. 240p.

- Singh, B., y Kaur, A. 2016. In vitro production of PLRV and PSTVd-free plants of potato using electrotherapy. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 19(4): 285-294. <https://doi.org/10.1007/s12892-016-0028-1>
- Srivastava, L. 2002. *Plant growth and development. Hormones and environment.* Academic Press Elsevier science. London, 772 p.
- Stefanello S, L Dal Vesco, J Ducroquet, R Nodari, M Guerra. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae* 105: 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.11.006>
- Tan, R.; Wang, L.; Hong, N.; y Wang, G. 2010. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 101(2): 229-235. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9681-0>
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2007. *Fisiología vegetal.* Colección ciencias experimentales No. 10 Universidad de California, Los Ángeles. Ed. Univertat Jaume I. 1.265 p
- Tarek, M. 2005. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*. (Estados Unidos). 88(6):4045-4053. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050617>
- Tekalign, T. and Hammes, P.S. 2005a. Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth I. Stomatal conductance, rate of transpiration, net photosynthesis, and dry matter production and allocation. *Scientia Horticulturae* 105(1): 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.029>
- Tekalign, T. and Hammes P.S. 2005b. Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth II. Growth analysis, tuber yield and quality. *Scientia Horticulturae* 105 (1): 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.021>

- Thorpe, T. y S. Harry. 1997. Application of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae* 447: 39 – 49. DOI: 10.17660/ActaHortic.1997.447.2
- Trabelsi E, S Naija, N Elloumi, Z Belfeleh, M Msellem, R Ghezal, S Bouzid. 2010. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) ‘Chetoui’. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33(2): 319-324. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0550-6>
- Ueguchi-Tanaka, M.; Nakajima, M.; Ashikari, M. & Matsuoka, M. 2007. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annual Reviews Plant Biology*. 58, 183–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830>
- Van Loenen, M., Y. Turbett, C. Mullins, N. Feilden, M. Wilson, C. Leifert, and W. Seel. 2003. Low temperature-short duration steaming of soil kills soil borne, pathogens, nematode pest and weeds. *European Journal Plant Pathology*. 109(9): 993-1002. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.00000003830.49949.34>
- Vizuete, B.; Insuasti, M.L.; Ochoa, J. y Ellis, M. 1991. Biological and serological characterization of tree tomato virus diseases in Ecuador. INIAP-Ohio State University. *Intervirology*. 269-296.
- Wagele, R. 1978. Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. *Patentans Piiche* 28(41): 933 p.
- Wahab, A.M.; Omran, A.F.; Elkholy, E. and Hafez, H. 1980. Studies on the effect of treating watermelon and snake cucumber seeds with electric current. *Seed Science and Technology* (Switzerland). 8: 95-102.
- White, P. 1934. Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. *Phytopathology*. 24: 1003–1011.

Yamaguchi, S. 2000. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiology*. 41: 251-257.

<https://doi.org/10.1093/pcp/41.3.251>

Zhao, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 49-64.