



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

INGENIERIA AGROPECUARIA

“GERMINACIÓN, BROTACION Y CONSERVACIÓN *in vitro* DE *Solanum cajanumensis*, KUNTH (tomate de árbol silvestre)”.

Tesis de grado previo a la obtención del

título de Ingeniero Agropecuario

Autor: Ángel Asdrual Yaguache Celi

Directora: Ing. Rosa Armijos González

Loja - Ecuador

2009

Ing.

Rosa Enith Armijos González

DIRECTORA DE TESIS

Certifica:

Que el presente trabajo **“Germinación, brotación y conservación *in vitro* de *Solanum cajanumensis*, Kunth (tomate de árbol silvestre)”** realizado por el profesional en formación Ángel Asdrual Yaguache Celi, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, Octubre 2009

.....

Rosa Enith Armijos González

DIRECTORA

DEDICATORIA

A Dios, mis padres Ángel Miguel y Franstimer Rosario, mis hermanos Doris, Carlos, Jairo, Cristian, Ruth, John y Jimmy, a todos mis compañeros de la carrera de Ingeniería Agropecuaria y amigos de la Unidad de Fisiología Vegetal por su apoyo desinteresado, ya que gracias a ellos he podido cumplir unas de mis metas planteadas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Particular de Loja, a mis profesores y más personal perteneciente a la Institución por sus valiosas enseñanzas y su continuo apoyo.

A la Escuela de Ciencias Agropecuarias por todos sus enseñanzas brindadas.

A la Unidad de Fisiología Vegetal por los conocimientos adquiridos y por el apoyo para que mi trabajo se lleve a cabo.

A la ingeniera Rosa Armijos González, Directora de tesis, quien con su orientación ha entregado su aporte para la realización de mi tesis.

SESIÓN DE DERECHOS

Yo Ángel Asdrual Yaguache Celi declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de las investigaciones, trabajos científicos, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....
Ángel Yaguache Celi

AUTOR

.....
Ing. Rosa Armijos González

DIRECTORA DE TESIS

INDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Sesión de derechos	iii
Índice de contenidos	iv
Lista de tablas	vi
Lista de fotos	vii
Lista de graficas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	x
1. INTRODUCCION	1
1.1. Justificación	1
2. Objetivos	3
2.1.1. Objetivo general	3
2.1.2. Objetivos específicos	3
3. REVISION LITERARIA	4
3.1. Descripción de <i>Solanum cajanumensis</i>	4
3.2. Uso e importancia	5
3.3. Formas de propagación	5
3.3.1. Sexual	5
3.3.2. Asexual	6
3.3.2.1. Propagación <i>in vitro</i>	6
3.4. Cultivo <i>in vitro</i>	7
3.4.1. Vías de regeneración	7
3.4.2. Conservación <i>in vitro</i>	8
4. MATERIALES Y METODOS	10
4.1. Material de partida	10
4.2. Germinación	10
4.2.1. Diseño experimental	11
4.3. Brotación	12

4.3.1. Diseño experimental	12
4.4. Conservación	13
4.4.1. Diseño experimental	13
4.4.2. Análisis estadístico	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	15
5.1. Germinación	15
5.2. Brotación	18
5.2.1. Formación de callo	18
5.2.2. Diferenciación de yemas preexistentes	20
5.2.3. Formación de raíces	22
5.3. Conservación <i>in vitro</i>	24
5.3.1. Formación de raíces	24
5.3.2. Formación de hojas	26
5.3.3. Formación y crecimiento de brotes	26
6. CONCLUSIONES	30
7. RECOMENDACIONES	31
8. BIBLIOGRAFIA	32
9. ANEXOS	38

Lista de tablas

Tabla 1: Tratamientos pre-germinativos.

Tabla 2: Diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para inducción a brotación.

Tabla 3: Concentraciones de sales modificadas en el medio MS para conservación de tejidos.

Tabla 4: Formación de callos provenientes segmentos nodales.

Tabla 5: Desarrollo de la diferenciación de yemas preexistentes.

Tabla 6: Formación de raíces.

Tabla 7: Formación de raíces durante la conservación.

Tabla 8: Formación de hojas durante la conservación.

Tabla 9: Número promedio de brotes existentes durante la conservación.

Tabla 10: Crecimiento de brotes durante la conservación.

Lista de fotos

Foto 1: **a)** Selección y clasificación de las semillas. **b)** Lavado y desinfección de las semillas previo a la introducción *in vitro*.

Foto 2: **a)** Corte de la testa seminal (escarificación mecánica). **b)** Siembra en MA a base de Nitrofoska foliar (NPK).

Foto 3: Germinación y emergencia criptocotilar de las semillas a los 20 días (hipocotilo elevado sobre el tallo).

Foto 4: **a)** Inicio de formación de callo en la base de los segmentos. **b)** Formación de callo en presencia de 1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4 D., además de pequeños síntomas de hiperhidricidad.

Foto 5: Formación de brotes en las concentraciones: **a)** 1.5 mg/l BAP - 0.1mg/l IAA. **b)** 0.875 mg/l BAP -0.625 mg/l IAA.

Foto 6: Enraizamiento presente en el tratamiento control a los 90 días.

Foto 7: Segmentos nodales conservados durante 180 días sin evidencia de formación de raíces.

Foto 8: Formación de hojas en: **a)** MS 50% de su concentración. **b)** MS 5% de su concentración.

Foto 9: Brotes generados a partir de segmentos nodales en MS al 5% de su concentración a los 180 días.

Foto 10: Reducido crecimiento de brotes en MS al 5% a los 180 días.

Lista de graficas

Grafica 1: Germinación de semillas aplicando diferentes tratamientos pre-germinativos a los 20 días.

Grafica 2: Incremento del porcentaje de germinación en un periodo de 20 días al usar escarificación mecánica, más error estándar.

Grafica 3: Inducción a regeneración *in vitro* de segmentos nodales en *S. cajanumensis* durante 90 días.

Grafica 4: Resultados obtenidos mediante la aplicación de diferentes concentraciones de sales en medio MS en la conservación segmentos nodales de *S. cajanumensis*.

Lista de abreviaturas

MA: Medio alternativo a base de Nitrofoska foliar (NPK).

MS: Medio de cultivo (Murashige and Skoog 1962).

MS100%: Concentración de sus componentes (sales y minerales).

MS 50%: Concentración de sus componentes (sales y minerales).

MS 25%: Concentración de sus componentes (sales y minerales).

MS12,5%: Concentración de sus componentes (sales y minerales).

MS5%: Concentración de sus componentes (sales y minerales).

H2O2: Agua oxigenada a 10 vols.

IAA: Acido indolil-3-acético o Indolacético.

2,4D: Acido 2,4-diclorofenoxiacético.

BAP: Bencilaminopurina.

TDZ: Tiabedazol

RESUMEN

Solanum cajanumensis, (Kunth), Solanaceae originaria de la provincia de Loja (Cajanuma) es una especie de similares características físicas, morfológicas y fisiológicas a *Solanum betaceum* con algunas diferencias como la resistencia a plagas y enfermedades locales como Membracidos (periquito del tomate), pulgones, nemátodos noduladores, tizón de la hoja, *Oidium sp*, entre otras; de fácil adaptabilidad al medio y alto porcentaje de fructificación por inflorescencia, siendo una especie potencial para el cultivo a gran escala. Por ser una especie poco conocida no existen actualmente cultivos o información generada en cuanto a su propagación.

Por tal motivo el presente estudio tuvo como fin generar información base sobre porcentajes y tiempos de germinación en condiciones *in vitro*, propagación *in vitro* utilizando combinaciones de auxinas y finalmente se establece una metodología conservación de tejidos modificando las concentraciones de sales minerales del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962).

A semillas de *S. cajanumensis* se les aplicó tratamientos pregerminativos con: H₂O₂; lavados o lixiviación y, escarificación mecánica, todas embebidas por 24 horas y finalmente puestas a germinar en medio de cultivo MA obteniendo como resultado de germinación a partir de los 5 días con un máximo de 92,6% a los 20 días con escarificación mecánica y de 0% en lixiviación y escarificación química (H₂O₂).

De las plántulas germinadas *in vitro* se extrajo los segmentos nodales para inducir a brotación aplicando IAA, BAP, 2,4D en MS (1962), y mantenidas a 16 horas/luz.

De estos tratamientos la mayor brotación fue observada en 0.625 mg/l IAA combinada con 1.875mg/l BAP presentando 10,06 brotes / explante a los 90 días. Y se observó un 86% de formación de callos 2.0 mg/l de 2,4 D + 1.0 mg/l de BAP.

Para conservación se partió de segmentos nodales provenientes de plántulas geminadas *in vitro* de 3 meses de edad con un tamaño de 1.5 cm con 2 yemas axilares cultivadas en medio MS utilizando diferentes concentraciones de su

composición (100% 50%, 25%, 12,5%) y mantenidas en un fotoperiodo de 12 horas luz, una temperatura promedio de 21° C y humedad relativa de 60%.

Como resultados de conservación de tejidos se observó menor crecimiento de raíces en: MS 12.5% con 2,40 centímetros y MS 5% con 4,80 centímetros por planta a los 180 días, de igual forma, la concentración MS al 5% mostró un promedio menor de 4 hojas por frasco y 1 hoja por planta. En el crecimiento y número de brotes se demostraron mejores resultados en MS al 5% con un promedio de 3,6 brotes y 0,9 centímetros de altura.

No se evidenció muerte de los cultivos durante los 6 meses en conservación.

Palabras claves: escarificación, germinación, brotación, conservación.

1. INTRODUCCION

1.1 Justificación

El Ecuador es uno de los países más pequeños de Sudamérica a pesar de ello cuenta con una gran biodiversidad de especies frutales, tanto silvestres como cultivables. Entre estas esta *S. betaceum* (tomate de árbol) una especie tropical de la zona andina cultivada principalmente en Ecuador, Colombia y Perú (Portela, 1999; Reyes and Sanabria, 1993). La gran utilidad alimenticia como medicinal de esta fruta andina la ha hecho popular en los mercados y se ha cultivado en gran cantidad en las zonas interandinas del Ecuador (Reyes and Sanabria, 1993; Espinosa et al, 2005).

Sin embargo de lo anteriormente mencionado, el cultivo de tomate de árbol presenta una alta incidencia de patógenos (Sánchez et al, 1996; Terranova, 1995), presentándose como alternativa de cultivo *S. cajanumensis* especie nativa de las partes altas del sur del Ecuador (Loja) (Bohs, 1989), la cual presenta gran resistencia a patógenos como nemátodos entre otros. Por tal motivo podría ser utilizada para lograr el mejoramiento del tomate de árbol al hacer cruzamientos a través de injertos, polinización cruzada o fusión de protoplastos. Todo esto teniendo presente que *S. betaceum* y *S. cajanumensis* son especies que presentan similares características morfológicas y fisiológicas como forma de hojas, tallo, inflorescencias y frutos (Amaya et al, 2006).

De la poca información disponible sobre reproducción de *S. cajanumensis* se conoce que se la puede hacer por semillas al igual que *S. betaceum* y otras especies del mismo género que presentan un mismo comportamiento de crecimiento y desarrollo (Lobo, 2006; Meza and Manzano, 2007; Cárdenas et al, 2007). De cultivo in vitro de *S. cajanumensis* no se ha encontrado información, sin embargo de *S. betaceum* hay mucha información disponible la cual ha sido usada como punto de partida en esta investigación tanto para la propagación como para la conservación.

Por todo lo anteriormente mencionado en la presente investigación se plantea obtener protocolos para la propagación, brotación y conservación *in vitro* de *S.*

cajanumensis, Kunth, como una alternativa de cultivo por sus buenas características, también para poder disponer de material que permita obtener híbridos con *S. betaceum* y como aporte al conocimiento científico de esta especie que poco se conoce sobre su reproducción y aun menos de su manejo *in vitro*.

2. Objetivos.

2.1. Objetivo general.

“Inducir a germinación, brotación y conservación *in vitro* de *Solanum cajaniensis*, Kunth (tomate de árbol silvestre)”.

2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la germinación de *S. cajaniensis*.
- Inducir brotación evaluando diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas.
- Reducir el crecimiento de tejidos modificando condiciones nutricionales con el fin de conservación.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Descripción de *Solanum cajanumensis* Kunth.

Conocido como tomate silvestre (Ecuador), Casana en Nueva Zelanda, fue descrita por Child (1986) como una nueva especie, quien la encontró al sureste del Ecuador (Loja). Se distribuye en los Andes de Colombia, Ecuador, y al norte del Perú, sobre todo en la ladera occidental, en los 1500 a 3000 m s.n.m. (Meza & Manzano, 2007; Morton, 1987; Prohens et al, 1997). *S. cajanumensis* pertenece tradicionalmente al grupo de *Cyphomandra* de la familia de las Solanaceae, junto con otras especies reconocidas (Bohs, 1989; Child, 1986).

Es un árbol mediano de 1-5 metros de alto. El tallo es densamente puberulento o a menudo piloso con vellos rizados 2-3 mm. Las hojas simples, de 5-40 x 3.5-40 centímetros, subcoriáceas, ovaladas o elípticas, glabras a densamente puberulentas, sobre todo en las venas, el ápice agudo; los pecíolos 2.5-2.7 centímetros, glabrosos o densamente puberulentas o pilosa con vellos glandulares rizado. Las inflorescencias 3-15 centímetros, ramificado no ramificado, con 10 a 30 flores, todas perfectas; el pedúnculo 2.5-6 centímetros o cm; el raquis 1-12 centímetros; el pedicelo de 10-20 mm, 20-50 mm de acorchado y leñoso en la fruta. Las flores ovoides, con ápice agudo, un radio del cáliz 3-5 mm, los lóbulos 1-3 x 2.5-3 mm, deltados oblongos y carnosos, las corolas 2-3 centímetros de diámetro, estiladas, subcoriáceas, de color púrpura a verdoso o blanquecino (Bohs, 1989).

El periodo de Floración es de Enero hasta Septiembre fructificando desde Julio hasta Noviembre. Los frutos son de 4.5-10 x 2.5-4.5 centímetros, elipsoidales, agudos u obtusos en ápice, glabrosos a moderadamente puberulentos, sobre todo cuando joven, en estado maduro es amarillo con rayas verdes. Las semillas 4-5 x 3-3.5 mm, planas, el reticuladas y moderadamente a densamente blanco-puberulentas (Bohs, 1989).

3.2. Usos e importancia

Las frutas son grandes, tiene un sabor agridulce y comestible. Esta especie está siendo cultivada en Nueva Zelanda como un cultivo alternativo de fruta y mejoramiento de los cultivos (injertos) de tomate de árbol (Bohs, 1989).

Mediante cultivo se podría producir una fruta de valor comercial. Merece una atención especial de los horticultores y los científicos como una fuente de material genético de cualidades tales como la resistencia a los nematodos, resistencia a la pudrición de la raíz, aroma, sabor, color, y el rendimiento. (LKPA with PWC, 1989)

3.3. Formas de propagación

La propagación del tomate de árbol silvestre puede realizarse por vía sexual (semillas) y asexual (estolones o estacas) (Reina et al, 1998), lo cual también es evidenciado en *S. betaceum* y otras especies silvestres del mismo género (Amaya et al, 2006).

3.3.1. Sexual

La técnica más sencilla para obtener nuevas plantas, es a través de semillas, de además de resultar más barato, se obtienen plantas con mejor fijación al suelo y por lo tanto plantas vigorosas. La germinación permite a la planta tener características genéticas y resistencia al ambiente externo (Sánchez, et al. 1996).

La emergencia en *S. betaceum* de la planta se da a partir del cuarto día completándose hasta los 25 días (Suárez, 2003) especie tomada como referencia para este trabaja por su similitud con *S. cajanumensis* en crecimiento y desarrollo (Amaya et al, 2006; Meza & Manzano, 2007).

La germinación de *S. betaceum* se caracteriza por seis estados secuenciales: (1) comienza con la aparición de la radícula hasta alcanzar 4 milímetros; (2) se caracteriza por el acelerado crecimiento de la radícula hasta los 5 centímetros a los 9 días; (3) la radícula continúa su desarrollo y comienza la aparición de raíces laterales; (4) la raíz está plenamente ramificada y comienza la emergencia del hipocótilo a los 20 días; (5) a los 22 días se produce la caída de las envolturas

seminales y la aparición del epicótilo; (6) en el sexto estadio a los 25 días la plántula está completamente formada (Meza & Manzano, 2007).

3.3.2. Asexual

En *S. betaceum* se emplean estolones, injertos o yemas, la poda de regeneración es una forma de prolongar la vida de una planta obteniendo producción en menor tiempo. Esta metodología consigue adelantar la producción en corto tiempo. Sin embargo, el sistema radicular de estas plantas es superficial por lo que su durabilidad es menor. Por esta razón las plantas propagadas por semillas es lo mas recomendado por su durabilidad (Sánchez et al, 1996).

El método de propagación asexual en medio natural es muy utilizado por preservar los genotipos y complejos genéticos de las plantas propagadas. Se cortan estacas de diferentes diámetro o tamaño, se realiza una desinfección y se siembra en suelo estéril para evitar la contaminación generalmente se lo hace bajo invernadero. En algunos casos se usa inductores de enraizamiento para aumentar la fijación y absorción de nutrientes (Rojas et al, 2004).

3.3.2.1. Propagación *in vitro*.

No existen reportes de propagación *in vitro* de tomate de árbol silvestre, sin embargo, en tomate de árbol común se lo puede realizar de dos formas: La primera se lo realiza utilizando yemas jóvenes de plantas en producción, en la planta madre se cortan los tallos y se eliminan las hojas dejando un pedazo de peciolo cubriendo las yemas luego se cortan en segmentos y mediante un proceso de desinfección para anular la contaminación se procede a sembrar. Esto se basa en que el nudo de una planta *in vitro* colocado en un medio de cultivo apropiado induce el desarrollo de la yema axilar del nudo obteniéndose como resultado una nueva plántula, a la vez es importante notar que este tipo de propagación se basa en el desarrollo de la yema axilar que es una estructura morfológica ya existente, salvo es el caso de cuando hay uso de reguladores de crecimiento (Meza & Manzano, 2007; Espinosa et al. 2005). La segunda se puede partir de semillas germinadas y mediante repiques se puede aumentar el número

de plantas, con el mismo método se puede mantener la especie *in vitro* pasando de un medio nutritivo a otro mediante (Lizárraga et al, 1990, Suárez, 2003; Remache, 2006).

3.4. Cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa potencial e importante para la conservación genotípica y permite además la obtención de un número elevado de plantas en un espacio reducido y bajo condiciones controladas que evitan la contaminación de diferentes agentes. Es una herramienta útil en programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos et al, 2004; Severin, 2005).

Basado en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células vegetales son autosuficientes y tienen la capacidad de regenerar plantas completas, se puede iniciar cultivos partiendo de semillas y partes de plantas (flores, hojas, yemas y más órganos) en sistemas climáticos controlados (frascos, tubos de ensayo, cuarto de crecimiento) (Santana, 2007; Sánchez et al, 1996).

Con las diversas aplicaciones que presentan los cultivos *in vitro* se puede acceder a un material vegetal de excelente calidad sanitaria y con más vigor que el obtenido por los métodos de propagación convencionales.

3.4.1. Vías de regeneración.

La regeneración de plantas o de explantes a partir de callos, por medio de la organogénesis y embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación, sin embargo, esa aplicación ha sido limitada por la insuficiente estabilidad genética de los cultivos de callos (Litz, 1984; Jarret et al, 1980). Hay, en cambio, necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas; en consecuencia, existe un

considerable interés en definir las vías de regeneración para varias plantas de importancia económica (Roca and Mrogniski, 1991).

Estas vías de regeneración permiten la obtención de órganos que no estaban presentes en un tejido vegetal como son raíces y brotes adventicios de plantas cultivadas *in vitro* a través de la manipulación química de los medios de cultivo, (Suárez, 2003; Pérez, et., 1999; Litz, 1984; Jarret et al, 1980).

De acuerdo a los niveles hormonales presentes en un explante se puede derivar a la inducción de brotes o raíces. En una baja concentración de citoquininas con respecto a las auxinas el conjunto tisular será menor, pero generará enraizamiento, por lo contrario una alta concentración de citoquininas con respecto a las auxinas provocará mayor formación de brotes (Skoog and Miller, 1957 citados en Jordán, s.f.).

3.4.2. Conservación *in vitro*

Hay dos sistemas básicos de conservación de germoplasma *in vitro*, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular (Roca et al. 1989).

La limitación del crecimiento consiste en mantener los cultivos (yemas o plántulas) en condiciones físicas o químicas que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios frescos, sin que ello afecte la viabilidad del cultivo. Esto puede controlarse empleando los siguientes factores: temperatura, nutrientes inorgánicos y orgánicos, reguladores de crecimiento y concentración osmótica del medio (Roca et al. 1989).

Otros factores como el tamaño de los frascos, la cantidad y la concentración del agente gelificante, la concentración del carbono en el medio, la limitación de la oxigenación, la intensidad de la luz, temperaturas bajas (Withers, 1980) y control del fotoperíodo, entre otros, son importantes en la supresión del crecimiento de los cultivos *in vitro*. (Roca et al. 1989 & Lizárraga et al.1990).

La supresión del crecimiento básicamente consiste en el uso de bajas temperaturas o la crioconservación con temperaturas de -190°C , que se las

puede conseguir con el uso de nitrógeno líquido. A estas temperaturas todo metabolismo células deja de funcionar, pero es importante realizar con precaución este método por el riesgo de formación de cristales de hielo en los tejidos durante el proceso de congelación, esto se evita utilizando sustancias crioprotectoras y procurando un congelamiento rápido (Mroginski et al, s.f.).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material vegetal

De frutos maduros se extrajeron semillas las cuales fueron lavadas y puestas a secar por 5 días, posteriormente se las desinfectó con agua jabonosa por 2 minutos, seguido por inmersión en alcohol al 70% por 30 segundos, más un enjuague con agua destilada estéril a 60°C, seguido por inmersión en hipoclorito de sodio (1,25%) mas unas gotas de jabón, por 10 minutos y 2 enjuagues con agua destilada estéril (Suárez, 2003).

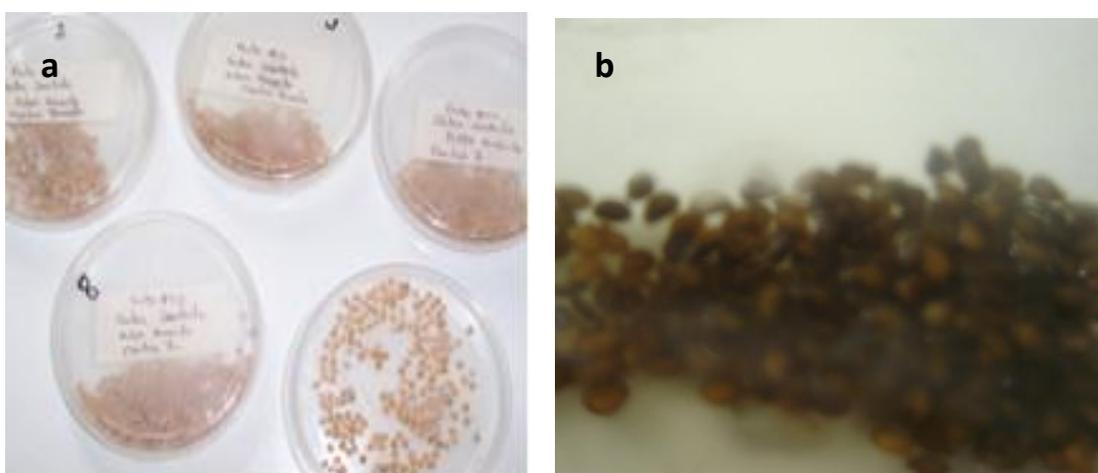


Foto 1: a) Selección y clasificación de las semillas. b) Lavado y desinfección de las semillas previo a la introducción *in vitro*.

4.2. Germinación

Luego de la desinfección las semillas por grupos fueron sometidas a varios tratamientos pre-germinativos (Tabla 1) para estimular la germinación.

Tabla 1: Tratamientos pre-germinativos.

Tratamientos	Tiempo de exposición	Imbibición
H ₂ O ₂ (10 vol.)	2 min.	24 horas
H ₂ O ₂ (10 vol.)	5 min.	24 horas
H ₂ O ₂ (10 vol.)	5 min.	48 horas (lavado a las 24 horas)
Corte y eliminación de testa	----	24 horas
Testigo	-----	24 horas

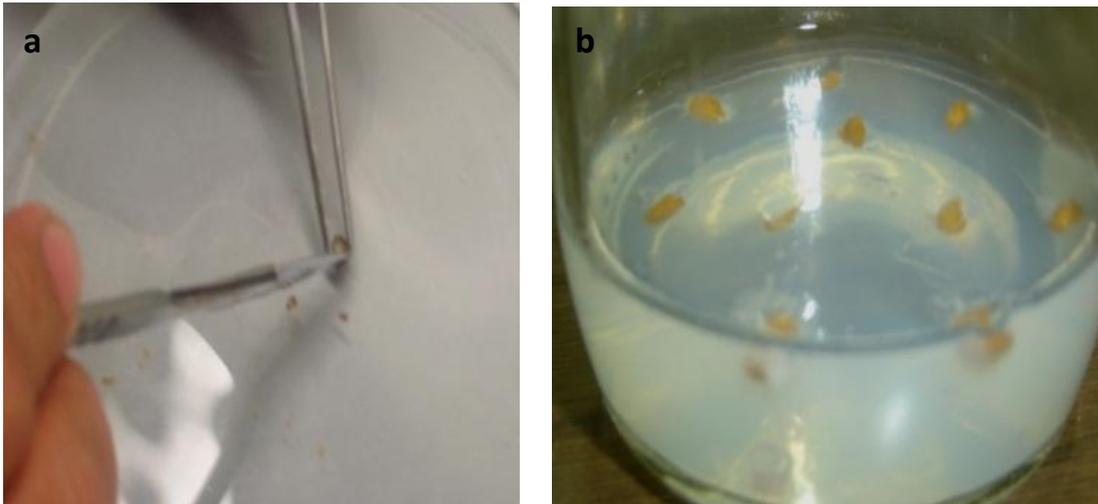


Foto 2: a) Corte de la testa seminal (escarificación mecánica). b) Siembra en medio MA a base de Nitrofoska foliar (NPK).

Posteriormente las semillas fueron embebidas por un lapso de 24 horas en agua destilada estéril, a excepción del tratamiento T3 que se embebieron por 48 horas previa lavado (lixiviado con agua estéril) a las 24 horas.

Finalmente las semillas fueron cultivadas en medio MA (Nitrofoska foliar (NPK)). con 7g/l de agar, 20g de sacarosa, pH 5.8 ± 0.02 y esterilizado a 121°C ., e incubadas a 12 horas/luz, 21°C y 60% HR.

4.2.1. Diseño experimental

- Unidad de respuesta 1 frasco con 5 semillas.
- Muestra 5 frascos.
- Replicas de diseño 3 repeticiones del diseño total (15 frascos)

Variables.

Independientes

Tratamientos pre-germinativos: eliminación de la testa seminal, lavados 24 y 48 horas, tiempos de exposición a H_2O_2 . al 100% de 10 vol. (2y 5 minutos)

Dependientes

- Porcentaje de germinación en distintos tratamientos.

Pregunta

- ¿La germinación de *S. cajanumensis* mejorar al ser estimulada mediante escarificantes?

Hipótesis

La testa de la semilla de *S. cajanumensis* impide la salida del embrión, por tanto su debilitamiento permite la germinación.

4.3. Brotación

Para la inducción a brotación se partió de segmentos nodales provenientes de plántulas germinadas *in vitro* de 3 meses de edad, a los cuales se les cultivó en medio MS (Murashige and Skoog 1962) con 20 g/l de azúcar, 7 g/l de agar, más diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (Tabla 2) Mantenido en un fotoperiodo de 16 horas/ luz, 21 °C y 60% HR.

Tabla 2: Diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para inducción a brotación

Concentración de reguladores de crecimiento (mg/l)	
Auxinas	Citoquininas
0,1 AIA	1,5 BAP
0,625 AIA	1,875 BAP
2.0 2,4 D	1.0 BAP
0,625 2,4 D	1,875 BAP.
Testigo	

4.3.1. Diseño experimental

- Unidad de respuesta 1 frasco con 5 segmentos nodales
- Muestra 5 frascos.
- Replicas de diseño 3 repeticiones del diseño total (15 frascos)

Variables.

Independientes.

- Auxinas: AIA (0,1 mg/l; 0,625 mg/l) y 2,4D (2,0 mg/l; 0,625 mg/l)
- BAP (1,5 mg/l; 1,875 mg/l; 1,0 mg/l; 1,875 mg/l).

Dependientes.

- Porcentaje de brotes por diferenciación de yemas preexistentes.
- Número de brotes (directos/ indirectos)
- Porcentaje de formación de callo.
- Porcentaje de enraizamiento.

Pregunta

¿Qué combinación de reguladores (auxinas y citoquininas) induce a una mayor proliferación de explantes?

Hipótesis.

Una alta concentración de citoquininas inducirá una mayor regeneración de tejido vegetal a partir de segmentos nodales de *S. cajanumensis*.

4.4. Conservación

Se partió de segmentos nodales provenientes de plántulas geminadas *in vitro* de 3 meses de edad con un tamaño de 1.5 cm con al menos 2 yemas axilares.

Las plantas fueron cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de sales (Tabla 3) y mantenidas en un fotoperiodo de 12 horas luz, una temperatura promedio de 21° C y humedad relativa de 60%

Tabla 3: Concentraciones de sales modificadas en el medio MS para conservación de tejidos.

Concentraciones de medio MS
MS 100%
MS 50%
MS 25%
MS 12,5%

4.4.1. Diseño experimental

- Se realizaron 3 tratamientos modificando la concentración de sales para retardar el crecimiento.
- Para cada concentración de sales en medio MS se utilizaron:

Unidad de respuesta 1 frasco con 5 segmentos nodales

Muestra 5 frascos.

Replicas de diseño 3 repeticiones del diseño (15 frascos).

Variables.

Independientes.

- Concentraciones de sales minerales en medio MS: 100% 50%, 25%, 12,5% y 5%.

Dependientes

- Crecimiento de raíces, hojas y brotes
- Cambios morfológicos & fisiológicos: (hiperhidricidad, necrozamiento, fenolización, mortalidad).
- Porcentaje de regeneración del material conservado.

Pregunta:

¿La disminución de los componentes del medio MS influyen sobre el retraso del crecimiento de plántulas in vitro de *S. cajanumensis*?

Hipótesis

Al disminuir la concentración de sales se puede retardar el crecimiento y mantener viable el cultivo de tejidos por un largo periodo.

4.5. Análisis estadístico

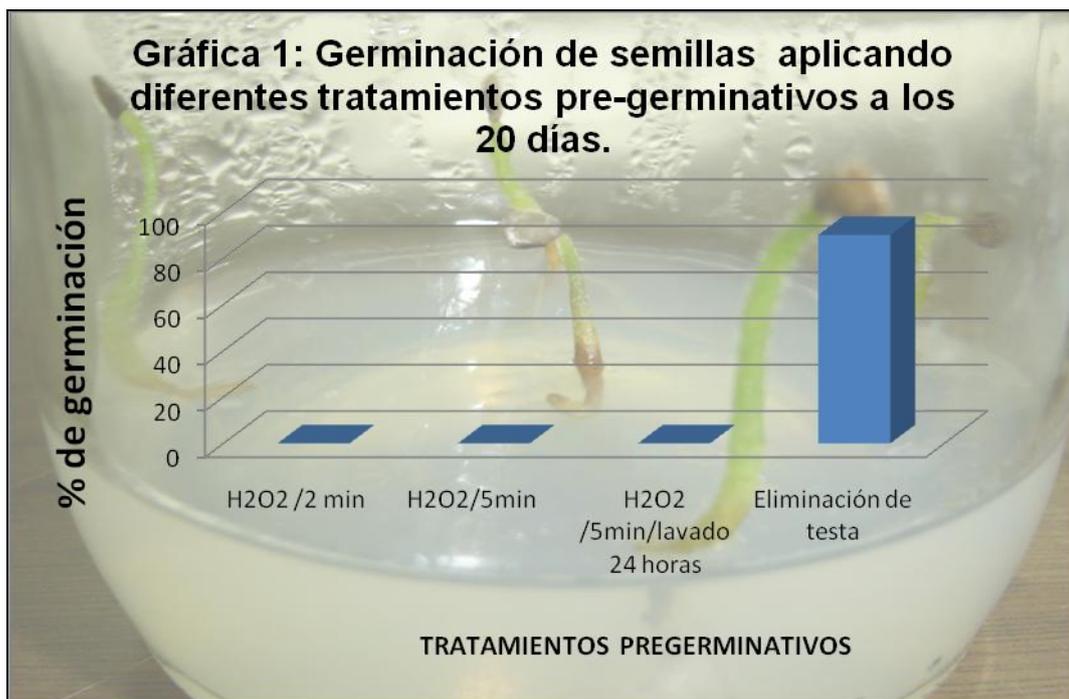
Los datos se tomaron cada 15 días por un periodo de 6 meses.

Los datos se analizaron con el modelo estadístico Anova en el Programa XLSTAT 2008 mediante la prueba de Tukey, con un intervalo de confianza de 95% que son métodos adecuados para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Germinación

El mayor porcentaje de germinación se dió con la escarificación mecánica (corte y eliminación de testa), con 92.6 % a los 20 días, a diferencia de los demás tratamientos que no presentaron germinación. (Gráfica 1).



Al parecer la germinación nula presentada en *S. cajatumensis* en presencia de Agua oxigenada y por lavados se puede deber a la latencia superficial impuesta por la testa reportada en otras especies silvestres del género *Solanum* (Torres and Ellis, 2007). Lo contrario ocurre en especies domesticadas como *S. betaceum* y *S. quitoense* (naranjilla) que germinan fácilmente aplicando temperaturas variadas o Nitrato de Potasio (Torres and Ellis, 2007). Sin embargo Lobo (1988a, 1989, 1991) presume la existencia de latencia en tomate de árbol por los valores reducidos de germinación dados en semillas recién extraídas. Además según Dyer (1995). las semillas del genero *Solanum* presentan fotolatenia, ocurriendo la germinación en sitios claros .

Por otro lado según Cárdenas et al, (2007) mencionan que el desarrollo del embrión en las semillas de especies del género *Solanum* se incrementa cuando las bayas pasan del 75% al 100% de presencia de carotenoides en la epidermis del fruto, favoreciendo la germinación al no presentarse latencia en las semillas. Lo que no se evidenció en *S. cajanumensis*.

En algunos casos la baja germinación de semillas de algunas especies se debe a embriones muy pequeños con relación a su tamaño y aunque estos poseen cotiledones y radícula visibles tienen mucho endospermo, por lo tanto, deben crecer cierta longitud antes que la radícula emerja de la semilla (Walck et al, 2002) citado en (Cárdenas et al, 2007). Aunque no se ha demostrado en *S. cajanumensis*.

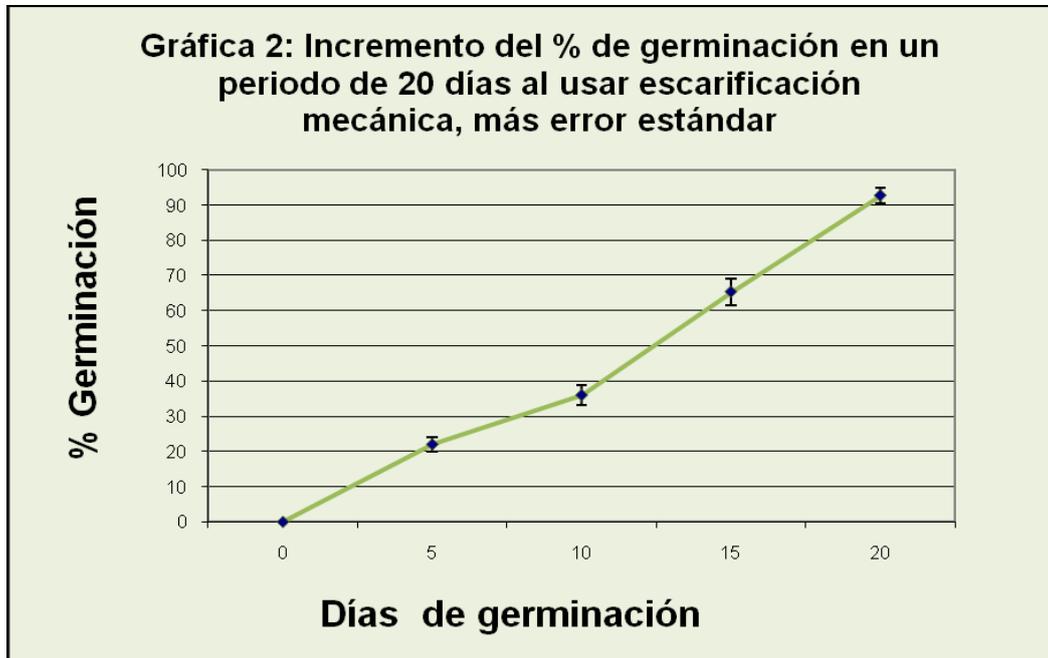
Según Raghavan (2002) el desarrollo del embrión termina con el desarrollo de la semilla dentro del fruto y que luego de la desecación el embrión entra en un periodo de latencia, y cuando encuentran condiciones adecuadas este retoma su crecimiento para la germinación de la semilla.



Foto 3: Germinación y emergencia criptocotilar de las semillas a los 20 días (hipocótilo elevado sobre el tallo).

La emergencia de las plántulas de *S. cajanumensis* es epigea pues el hipocótilo se eleva sobre el tallo, de esta forma la plántula fue clasificada como criptocotilar

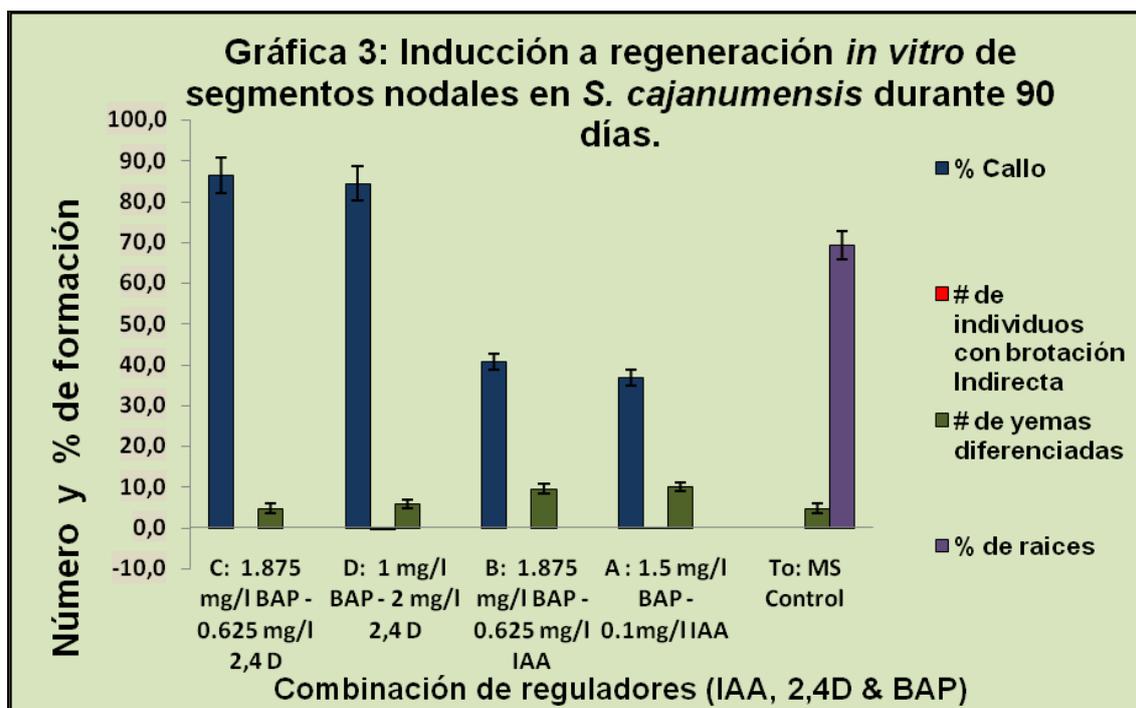
según Duke (1969), la semilla y sus envolturas se levantan al momento de la emergencia del hipocótilo y con la aparición final de las hojas verdaderas (Gráfica 2).



Resultados similares de germinación con escarificación mecánica obtuvieron Meza and Manzano, (2007); Suárez, (2003) en *S. betaceum*, quienes observaron germinación desde los 4 días hasta a los 25 días con porcentajes del 95%.

5.2. Brotación

Los diferentes tratamientos aplicados de reguladores de crecimiento (BAP, IAA y 2,4D) en medio MS para brotación de *S. caj anumensis* durante de 90 días evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos (Gráfica 3).



5.2.1. Formación de callo.

El mayor porcentaje de formación de callo se dio en las concentraciones de 1 mg/l BAP - 2 mg/l 2,4 D con una media de 86.3%. Seguido de la concentración 1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4D con una media del 84.3%. Estas combinaciones demostraron diferencias significativas con respecto al testigo y el resto de tratamientos con porcentajes que no superaban el 41% respectivamente. (Gráfica 3, Tabla 4 & Anexos 1).

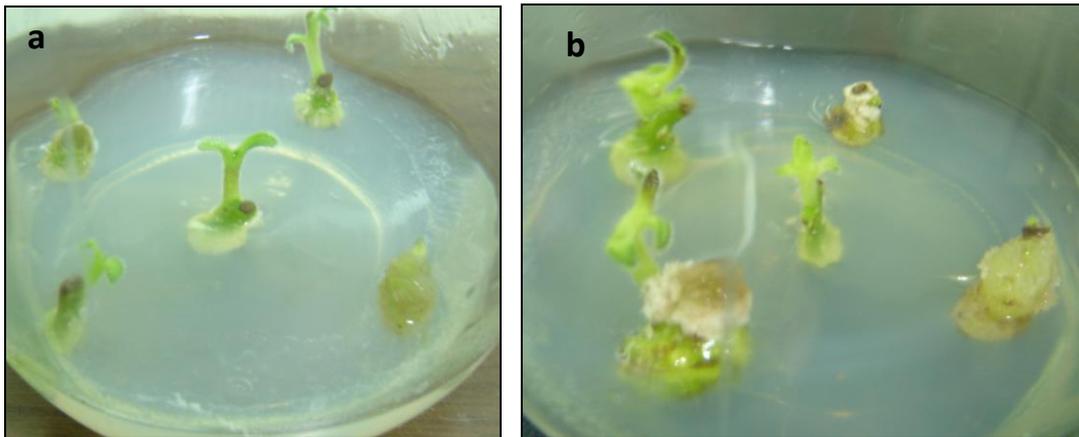


Foto 4: a) Inicio de formación de callo en la base de los segmentos. b) Formación de callo en presencia de 1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4 D., además de pequeños síntomas de hiperhidricidad.

En las combinaciones 1.875 mg/l BAP -0.625 mg/l IAA y 0.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA se observó formación de callo desde la base de los segmentos que estuvieron en contacto con el medio de cultivo hasta la mitad de estos con un promedio de 0.4 centímetros de diámetro, una coloración verdosa y consistencia dura. Esto se diferenció con los tratamientos mg/l BAP -2 mg/l 2,4 D y 1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4 que mostraron formación de callo de color blanquecina y consistencia esponjosa. Esto significa que no pueden ser potenciales para la regeneración debido a que los brotes no crecen bajo estos tejidos.

Tabla 4: Formación de callo provenientes segmentos nodales.

Reguladores de crecimiento (mg/l)	% de formación de callo
1.5 mg/l BAP -0,1 mg/l IAA	36.8 b \pm 3,512
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA	40.6 b \pm 1,750
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4D.	84.3 a \pm 1,141
1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4D	86.3 a \pm 4,778
Testigo	0 c

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%, más error estándar.

Para determinar las diferencias entre tratamientos se tomó en cuenta además de los porcentajes, de crecimiento y brotación los cambios morfológicos (formación de callo) de los segmentos nodales puestos en diferente concentración de BAP,

IAA y 2,4D combinados y mediante la toma de datos se pudo observar los diferentes cambios en cada tratamiento, coloración forma estructura.

En las concentraciones 1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4 D. y 1 mg/l BAP - 2 mg/l 2,4 D se observó formación de callo de todo el segmento nodal recubierto de un tejido color blanquecino y de consistencia esponjosa asemejándose a los efectos de hiperhidricidad, similares resultados fueron observados por Remache (2006), este problema no afectó a la formación de callo.

Hoyos (1996) logró obtener callos friables a partir de explantes de hojas de *S. betaceum* en MS suplementado con 0,1 mg/l de 2,4 D y 0,05 mg/l de BAP, con el fin de producir las suspensiones embriogénicas necesarias, para la generación de material resistente a la acción de toxinas producidas por el hongo *Colletotrichum acutatum* Penz, causante de la antracnosis en el tomate de árbol. En el caso de las plantas control se presentó un ensanchamiento en la base del explante.

5.2.2. Diferenciación de yemas preexistentes

No existe diferencias significativas entre las concentraciones 1.5 mg/l BAP - 0.1mg/l IAA y 0.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA en la formación de brotes a partir de la yemas existentes de los segmentos nodales, pero hay diferencia significativa con el testigo y las concentraciones 1.875 mg/l BAP-0.625 mg/l 2,4D; 1 mg/l BAP - 2 mg/l 2,4D (Tabla 5 & Anexo 2).

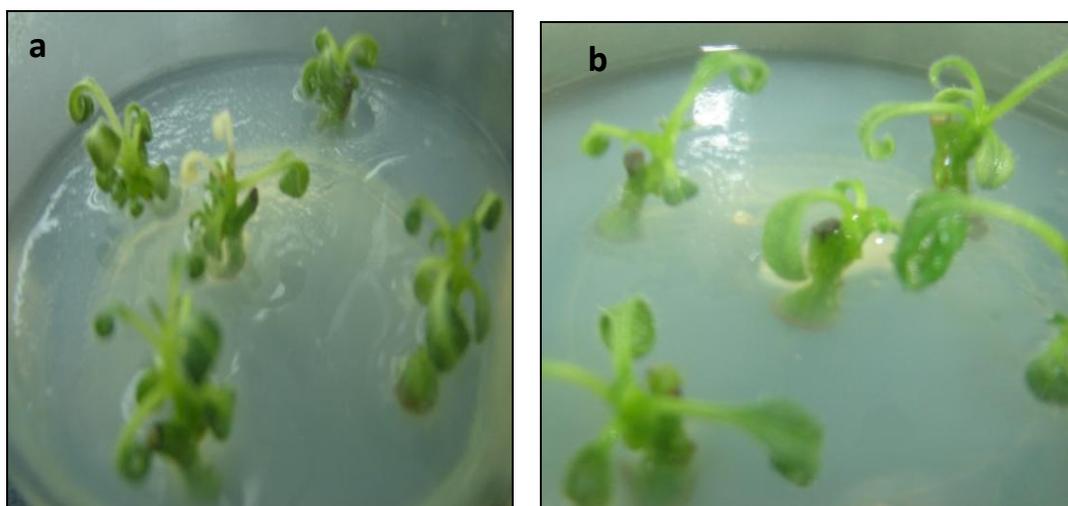


Foto 5: Formación de brotes en las concentraciones: a) 1.5 mg/l BAP - 0.1mg/l IAA.
b) 0.875 mg/l BAP -0.625 mg/l IAA.

El máximo de brotación se obtuvo a los 90 días en la combinación 1.5 mg/l BAP - 0.1mg/l IAA con una media de 10 brotes/explante, seguido de la combinación 0.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA con una media de 9.0 brotes. (Tabla 5).

Tabla 5: Desarrollo de la diferenciación de yemas preexistentes.

Grupo de reguladores mg/l	Número de yemas diferenciadas
1.5 mg/l BAP -0.1 mg/l IAA	10.06 a \pm 1,236
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA	9.66 a \pm 0,513
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4D.	5.80 b \pm 0,236
1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4D	4.86 b \pm 0,262
Testigo	4.86 b \pm 0,274

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95% más error estándar.

Según Hoyos et al, (1998), la presencia de BAP en el medio de cultivo, promueve la formación de brotes en los explantes foliares provenientes de hojas jóvenes en *S. betaceum*, con regeneración de 37,5 %, en una concentración de BAP de 2,0 mg/l. Y en similar concentración luego de 12 semanas de cultivo se puede obtener el mayor promedio de brotes/explante de 4,49.

Como se puede observar en la gráfica 6 (Anexos 3) en 1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4D más 1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4D existió baja formación de brotes, esto se pudo deber a la presencia del 2,4D, según George (1993a), Pal et al, (2006), esta auxina favorece a la formación de callos en gran número de especies de plantas dicotiledóneas, por lo tanto, es comúnmente utilizada, aunque se debe tener en cuenta que tiene una alta capacidad para producir variación genética .

Obando and Jordan (2001) evaluaron el potencial de regeneración *in vitro* de algunos explantes de *S. betaceum* y los cambios de proteínas solubles y fenoles a lo largo de la morfogénesis, encontrando que los explantes de hoja, en presencia de TDZ solo o en combinación con AIA, en un inicio inducían a callos y posteriormente brotes, los mismos que se formaron en la superficie abaxial de 4 y 5 semanas después de iniciado el cultivo. La mayor brotación (93,3 %) fue en presencia de TDZ con 16,3 brotes/explante

5.2.3. Formación de raíces.

Durante el proceso de regeneración se evidenció la formación de raíces únicamente en el control con un 69.3 % (Tabla 6, Anexos 3 & Foto 6).



Foto 6: Enraizamiento presente en el tratamiento control a los 90 días.

Tabla 6: Formación de raíces.

Grupo de reguladores mg/l	% de formación de raíces
1.875 mg/l BAP -0.1 mg/l IAA	0.0 b \pm 0.00
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l IAA	0.0 b \pm 0.00
1.875 mg/l BAP - 0.625 mg/l 2,4D.	0.0 b \pm 0.00
1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4D	0.0 b \pm 0.00
Testigo	69.3 a \pm 7,001

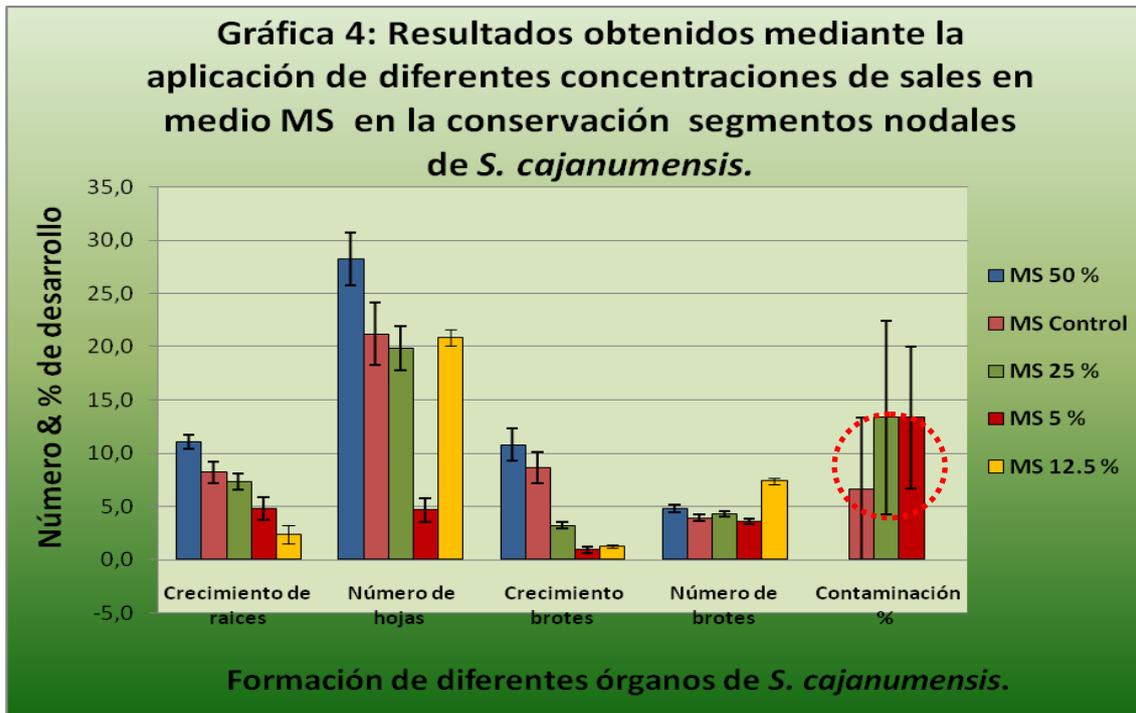
Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%, más error estándar.

Según Rojas et al, (2004) un balance adecuado de auxinas y citoquininas favorece a la rizogénesis y que altas concentraciones de citoquininas inhiben esta función, enuncia que por la polaridad de las plantas estas generan citoquininas en

la zona radical por consiguiente el aumento de estas evita la formación de raíces. De acuerdo a este enunciado se puede deducir que los segmentos nodales de *S. cajanumensis* tuvieron cantidades endógenas adecuadas de citoquininas y auxinas (Tratamiento control) para formar raíces. En los otros tratamientos las concentraciones hormonales exógenas indujeron a respuestas morfogénicas como callos y el desarrollo de brotes.

5.3. Conservación *In vitro*.

Los tejidos fueron evaluados por 180 días en diferentes concentraciones de medio MS con el fin de reducir el crecimiento de las plántulas para conservarlas a corto plazo.



⊗: Muestra barra de datos expresados en porcentajes la contaminación en los diferentes tratamientos aplicados.

5.3.1. Formación de raíces

De los segmentos nodales sembrados en las diferentes concentraciones de medio MS, se obtuvo menor crecimiento de raíces en: MS 12.5% con 2,40 centímetros y MS 5% con 4,80 centímetros por planta, seguido de MS al 25% con 7,33 centímetros. Con lo cual se evidenció diferencias significativas entre el tratamiento control y la concentración MS 12.5% seguido de MS 5%. (Anexo 4 & tabla 7).

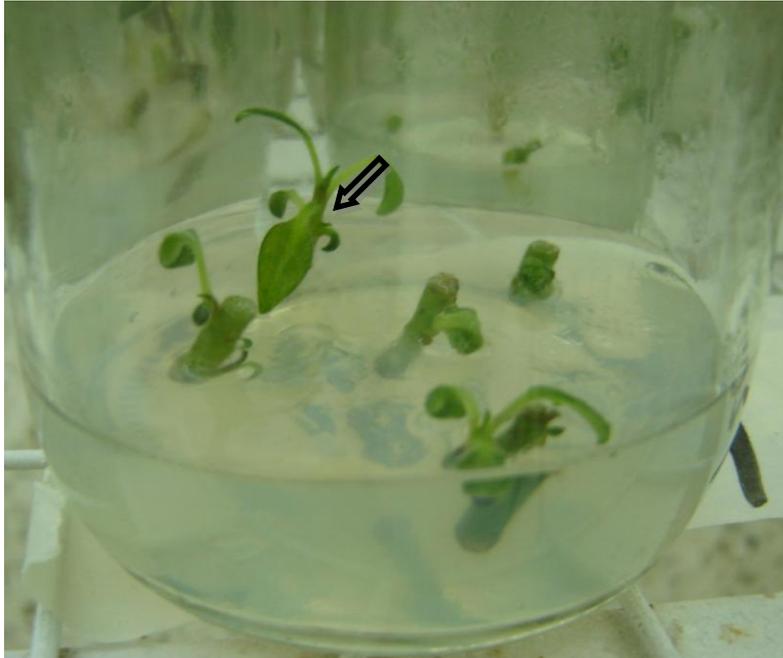


Foto 7: Segmentos nodales conservados durante 180 días sin evidencia de formación de raíces.

Tabla 7: Formación de raíces durante la conservación.

Diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962). mg/l	Promedio de raíces formadas
MS 50 %	11.1 a \pm 0,643
MS 25 %	7.33 b \pm 0,797
MS 12.5 %	2.40 c \pm 0,850
MS 5 %	4.8 bc \pm 1,038
Testigo MS %	8.2 ab \pm 1,029

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Se observó que a menor concentración de medio de cultivo (MS) menor es el crecimiento y la consistencia morfológica de las raíces. De la misma forma se evidenció superior crecimiento de raíces en concentraciones de sales en el medio (MS 50% & MS Testigo), y con una consistencia vigorosa.

5.3.2. Formación de hojas

El mayor número de hojas se presentó en medio MS al 50% con un promedio de 28 hojas por frasco y 6 hojas por explante, seguido por el medio control con 21 hojas por frasco y 4 por segmento. Sin embargo como el objetivo es reducir el crecimiento de los explantes los mejores resultados se obtuvieron en MS al 5% con un promedio de 4 hojas por frasco y una hoja por planta. Esto evidencia diferencias significativas entre diferentes tratamientos como se muestra en la (Tabla 8 & Anexos 5).

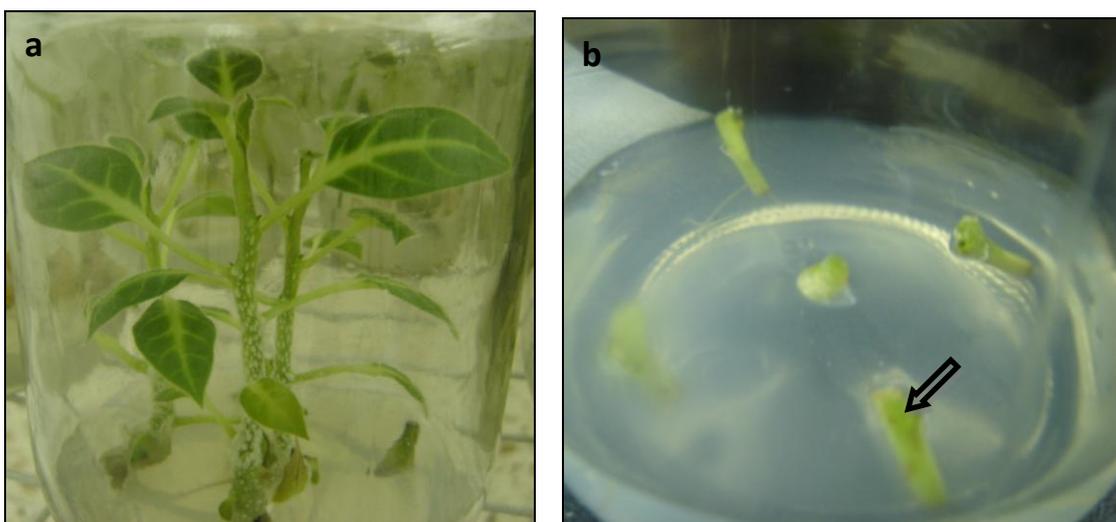


Foto 8: Formación de hojas en: a) MS 50% de su concentración. b) MS 5% de su concentración.

Tabla 8: Formación de hojas durante la conservación.

Diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962). mg/l	Promedio de formación de hojas
MS 50 %	28.267 a \pm 2,470
MS 25 %	19.867 b \pm 2,044
MS 12.5 %	20.867 b \pm 0,749
MS 5 %	4.667 c \pm 1,090
Testigo MS %	21.20 b \pm 2,913

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%, más error estándar

5.3.3. Formación y crecimiento de brotes.

El menor número de brotes se observaron en medio MS al 5% con un promedio de 3,6 brotes, seguido del tratamiento control y medio al 25% con 3,9 y 4,33 respectivamente (Tabla 9). Igualmente se demuestra diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Anexos 6).

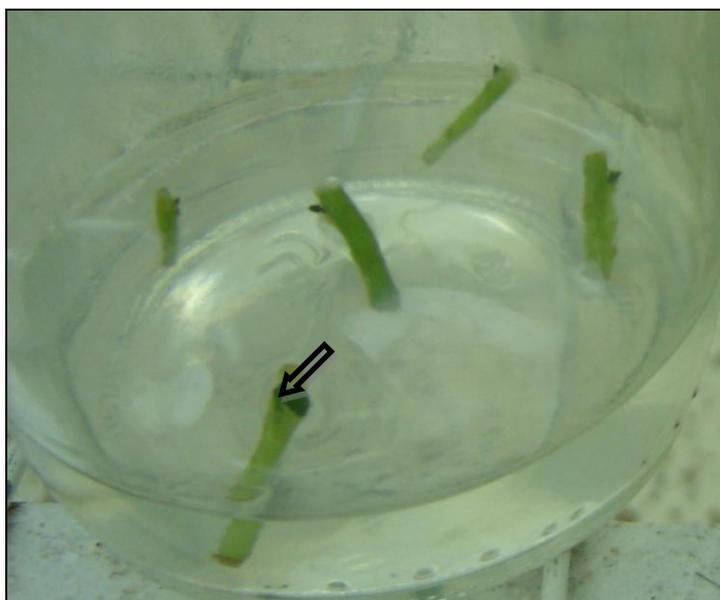


Foto 9: Brotes generados a partir de segmentos nodales en MS al 5% de su concentración a los 180 días.

Es importante mencionar que las yemas de algunos segmentos nodales desarrollaron brotes después de haber alcanzado la tapa del frasco y se las tomo en cuenta para la numeración.

Tabla 9: Número promedio de brotes existentes durante la conservación.

Diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).	Promedio de brotes/ explante
MS 50 %	4.80 b \pm 0,380
MS 25 %	4.33 bc \pm 0,270
MS 12.5 %	7.40 a \pm 0,273
MS 5 %	3.60 c \pm 0,273
Testigo MS %	3.93 bc \pm 0,300

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%, más error estándar.

Al igual que la insuficiente formación el menor crecimiento de brotes se reporto en medio al 5 %, seguido del medio MS al 12,5% con 0,9 y 1,3 centímetros respectivamente. Además del bajo crecimiento los brotes se caracterizaron por tener estructuras delgadas y verde-amarillas



Foto 10: Reducido crecimiento de brotes en MS al 5% a los 180 días.

Tabla 10: Crecimiento de brotes durante la conservación.

Diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962). mg/l	Promedio de crecimiento de brotes en centímetros.
MS 50 %	10.8 a \pm 1,500
MS 25 %	3.2 b \pm 0,317
MS 12.5 %	1.3 b \pm 0,153
MS 5 %	0.9 b \pm 0,308
Testigo MS %	8.7 a \pm 1,468

Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Tukey con un nivel de confianza del 95% más error estándar

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que al disminuir la concentración de sales minerales en el medio de cultivo MS se puede frenar el crecimiento de los órganos que se formaron a partir de segmentos nodales puestos a conservar sin causar daños a los tejidos. Esto concuerda con lo supuesto por Scocchi and Hebe, (2007) quienes expresan que al modificar las

concentraciones del medio, temperatura o condiciones de luz se puede retrasar el crecimiento *in vitro* de gran variedad de plantas manteniéndolos viables por largos periodos.

6. CONCLUSIONES

Germinación

- El método mecánico (corte y eliminación de la testa seminal), permitió la fácil emergencia de la radícula y posteriormente de la planta completa en un 96,6%.
- Al aplicar diferentes tipos de tratamientos pre-germinativos se puede concluir que aparentemente existe dormancia.

Inducción brotación

- La mayor formación de callo se dio en presencia de una mayor concentración de auxinas con una media de 86.3%.
- La presencia de los reguladores hormonales provoca la formación de tejidos hiperhídricos.
- A los 90 días se puede obtener el mayor número de brotes por diferenciación de yemas preexistentes en presencia de una alta concentración de citoquininas.

Conservación *in vitro*

- Se obtuvo menor crecimiento de raíces en: MS 12.5% con 2,40 centímetros y MS5% con 4,80 centímetros por planta.
- Los mejores resultados en la reducción del crecimiento de hojas se obtuvieron en MS al 5 % con un promedio de 4 hojas por frasco y una hoja por planta.
- El menor número de brotes se observaron en medio MS al 5% con un promedio de 3,6 brotes.
- Menor crecimiento de brotes se dio en medio MS con concentraciones bajas de sus componentes, 5 % Y 12,5%.

7. RECOMENDACIONES

Germinación.

- Aplicar otros tipos de escarificación química para activar la germinación, como el uso del ácido sulfúrico y temperatura.
- Hacer pruebas de germinación a nivel de campo ayudaran a mostrar los comportamientos de la semilla en el medio natural.
- Estudiar a profundidad la morfo-fisiología de la semilla ayudará y determinar el tipo de latencia y los factores que la causan.
- Realizar estudios de propagación asexual de *S. cajanumensis* que pueden resultar una buena opción en la propagación de esta especie.

Inducción a organogénesis.

- Estudiar la composición fisicoquímica de los explantes de *S. cajanumensis* para evaluar la cantidad de hormonas vegetales existentes de forma natural.
- Emplear medios de cultivos que ayuden a reducir la hiperhidricidad en los segmentos nodales durante el proceso de regeneración.
- Inducir a regeneración por embriogénesis somática.
- Determinar la concentración apropiada de auxinas y citoquininas para propagación de *S. cajanumensis*. de esta forma se podría hacer estudios profundos sobre la utilidad de esta especie para la alimentación.

Conservación *in vitro*

- Aplicar otros retardantes de crecimiento en segmentos nodales, como el manitol, ácido abscísico, sacarosa y modificar las condiciones ambientales y/o temperaturas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Bohs, L. 1989. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Econ. Bot.* 43: 143-163.
- Cárdenas, W., M.L. Zuloaga y M. Lobo. 2004. Latencia en semillas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (*Solanum betaceum* Cav Sendt) como aspecto básico para la conservación y el monitoreo de viabilidad de las colecciones. *Plant Genetic Resources Newsletter*
- Child, A. 1986. Taxonomic studies in *Solanum* L. (and related genera) 4, *Cyphomandra Casana* Child sp. nov. and *Solanum* sect. *Glaucophyllum* Child sect. nov. *Feddes Repert.* 97:143-146.
- Dyer WE. 1995. Exploiting Weed seed dormancy and germination requirements through agronomic practices. *Weed Science* 43:498–503.
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In vitro*.
- Espinosa A. John; Trillos G. O.; Hoyos S. R.; Afanador K. L. y Guillermo Correa L.. 2005. Potencial de propagación in Vitro para el tomate de árbol partenocarpico *Cyphomandra betacea* Cav. (Sendt).
- Hoyos, R. 1996. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt *in vitro* vía organogénesis. *en: Seminario orientación estratégica de la investigación agropecuaria en la universidad nacional de Colombia sede Medellín. Trabajos presentados. Universidad Nacional de Colombia, 1997. p. 50.*
- Hoyos, R; Giraldo, A. y Martínez, D. 1998. Establecimiento de estructuras callosas y suspensiones celulares de tomate de árbol (*Cyphomandra*

betacea). En: Seminario de frutales de clima frío moderado. Centro de desarrollo tecnológico de frutales (2: 1998: Manizales). Memorias del 2º Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales: Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales. Colombia.

- Idel Contreras Gatita y Jonathan Almeida. 2003. Micropropagación de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendth.), Solanaceae Silvestre en alimentación Humana. Laboratorios de Cultivos in vitro. Centro de ingeniería Genética¹. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Los Andes². Mérida, Venezuela.
- Jordán Z. Miguel. s.f. Establecimiento del explante.
- Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. 1989. Lost Crops of the Incas. Ad Hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation, Board on Science and Technology for International Development, National Research Council. ISBN: 978-0-309-07461-2, 428 pages, 6 x 9. EE.UU.
- Lizárraga Rolando; Panta A.; Espinoza N. y John H. Dodds. 1990. Cultivo de tejidos de *Ipomoea batatas*: micropropagación y conservación. Guía de investigación CIP32. Centro internacional de la Papa. Peru.
- Lobo Arias Mario. 2006. Recursos Genéticos y Mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. Colombia.
- Lobo M. 1988a. Investigaciones con semillas de lulo (*Solanum quitoense* Lam). Semillas 13(2):17–20. Colombia.
- Lobo M. 1988b. Recursos genéticos y desarrollo de variedades de frutales andinos. En: Memorias 1º Curso nacional de frutales de clima frío.

Técnicas de cultivo. 21–30 de Noviembre de 1988, ICA, Palmira, Medellín, Colombia. pp. 57–77.

- Morton, J. 1987. Tree Tomato. P. 437 – 440. In: Fruit of Warm Climates. Julia F. Morton, Miami, FL. EE.UU.
- Mroginski et al, s.f. Crioconservación del germoplasma. Cultivo de tejidos en la agricultura. capítulo 32. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina. CIAT. Cali, Colombia. NRC, Canada.
- N. Meza y J. Manzano. 2007. Características morfológicas de la semilla, procesos de Germinación y emergencia del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt). Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, estado Trujillo-Venezuela. 2UCLA Postgrado de Horticultura Lara, Venezuela. Rev. Fav. Agron. (LUZ). 2007, 24 Supl. 1: 271-275.
- PAL Shakti Prosad; Iftekhar Alam; M. Anisuzzaman; Kanak Kanti Sarker; Shamima Akhtar Sharmin, Mohammad Firoz Alam 2006. Indirect organogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). Plant Biotechnology Laboratory, department of Botany, Rajshahi University, Rajshahi-6205 – Bangladesh. Turk J Agric For 31 (2007) 63-70. ÜBçTAK.
- Parraguez, L. 1991. Micropropagación e inducción de variación somaclonal en mora cultivada. Universidad Católica de Chile. Stgo. 83 p.
- Pierk, R.L.M. 1988. Cultivos *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, 326 pp.
- Portela Silvina I. 1999. Fisiología y manejo de postcosecha del tamarillo (*Cyphomandra betacea*). Avances en horticultura. Department of Vegetable Crops. University of California. Davis, CA 95616. Estados Unidos de América.

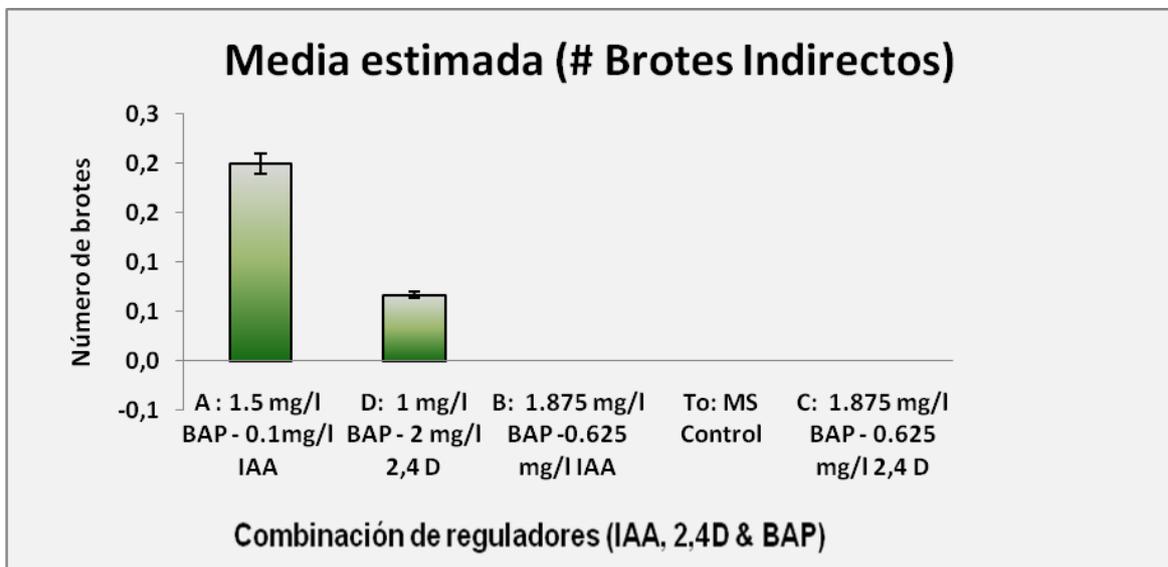
- Prohens Jaime; Juan J. Ruiz y Fernando Nuez. 1997. Tomate de árbol, un cultivo prometedor para regiones de clima Mediterraneo. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46020. España.
- Raghavan V. 2002. Induction of vivipary in *Arabidopsis* by silique culture: implications for seed dormancy and germination. *American Journal of Botany* 89(5):766–776.
- Reina Carlos E.; Maria Herdy G. y Olmer Tovar C. 1998. Manejo, poscosecha y evaluación de la calidad para tomate de arbol (*Cyphomandra betacea* Cav. Sendt) que se comercializan en la zona de Neiva. Universidad Sur colombiana. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería Agrícola. Neiva, Colombia.
- Remache Caraguay Maritza C. 2006. “Regeneración *in vitro* de *S. betaceum*, Cav. (Tomate de árbol) a través de embriogénesis somática y organogénesis indirecta”. Tesis de Ingeniería Ambiental. Ecuador.
- Reyes & Sanabria., 1993. Tomate de árbol. *Cyphomandra betacea* (Cav) Sendtn. Instituto de Ecología, México. Universidad del Cauca, Colombia. ETNOBOTANICA.
- Roca W. M.; Arias D. I. Y R Chávez. 1989. Métodos de conservación de germoplasma *in vitro*. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.
- Roca, W. and Mrogniski, L. 1991. Fundamentos y aplicaciones. Regeneración de plantas en cultivo de tejidos, embriogénesis somáticas y organogénesis. 970 p.

- Rojas G. Salvador, García L. Jairo y Alarcón R. Melva. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. CORPOICA. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología, Pronatta. Impreso en Colombia.
- S. Jayasankar. B. R. Z. Li. D.J. 2002. Gray. A unique morphotype of grapevine somatic embryos exhibits accelerated Germination and early plant development..Mid-Florida research and Education Center.
- Sánchez et al, 1996. Manejo Integrado del cultivo de Tomate de árbol. Editorial Fiat Panis.
- Sant R., Panis B., Taylor M., Tyagi A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. Plant Cell Tiss Organ Cult. 92: 107-111.
- Scocchi Adriana; Rey Hebe. 2007. Conservación de germoplasma in vitro. V.-Capítulo 3
- Skoog, F. y Miller, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology 11: 118- 130.
- Suárez Chacón Juan P. 2003. Obtención de las concentraciones optimas de reguladores de crecimiento para la micropropagación de tomate de árbol con liderando cuatro tipos de segmentos vegetales. Tesis de Biología Cuenca – Ecuador.
- Terranova, Enciclopedia. 1995. Producción Agrícola 1. Panamericana Formas e Impresos S.A. Bogotá, D. C, Colombia.

- Torres Alba Marina & Ellis Richard. 2007. Latencia de semillas de frutas tropicales. Universidad del valle. Departamento de biología. Póster presentado en el IV Congreso Colombiano de Botánica, Medellín, Colombia.
- Walck JL, Hidayati SN, Okagami N. 2002. Seed germination ecophysiology of the Asian species *Osmorhiza aristata* (Apiaceae): Comparison with its Northamerican congeners and implications for evolution of types of dormancy. *American Journal of Botany* 89(5):829–835. EE. UU.
- Withers, L.A. 1980. Tissue cultura storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. Roma, Italia.

9. ANEXOS

Anexo 1: % de formación de callo en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a los 90 días.



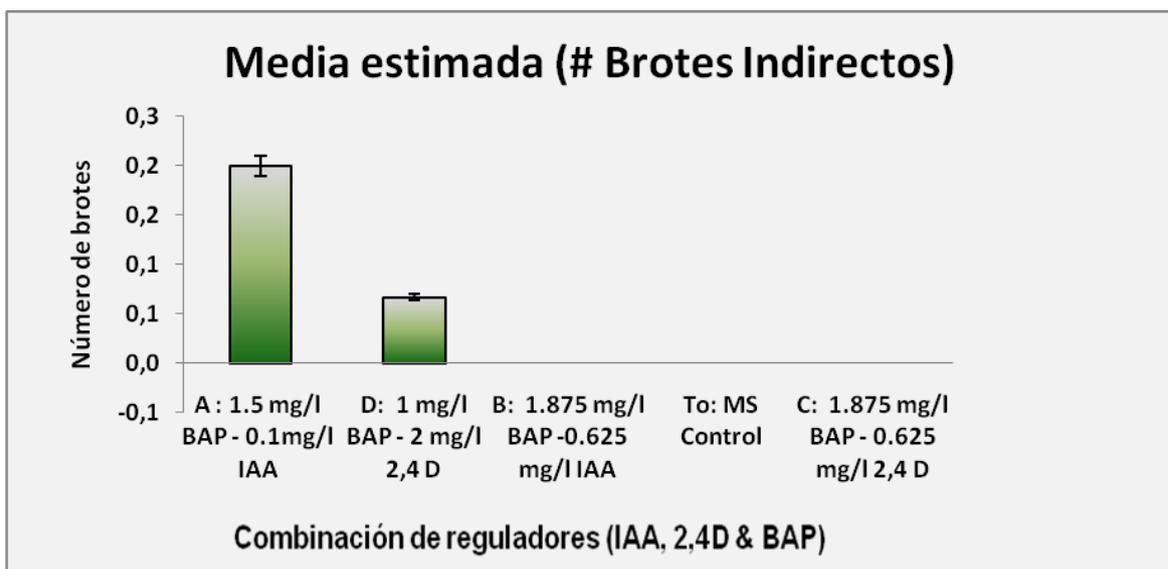
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (% formación del callo).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
C vs To	86,333	21,712	2,217	< 0,0001	0,185	Si
C vs A	49,533	12,457	2,167	< 0,0001	0,143	Si
C vs B	45,667	11,485	2,098	< 0,0001	0,098	Si
C vs D	2,000	0,503	1,994	0,617	0,050	No
D vs To	84,333	21,209	2,167	< 0,0001	0,143	Si
D vs A	47,533	11,954	2,098	< 0,0001	0,098	Si
D vs B	43,667	10,982	1,994	< 0,0001	0,050	Si
B vs To	40,667	10,227	2,098	< 0,0001	0,098	Si
B vs A	3,867	0,972	1,994	0,334	0,050	No
A vs To	36,800	9,255	1,994	< 0,0001	0,050	Si

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada (% callo)	Grupos		
C	86,333	A		
D	84,333	A		
B	40,667		B	
A	36,800		B	
To	0,000			C

Anexo 2: Número de brotes generados de yemas preexistentes en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a los 90 días.



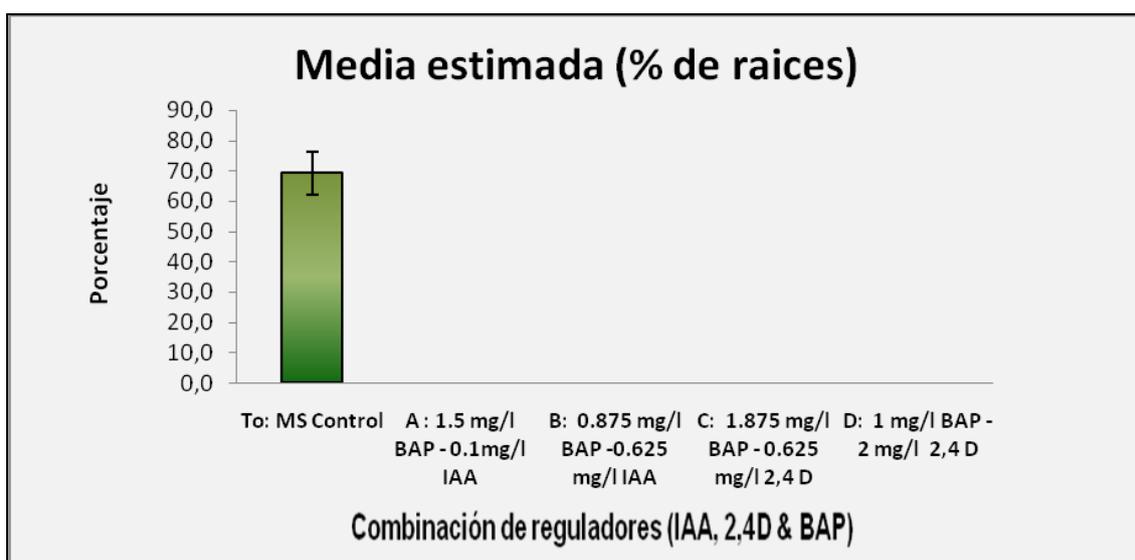
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (número de diferenciación de yemas).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
A vs To	5,200	5,827	2,217	< 0,0001	0,185	Si
A vs C	5,200	5,827	2,167	< 0,0001	0,143	Si
A vs D	4,267	4,781	2,098	< 0,0001	0,098	Si
A vs B	0,400	0,448	1,994	0,655	0,050	No
B vs To	4,800	5,379	2,167	< 0,0001	0,143	Si
B vs C	4,800	5,379	2,098	< 0,0001	0,098	Si
B vs D	3,867	4,333	1,994	< 0,0001	0,050	Si
D vs C	0,933	1,046	1,994	0,299	0,050	No
D vs To	0,933	1,046	2,098	0,551	0,098	No
C vs To	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos	
A	10,067	A	
B	9,667	A	
D	5,800		B
To	4,867		B
C	4,867		B

Anexo 3: Formación de raíces en medio con reguladores de crecimiento.



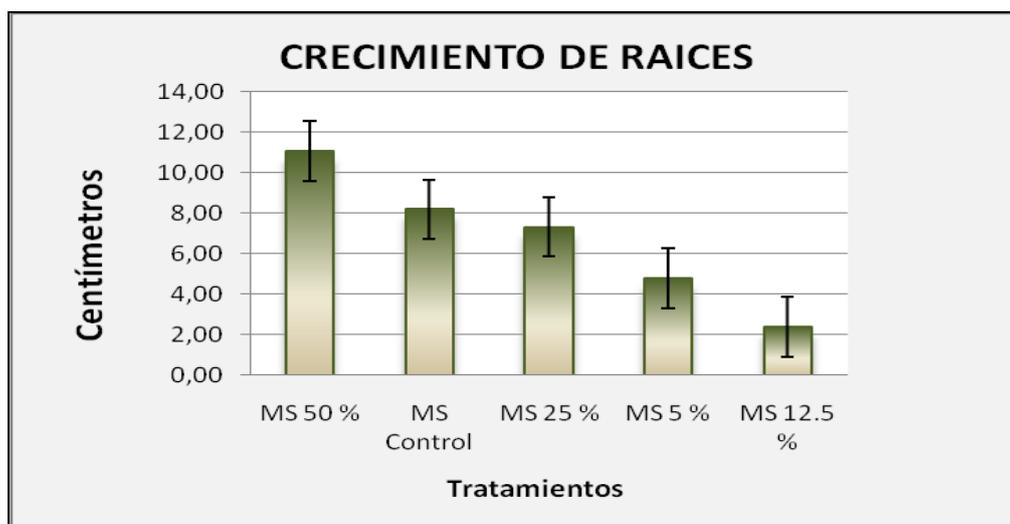
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (número de diferenciación de yemas).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
To vs A	69,333	15,658	2,217	< 0,0001	0,185	Si
To vs B	69,333	15,658	2,167	< 0,0001	0,143	Si
To vs C	69,333	15,658	2,098	< 0,0001	0,098	Si
To vs D	69,333	15,658	1,994	< 0,0001	0,050	Si
D vs A	0,000	0,000	2,167	1,000	0,143	No
D vs B	0,000	0,000	2,098	1,000	0,098	No
D vs C	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No
C vs A	0,000	0,000	2,098	1,000	0,098	No
C vs B	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No
B vs A	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada (% de raíces)	Grupos	
To	69,333	A	
A	0,000		B
B	0,000		B
C	0,000		B
D	0,000		B

Anexo 4: Crecimiento de raíces en diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).



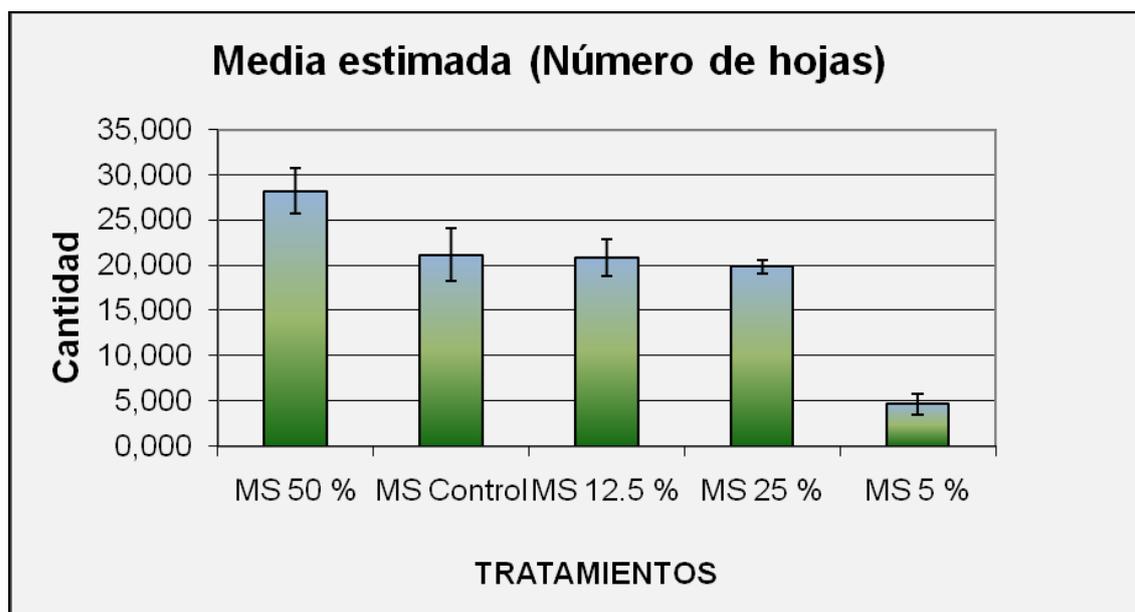
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (crecimiento de raíces).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
MS 50 % vs MS 12.5 %	8,667	6,932	2,217	< 0,0001	0,185	Si
MS 50 % vs MS 5 %	6,267	5,012	2,167	< 0,0001	0,143	Si
MS 50 % vs MS 25 %	3,733	2,986	2,098	0,011	0,098	Si
MS 50 % vs MS Control	2,867	2,293	1,994	0,025	0,050	Si
MS Control vs MS 12.5 %	5,800	4,639	2,167	0,000	0,143	Si
MS Control vs MS 5 %	3,400	2,719	2,098	0,022	0,098	Si
MS Control vs MS 25 %	0,867	0,693	1,994	0,490	0,050	No
MS 25 % vs MS 12.5 %	4,933	3,946	2,098	0,001	0,098	Si
MS 25 % vs MS 5 %	2,533	2,026	1,994	0,047	0,050	Si
MS 5 % vs MS 12.5 %	2,400	1,920	1,994	0,059	0,050	No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos		
MS 50 %	11,067	A		
MS Control	8,200		B	
MS 25 %	7,333		B	
MS 5 %	4,800			C
MS 12.5 %	2,400			C

Anexo 5: Formación de hojas en diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).



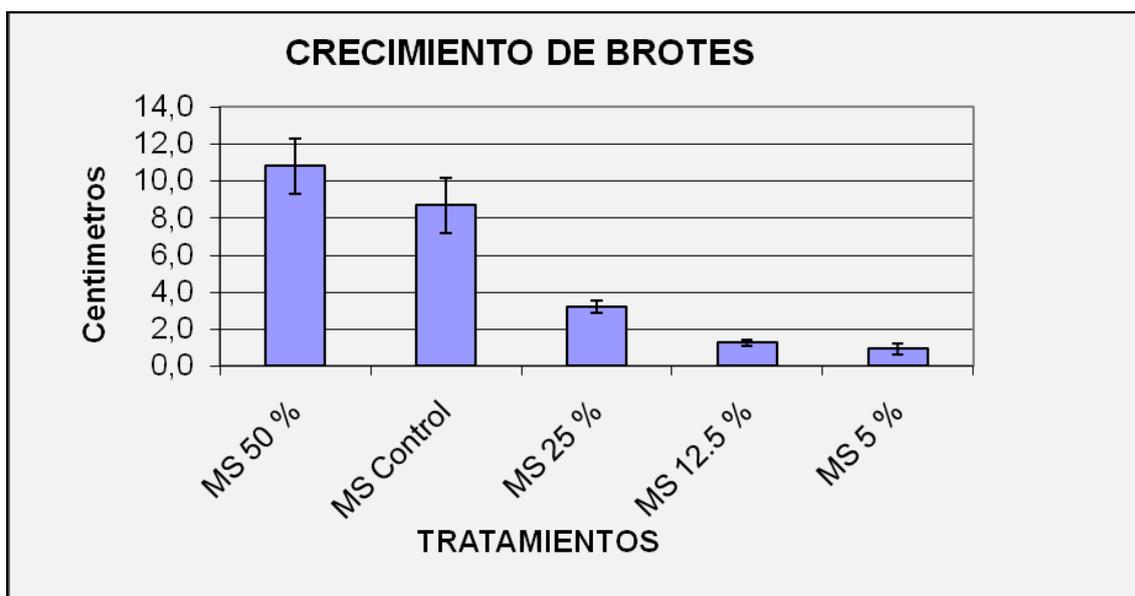
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (número de hojas).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
MS 50 % vs MS 5 %	23,600	8,238	2,217	< 0,0001	0,185	Si
MS 50 % vs MS 25 %	8,400	2,932	2,167	0,023	0,143	Si
MS 50 % vs MS 12.5 %	7,400	2,583	2,098	0,031	0,098	Si
MS 50 % vs MS Control	7,067	2,467	1,994	0,016	0,050	Si
MS Control vs MS 5 %	16,533	5,772	2,167	< 0,0001	0,143	Si
MS Control vs MS 25 %	1,333	0,465	2,098	0,888	0,098	No
MS Control vs MS 12.5 %	0,333	0,116				No
MS 12.5 % vs MS 5 %	16,200	5,655	2,098	< 0,0001	0,098	Si
MS 12.5 % vs MS 25 %	1,000	0,349	1,994	0,728	0,050	No
MS 25 % vs MS 5 %	15,200	5,306	1,994	< 0,0001	0,050	Si

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos		
MS 50 %	28,267	A		
MS Control	21,200		B	
MS 12.5 %	20,867		B	
MS 25 %	19,867		B	
MS 5 %	4,667			C

Anexo 6: Crecimientos de brotes en diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).



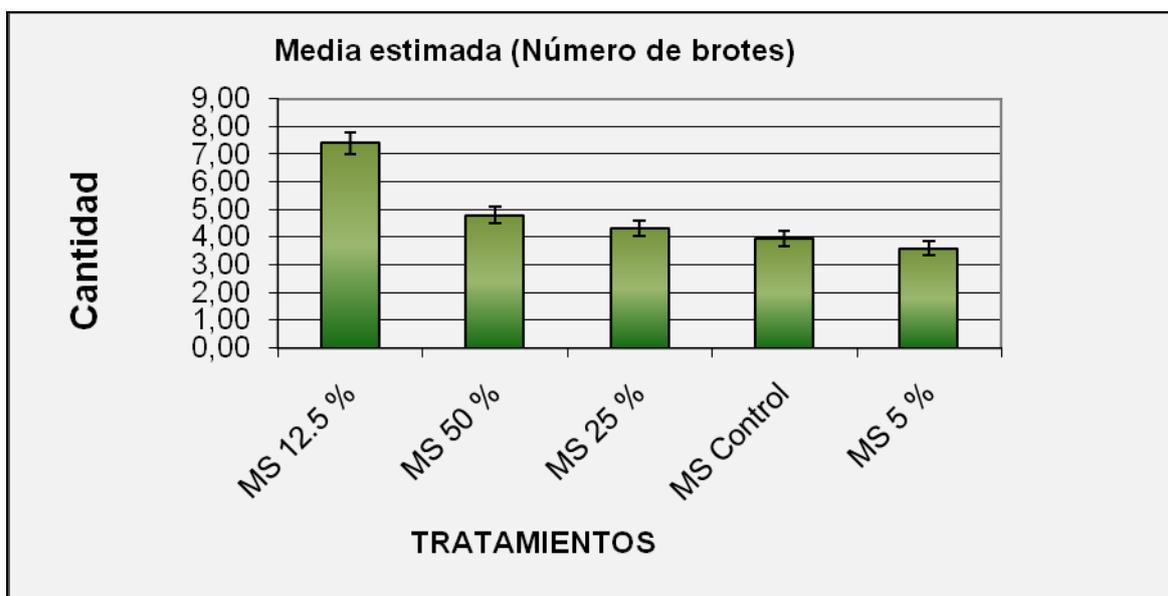
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (crecimiento de brotes).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
MS 50 % vs MS 5 %	9,860	7,249	2,217	< 0,0001	0,185	Si
MS 50 % vs MS 12.5 %	9,533	7,009	2,167	< 0,0001	0,143	Si
MS 50 % vs MS 25 %	7,587	5,578	2,098	< 0,0001	0,098	Si
MS 50 % vs MS Control	2,133	1,569	1,994	0,121	0,050	No
MS Control vs MS 5 %	7,727	5,681	2,167	< 0,0001	0,143	Si
MS Control vs MS 12.5 %	7,400	5,441	2,098	< 0,0001	0,098	Si
MS Control vs MS 25 %	5,453	4,010	1,994	0,000	0,050	Si
MS 25 % vs MS 5 %	2,273	1,671	2,098	0,223	0,098	No
MS 25 % vs MS 12.5 %	1,947	1,431	1,994	0,157	0,050	No
MS 12.5 % vs MS 5 %	0,327	0,240	1,994	0,811	0,050	No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos	
MS 50 %	10,800	A	
MS Control	8,667	A	
MS 25 %	3,213		B
MS 12.5 %	1,267		B
MS 5 %	0,940		B

Anexo 7: Número de brotes formados en diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).



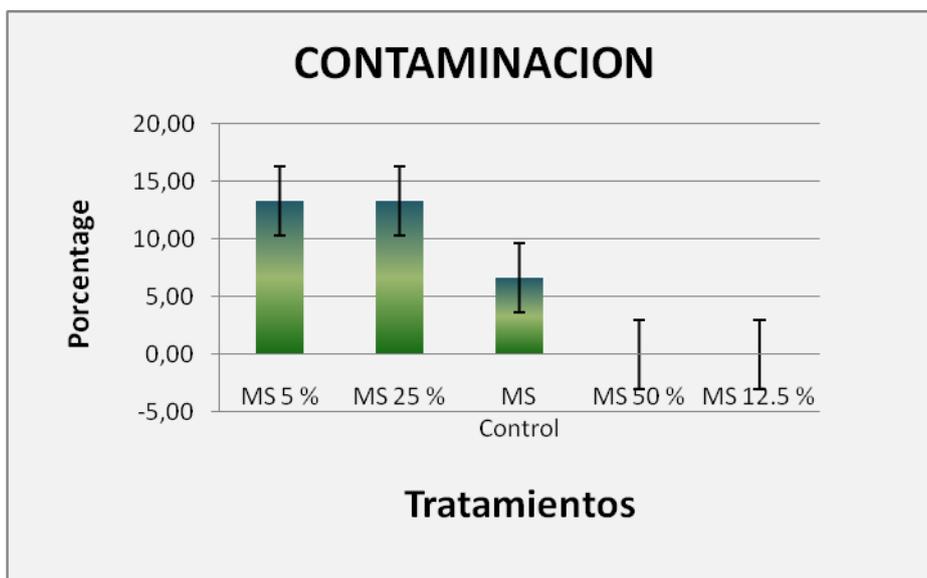
Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (crecimiento de brotes).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
MS 12.5 % vs MS 5 %	3,800	8,893	2,217	< 0,0001	0,185	Si
MS 12.5 % vs MS Control	3,467	8,113	2,167	< 0,0001	0,143	Si
MS 12.5 % vs MS 25 %	3,067	7,176	2,098	< 0,0001	0,098	Si
MS 12.5 % vs MS 50 %	2,600	6,084	1,994	< 0,0001	0,050	Si
MS 50 % vs MS 5 %	1,200	2,808	2,167	0,032	0,143	Si
MS 50 % vs MS Control	0,867	2,028	2,098	0,113	0,098	No
MS 50 % vs MS 25 %	0,467	1,092				No
MS 25 % vs MS 5 %	0,733	1,716	2,098	0,206	0,098	No
MS 25 % vs MS Control	0,400	0,936				No
MS Control vs MS 5 %	0,333	0,780				No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos		
MS 12.5 %	7,400	A		
MS 50 %	4,800		B	
MS 25 %	4,333		B	C
MS Control	3,933		B	C
MS 5 %	3,600			C

Anexo 8: Contaminación generada durante el proceso de conservación en diferentes concentraciones de medio MS (Murashige & Skoog 1962).



Test de Duncan/ análisis de la diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza del 95% (contaminación).

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	alfa (Modificado)	Significativo
MS 5 % vs MS 50 %	0,667	1,456	2,217	0,594	0,185	No
MS 5 % vs MS 12.5 %	0,667	1,456	2,167	0,469	0,143	No
MS 5 % vs MS Control	0,333	0,728	2,098	0,748	0,098	No
MS 5 % vs MS 25 %	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No
MS 25 % vs MS 50 %	0,667	1,456	2,167	0,469	0,143	No
MS 25 % vs MS 12.5 %	0,667	1,456	2,098	0,318	0,098	No
MS 25 % vs MS Control	0,333	0,728	1,994	0,469	0,050	No
MS Control vs MS 50 %	0,333	0,728	2,098	0,748	0,098	No
MS Control vs MS 12.5 %	0,333	0,728	1,994	0,469	0,050	No
MS 12.5 % vs MS 50 %	0,000	0,000	1,994	1,000	0,050	No

Agrupación y ordenamiento de los grupos significativamente diferentes.

Categoría	Media estimada	Grupos
MS 5 %	0,667	A
MS 25 %	0,667	A
MS Control	0,333	A
MS 50 %	0,000	A
MS 12.5 %	0,000	A

Anexo 9: Resultados de germinación, regeneración y conservación de *S. cajanumensis* *in vitro*.

Proceso de germinación y emergencia de *S. cajanumensis*.



Proceso de emergencia



Plántulas criptocolas

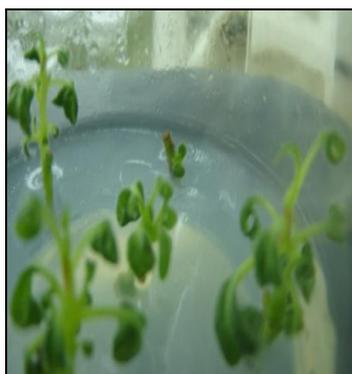


Plántulas desarrolladas

Formación de callos en diferentes concentraciones de BAP, IAA, 2,4D.



1.5 mg/l BAP - 0.1mg/l IAA



0.875 mg/l BA -0.625 mg/l IAA



1 mg/l BAP -2 mg/l 2,4 D

Conservación *in vitro* en diferentes concentraciones de medio MS.



MS Control (100%)



MS al 25 %



MS al 12,5 %