

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TOMATE DE ÁRBOL  
(*Solanum betaceum Cav.*)**

**Trabajo de investigación.**

**VLASTIMIL JAVIER ZAK GOMEZ**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
Para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos.

Quito, 17 de mayo del 2016

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO  
USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TOMATE DE ÁRBOL  
(*Solanum betaceum Cav.*)**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**VLASTIMIL JAVIER ZAK GOMEZ**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Venancio Arahana , PhD

Firma del profesor

---

Quito, 17 de mayo del 2016

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Vlastimil Javier Zak Gómez

Código: 00101087

Cédula de Identidad: 1725799918

Lugar y fecha: Quito, 17 mayo del 2016

## RESUMEN

*Solanum betaceum* conocido como tomate de árbol, es un arbusto frutal nativo de la región andina. En Ecuador, se lo cultiva en varias provincias de la sierra, en donde se le da usos variados entre los cuales se destaca su consumo gastronómico. Es rico en proteínas, vitaminas, minerales y pectinas, que le confieren propiedades nutricionales, medicinales y útiles en la industria alimenticia. Su producción y comercialización en el país se ve afectada por la falta de uniformidad en las siembras, sensibilidad a enfermedades y plagas. En este sentido, los procesos de regeneración in vitro a partir de células y tejidos pueden potenciar los esfuerzos de mejoramiento, tanto en la propagación masiva de genotipos élite, como en la estandarización de las siembras y la obtención de plantas libres de patógenos. El objetivo de este estudio fue establecer un protocolo de embriogénesis somática en tomate de árbol, para lo cual se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962 (MS) y se probó varias concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y la reducción de la concentración de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) respecto de la establecida para el medio MS. Se usó la variedad de tomate de árbol rojo puntón, de cuyas semillas se extrajo los ejes embrionarios y éstos se cultivaron en medio MS suplementado con 9% de sacarosa. El tratamiento con mayor éxito fue MS suplementado con ANA en concentraciones de 4,5 mg/L + 9 % sacarosa en combinación con 400 mg/L nitrato de amonio con un 51,25% de embriogénesis. Los embriones se formaron a los 15 días y luego regeneraron plántulas en medio MS basal, con un porcentaje de éxito del 80%. Las plantas obtenidas fueron aclimatadas con 78% de eficiencia, y transferidas a macetas para su desarrollo en el invernadero.

**Palabras clave:** Eje embrionario, inducción embrionaria, ácido naftalenacético, nitrato de amonio, micropropagación clonal.

## ABSTRACT

*Solanum betaceum*, also known as Tamarillo, is a fruit shrub native to the Andean region. In Ecuador it is grown in several provinces of the highlands, where it is used for several purposes among which gastronomical consumption is the most important. Tamarillo fruit is rich in protein, vitamins, minerals and pectin, which confer it nutritional and medicinal properties, and can also be useful in the food industry. *S. betaceum* production and commercialization in the country is affected by the lack of crop uniformity and its susceptibility to some diseases and pests. In this regard, the in vitro regeneration processes from cells and tissues may enhance breeding efforts, either for the massive propagation of elite genotypes as well as for crop standardization and the development of pathogen free plants. The objective of this study was to apply a somatic embryogenesis protocol on tamarillo, for which various concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) and reduced concentrations of ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) respect to that prescribed for Murashige and Skoog (1962) medium were tested. The "Red" variety of *Solanum betaceum* was used and the embryonic axis was extracted from the seeds and cultured on MS medium supplemented with 9% sucrose. The best combination for somatic embryogenesis induction was found to be MS medium supplemented with 4.5 mg / L NAA and 400 mg / L of ammonium nitrate ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) with 51.25% of somatic embryogenesis. Somatic embryos were obtained after 15 days of culturing and plants regenerated from them on MS basal medium with 80 % success. The obtained plants were acclimatized with 78 % of efficiency and finally placed in pots at the greenhouse.

**Key words:** Embryonic axis, Naphthalene acetic acid, Ammonium Nitrate, Somatic embryogenesis, clonal micro-propagation.

## Tabla de Contenido

<b>1. Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Importancia, producción y comercialización de <i>S. betaceum</i> en el Ecuador.....</b>	<b>11</b>
1.2 Cultivo in vitro de <i>S. betaceum</i> .....	12
1.3 Embriogénesis Somática.....	14
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>17</b>
2.1 <b>Objetivo general</b> .....	<b>17</b>
2.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Justificación .....</b>	<b>17</b>
<b>4 Área de estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Materiales .....</b>	<b>20</b>
5.1. <b>Siembra de semillas y preparación de medios de cultivo.</b> .....	<b>20</b>
5.2. <b>Inducción de embriogénesis somática</b> .....	<b>21</b>
5.3. <b>Aclimatación.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Métodos.....</b>	<b>21</b>
6.1. <b>Material vegetal.....</b>	<b>21</b>
6.2. <b>Ensayos exploratorios preliminares</b> .....	<b>22</b>
6.4. <b>Preparación del medio de cultivo.</b> .....	<b>22</b>
6.5. <b>Desinfección de semillas y extracción de los ejes embrionarios</b> .....	<b>23</b>
6.6. <b>Ensayos de variación de la concentración de ANA.....</b>	<b>23</b>
6.7. <b>Ensayos de reducción de la concentración de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.....</b>	<b>24</b>
6.8. <b>Inducción y cultivo in vitro de embriones somáticos.</b> .....	<b>25</b>
6.8 <b>Aclimatación de las plántulas.....</b>	<b>25</b>
6.9. <b>Toma de Datos y análisis estadístico.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Resultados.....</b>	<b>27</b>
7.1. Efecto de la variación de ANA en la inducción de embriogénesis somática en <i>S. betaceum</i> .....	27
<b>7.1.1. Ensayo 1</b> .....	<b>27</b>
<b>7.1.2. Ensayo 2</b> .....	<b>28</b>
7.2. Efecto de la disminución de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , en la embriogénesis somática de tomate de árbol	29
<b>7.2.1. Ensayo 3</b> .....	<b>29</b>
<b>7.2.2. Ensayo 4</b> .....	<b>31</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>33</b>
8.1. Efecto de la variación de ANA. ....	34

8.2 Efectos de la variación de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ en la embriogénesis.....	36
8.3. Inducción de embriones y aclimatación.....	40
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>41</b>
<b>10. Recomendaciones .....</b>	<b>41</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>42</b>
<b>12. Tablas.....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla No. 1: (Ensayo 1).....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla No. 2: (Ensayo 2).....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla No. 3 :(Ensayo 3).....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla No. 4: (Ensayo 4).....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla No. 5 Test de varianza ANOVA en el ensayo 1 con variaciones en la concentración de ANA. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla No. 6 Test de varianza ANOVA en el ensayo 2 con variaciones en la concentración de ANA. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla No. 7 Test de varianza ANOVA d en el ensayo 3 con variaciones en la concentración de Nitrato de amonio.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla No. 8 Test de varianza ANOVA en el ensayo 4 con variaciones en la concentración de Nitrato de amonio.....</b>	<b>47</b>
Tabla No. 9. Prueba de Tukey para porcentaje de embriogénesis somática al variar las concentraciones de ANA, en los ensayos 1 y 2. ....	48
Tabla No. 10. Prueba de Tukey para porcentaje de embriogénesis somática al variar las concentraciones de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ en los ensayos 3 y 4.....	48
<b>13. Figuras.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura No. 1 . S. betaceum en estado de inducción embrionaria.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura No. 2 .Embrion somático obtenido con variaciones en ANA .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura No. 3 .Embrion somático obtenido con variaciones en Nitrato de amonio .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura No. 4 .Plántula de S. betaceum en estado de aclimatación.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura No. 5 .Plántula de S. betaceum transferida a tierra .....</b>	<b>52</b>
<b>Figura No. 6 .Plántulas de S. betaceum transferidas a tierra en invernadero .....</b>	<b>53</b>
<b>Figura No. 7 Gráfico de porcentajes de embriogénesis ensayo 1 y 2.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura No. 8 . Gráfico de porcentajes de embriogénesis ensayo 3 y 4.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura No. 9 Gráfico de porcentajes de calogénesis ensayo 1 y 2.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura No. 10 Gráfico de porcentajes de calogénesis ensayo 3 y 4.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura No. 11 . Dias de espera para aparición de callos/embriones ensayo 1 y 2.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura No. 12 . Dias de espera para aparición de callos / embriones ensayo 3 y 4 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura No. 13 . Tamaño en mm para los embriones obtenidos en los ensayos 1 y 2.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura No. 14 . Tamaño en mm para los embriones obtenidos en los ensayos 3 y 4.....</b>	<b>57</b>





# APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum Cav.*)”

## 1. Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*), es un arbusto semileñoso de 2 a 3 metros de altura nativo de los Andes subtropicales y de América tropical. Hasta hace algunos años, se sostenía que el tomate de árbol era nativo de la región andina, principalmente de la vertiente oriental de Perú, Ecuador y Colombia (Correira y Marquez, 2011). Investigaciones recientes llevadas a cabo en los últimos 10 años, señalan que el tomate de árbol cultivado, está estrechamente relacionado con un complejo de materiales silvestres bolivianos de acuerdo a evidencias moleculares, estudios morfológicos y datos de campo (CORPOICA, 2010). Sólo se lo conoce en estado cultivado y se cree que su domesticación y cultivo son anteriores al descubrimiento de América (Orwa et al., 2009).

Es una especie de climas templados y fríos, crece a una temperatura de entre 13° a 24° C siendo la óptima entre 16° y 19° C. No necesita gran humedad atmosférica, razón por la cual, se cultiva frecuentemente en zonas altas de clima seco. Se desarrolla en una amplia gama de suelos, siendo los mejores los de textura franca y ricos en materia orgánica (Cevallos et al., 2004).

Florece durante la transición de verano a otoño, pero puede sin embargo florecer en otras épocas del año. La polinización es principalmente autógama, lo que puede explicar la baja variabilidad observada en poblaciones y sembríos de esta especie (Correira y Canhoto, 2010).

El color del epicarpio y de la pulpa de los frutos puede variar, pudiendo ser, entre los principales y más comunes, naranja oscuro, amarillo y rojo (Lister et al., 2005)

En el Ecuador no existe una clasificación clara de los ecotipos del tomate de árbol, lo que ha dado lugar a confusiones en su denominación. Las principales variedades conocidas son: Amarillo, Redondo, Puntón (común), Rojo, Amarillo Gigante, Mora (Neozelandés) y Mora Ecuatoriano. La variedad roja (preferida por el consumidor en ciertos casos) muestra un sabor un tanto más dulce y un valor nutricional ligeramente más alto que la amarilla (Revelo., et al 2008). El contenido de ácido cítrico varía entre 1.8 y 2.2 % y sus niveles de azúcar son más elevados con relación a la variedad amarilla (Meadows, 2010). Los frutos de la variedad amarilla por su parte tienen mayor acidez (ácido cítrico entre 2.1 y 2.4%) y niveles más bajos de azúcar (Lister et al., 2005).

El tomate de árbol representa una alternativa saludable y de alto valor nutricional para la dieta humana. Los frutos de tomate de árbol tienen un contenido relativamente alto de proteínas (2g/ 100g), vitamina C (30-45mg / 100 g), vitamina E (1.86mg / 100g), provitamina A, entre 800-1200 iu de carotenos y algunos minerales como potasio y hierro. Además su contenido de carbohidratos es bajo con relación a su aporte de fibra correspondiente (Canhoto et al., 2005).

## **1.1 Importancia, producción y comercialización de *S. betaceum* en el Ecuador**

En el Ecuador existen varias regiones dedicadas al cultivo de *S. betaceum*, sin embargo, la producción es escasamente industrial; la mayoría es realizada por campesinos de las zonas rurales, en lotes pequeños y poco tecnificados. De acuerdo al informe del INEC (2014), a través de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria (ESPAC), la producción del tomate de árbol está concentrada en la región Sierra con un 62,96% de la producción nacional y parte en la Amazonia con un 37,04%. La producción en toneladas métricas (Tm), se sitúa en: Tungurahua con 3981 Tm; Imbabura con 4146 Tm; Napo con 398 Tm; Chimborazo 1120 Tm; Carchi con 682 Tm y el resto de provincias 3687 Tm (INEC, 2014).

Los principales destinos de las exportaciones ecuatorianas de tomate de árbol en los últimos 5 años han sido Estados Unidos, España y Chile. Estados Unidos es el principal socio comercial ecuatoriano captando un 53% de las exportaciones totales de tomate de árbol. El segundo mercado más importante para el Ecuador es España que en promedio ha receptado el 45% de las exportaciones de tomate de árbol en valores FOB. En tercer lugar de los principales mercados ecuatorianos para tomate de árbol se encuentra Chile con apenas un 2% de total de las exportaciones (CORPEI, 2013).

## **1.2 Cultivo in vitro de *S. betaceum*.**

Una alternativa a la propagación convencional y sus limitantes, es la utilización de procedimientos basados en el cultivo in vitro (Bajaj, 2000). La capacidad de establecer un cultivo de raíces, hojas, brotes e incluso segmentos de tallo, regenerar plantas completas y aclimatarlos, son elementos básicos del cultivo in vitro y la micro propagación vegetativa (Chevreau y Thibault, 1992). Los mismos métodos pueden aplicarse para el cultivo de meristemas, en donde es posible desarrollar plantas libres de patógenos, al aplicar técnicas conjuntas de termoterapia y crio-preservación (Apraez et al., 2012).

El Medio Murashige y Skoog (MS), fue desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal en *Nicotiana tabacum* y es uno de los medios que se utiliza comúnmente en para el cultivo in vitro de material vegetal (Ankita y Handique, 2010). Además su aplicación generalmente se ve asociada al uso de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas.

Los reguladores de crecimiento juegan un papel clave y determinan las vías de desarrollo de las células vegetales, estos se clasifican generalmente en los siguientes grupos: auxinas, citoquininas y giberelinas. Las auxinas más comúnmente utilizadas en cultivo vegetal incluyen: Ácido 3 - Indol acético (IAA), Acido Naftalenacético (ANA), Acido Indol- Butírico (IBA) y 2,4-Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Jimenez, 2001). Las citoquininas más comúnmente utilizadas incluyen 6- Benzilaminopurina (BAP), 6-Dimethylaminopurina (2iP), Kinetina (N-2-Furanylmetil-1H-purina-6 amino), entre otras (Skoog & Miller, 1957).

La combinación de los factores hormonales, dentro del sistema in vitro, permite la propagación de plantas completas a partir del material seleccionado, logrando mantener un material de élite, viable y vigoroso para su adecuada utilización en estudios de laboratorio y micropropagación vegetativa (Correira y Canhoto, 2010).

Se han realizado algunos estudios para la propagación in vitro de *S. betaceum*. Un estudio realizado por Jordan y Obando (2001), reporta la regeneración exitosa utilizando brotes axilares en medio basal MS y reguladores de crecimiento como Acido Naftalenacético (ANA), benzil amino purina (BAP) y Acido Giberélico (GA3). Además se reportó un protocolo eficiente para la micropropagación y desarrollo de plantas de *S. betacuem* usando explantes de brotes axilares y flores de árboles maduros, el medio utilizado fue MS basal, suplementado con reguladores de crecimiento como: BAP, Kinetina y ANA (Rodriguez et al., 2011).

En el Ecuador también se han realizado estudios de micro propagación de esta especie, uno de ellos fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, en donde se desarrolló un protocolo para el aislamiento de protoplastos a partir de hojas y la obtención subsiguiente 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 fue exitosa y se lograron valores de hasta el 68% de aclimatación de las plantas obtenidas. Los resultados de esta investigación demuestran que la regeneración de retoños a partir protoplastos en tomate de árbol es eficaz (Riofrio et al., 2010).

### 1.3 Embriogénesis Somática

Es el proceso por el cual las células somáticas cambian su patrón de expresión y generan embriones somáticos iniciales, sin la necesidad de la fusión de gametos. (Aboshama, 2011). Este fenómeno que ocurre de forma espontánea en la naturaleza, también puede ser replicado en laboratorio a través de técnicas de cultivo *in vitro* (Bajaj, 2000). Generalmente está condicionado por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas (Klimaszewzka y Cyr, 2002). De manera general, el inicio del proceso requiere de factores de crecimiento vegetal, es decir, hormonas y reguladores de crecimiento, sin embargo las concentraciones de éstos son variables para cada especie (Bornhoff y Harst, 2000).

Se han detallado aspectos morfológicos que han revelado la presencia de 4 fases marcadas durante la embriogénesis somática. En la fase uno, las células aisladas y cultivadas en altas concentraciones de auxina, por lo general en oscuridad y un rango de temperatura que va de los 26-28 °C, sufren continuas divisiones hasta formar agregados celulares embriogénicos (Chung y Khurana, 2012). En la fase dos, estos agregados celulares crecen de manera relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación; aproximadamente 6-10 días después de la fase uno, ocurre una rápida división celular, dando lugar a la aparición del embrión en etapa globular, conocida también como la fase dos (Correira y Marquez, 2011). Finalmente los embriones formados y transferidos a un medio de regeneración, libre de auxina y con un fotoperiodo de 16 horas luz 8 horas de oscuridad, continúan el desarrollo en las etapas de corazón y torpedo, para completar el proceso y formar una planta adulta completamente diferenciada (Fujimura y Komamine, 1980).

Varias líneas de investigación han demostrado el interés de esta especie para entender los aspectos particulares de la morfogénesis *in vitro*, en particular la embriogénesis somática. La embriogénesis somática es una herramienta biotecnológica importante con un gran potencial para la rápida propagación a gran escala (Correira y Marquez, 2011).

El cultivo de embriones es aplicado para recuperar plantas que fueron producto de varios cruces de individuos haploides *Hordeum vulgare x Hordeum bulbosum*. Además es una técnica de rutina aplicada en la micro propagación y reproducción de orquídeas que presentan dormancia (Ankita y Handique, 2010).

Guimares y Correira (1998), reportaron por primera vez éxito en la inducción de embriogénesis somática en tomate de árbol (*Solanum betaceum*), mediante el cultivo de embriones zigóticos maduros e hipocótilos de plántulas. En un reporte posterior, se describe la regeneración de plantas de tomate de árbol mediante organogénesis y embriogénesis somática empleando diferentes clases de explantes (hipocótilos, cotiledones, raíces y embriones zigóticos maduros y a partir de protoplastos) (Espinosa et al., 2005).

En un estudio realizado por Cabrera, et al (2010), se indujo embriogénesis somática a partir de los embriones zigóticos de *S. betaceum*. El 100% de los explantes formaron callos de buen tamaño y de una coloración blanca cremosa. Los resultados mostraron que la combinación de 5 mg/L ANA y 9% Sacarosa era la más efectiva, con una tasa de casi el 70% en la formación de embriones somáticos. Sin embargo, al analizar las demás concentraciones de ANA utilizadas (2, 3, 4, 6, 7 mg/L) se tiene valores relativamente más bajos llegando a ser de cero para concentraciones de 2-3-4 mg/L ANA. Hecho que se atribuye en parte a la oxidación de los explantes de tamaño reducido (menor a 1 cm).

En un estudio llevado a cabo por Yusuf e Ikram-ul-Haq (2004), se realizó un cultivo de callos como un sistema de análisis del efecto de los nitratos de diferentes compuestos químicos sobre varios parámetros como: la formación de embriones, porcentaje de callo, diferenciación celular y producción de antocianina, misma que es un indicador de inhibición en el desarrollo celular. Durante este estudio, tanto la fuente de nitrógeno como su concentración en el medio, mostraron tener un efecto significativo en el desarrollo de los callos así como sobre el porcentaje de embriogénesis somática, que fue mucho más elevado cuando el Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) fue eliminado del medio y sustituido con Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ ) (Yusuf e Ikram-ul-Haq, 2004).

Durante esta investigación se analizaron varias concentraciones de ANA, así como la reducción en los niveles de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en medio MS, tomando en cuenta parámetros tales como porcentajes de callogénesis, porcentaje de embriogénesis, días de aparición de embriones y porcentajes de aclimatación. Todo esto con el fin de encontrar las condiciones óptimas (dentro de las analizadas) que desarrollen un proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol.



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

- Aplicar un protocolo de embriogénesis somática en *Solanum betaceum*, como un método alternativo de propagación clonal de la especie.

### 2.2 Objetivos específicos

- Probar varias concentraciones de ANA, y analizar su efecto como hormona precursora de embriogénesis somática en *Solanum betaceum*.
- Evaluar los efectos de la reducción en la concentración de nitrato de amonio sobre la inducción de embriogénesis somática en *Solanum betaceum*.

## 3 Justificación

*Solanum betaceum* es un frutal nativo de la región andina, principalmente de la vertiente oriental de Perú, Ecuador y Colombia (Correira y Marquez, 2011). En Ecuador se lo cultiva en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Loja, y Napo; su producción ha ido en aumento, llegando a formar parte de los 25 cultivos más producidos en el Ecuador, con una superficie total cosechada de 2450 Ha (INEC, 2014). Los frutos de tomate de árbol tienen un contenido relativamente alto de proteínas (2g/ 100g), vitaminas (vitamina C, 30-45mg / 100 g, vitamina E, 1.86mg / 100g, provitamina A, 800-1200 iu de carotenos), pectinas y algunos minerales como potasio y hierro (Canhoto et al., 2005).

Estas características le confieren propiedades nutricionales, medicinales y útiles tanto para la dieta de la población, como para industria alimenticia, aumentando su impacto en la economía a nivel nacional, así como también han incentivado la utilización de esta especie, como un cultivo con fines comerciales.

Varias enfermedades atacan al tomate de árbol, tales como el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), virus del anillado del tabaco (TRSV), *Colletotrichum gloeosporoides*, *Alternaria sp* y *Cercospora sp*. (Chung y Khurana, 2012). En este sentido, los procesos de regeneración in vitro a partir de células y tejidos pueden potenciar los esfuerzos de mejoramiento, tanto en la propagación masiva de genotipos élite, como en la obtención de material vegetal libre de patógenos. En la actualidad el establecimiento y estandarización de protocolos in-vitro con tejidos de alta respuesta de regeneración en especies leñosas se considera fundamental para procesos de micropropagación masiva y para la estandarización del material vegetal (Dalzoto et al., 1997).

Esta técnica permitirá incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y abre la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (De Fera, 2000).

En el Ecuador se han realizado estudios sobre protocolos de embriogénesis somática en especies de alto interés como por ejemplo *Theobroma cacao*. En un estudio realizado por el INIAP en asociación con el CIRAD de Francia, consistente en la evaluación del potencial embriogénico de un grupo de ecotipos comerciales y experimentales, los resultados evidenciaron que al menos el 70% de los clones evaluados presentaron altos potenciales embriogénicos y niveles considerables de conversión a plántulas (INIAP, 2003-2004). Fue factible obtener un grupo de plantas de los ecotipos con mayor potencial de multiplicación, las cuales fueron llevadas a campo y demostraron tener todas las características de una planta funcional.

Las principales dificultades asociadas al cultivo de embriones recaen sobre la eficacia del proceso, es decir, la cantidad de embriones que se puedan regenerar a partir de algún tejido específico además de la capacidad real de regeneración que se obtenga al transferir las plantas a suelo (Yusuf e Ikram-ul-Haq., 2004). La expansión de una técnica de embriogénesis somática aplicable en *S. betaceum*, con niveles de regeneración relativamente eficaces, permitiría a los agricultores, en un futuro, contar con material vegetal de alta calidad y de fácil propagación, capaz de conservarse por largos periodos de tiempo en latencia y además eliminar cualquier patógeno que pueda afectar potencialmente a los cultivos (CORPOICA, 2010).

Por todos los factores mencionados, la utilización de una técnica de embriogénesis somática en tomate de árbol resulta de gran interés, como un producto agrícola así como a un ingreso a nivel económico, además incentivaría aún más la investigación y desarrollo de cultivos de alta calidad, homogéneos y poco susceptibles a enfermedades.

#### **4 Área de estudio**

Se obtuvo frutos de tres variedades de *Solanum betaceum*: Rojo Puntón, Amarillo Segregante y Gigante común. Provistas por del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, a través de su división “Agrocalidad”.

Los ensayos de inducción de embriones a partir de callo, aclimatación y transferencia al invernadero, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, cuarto de cultivo e invernadero de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá.

## 5. Materiales

### 5.1. Siembra de semillas y preparación de medios de cultivo.

- Semillas de *S. betaceum* provistas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, correspondientes a tres variedades: Rojo Puntón, Amarillo Segregante y Gigante común.
- Cajas Petri de vidrio de 12 cm de diámetro.
- Vasos de precipitación de vidrio de 50, 100 y 500 mL
- Agua destilada esterilizada
- Etanol al 70%
- Hipoclorito de Sodio 4.5%
- Bacto Agar (Beckto y Dickinson)
- Medio Murashige and Skoog (1962).
- Frascos de vidrio de 1000 mL
- Sacarosa marca San Carlos
- Potenciómetro (Thermo scientific)
- Solución de NaOH 1 M
- Solución de HCl 1 M
- Micropipeta (Thermo scientific) de 10- 100 y de 100 -1000 uL
- Probetas de 10, 50, 100 y 500 mL
- Balanza electrónica (Ohaus )
- Cámara de flujo laminar (LabConco)
- Autoclave (Trident)
- Agitador magnético (Labnet)

## 5.2. Inducción de embriogénesis somática

- Cajas Petri plásticas 6 cm diámetro.
- Parafilm
- Ejes embrionarios extraídos de las semillas de *S. betaceum*
- Ácido Naftalenacético ANA (Sigma)
- Incubadora (Lambert)
- Estéreo microscopio (Olympus)
- Microscopio óptico (Olympus)

## 5.3. Aclimatación

- Frascos de vidrio de 250 mL
- Plastic Wrap
- Macetas de barro de 50 ml
- Macetas de plástico medianas de 2000 mL
- Tierra negra esterilizada

# 6. Métodos

## 6.1. Material vegetal

Se obtuvo frutos de *S. betaceum*, de las variedades Rojo Puntón, Amarillo Segregante y Gigante común, provistos por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) a través de su división de Agrocalidad Tumbaco. De los frutos se obtuvo las semillas y de éstas los ejes embrionarios que se los usó como explantes en los ensayos de inducción de embriogénesis somática.

## **6.2. Ensayos exploratorios preliminares**

Se establecieron ensayos exploratorios preliminares de inducción de embriogénesis somática utilizando segmentos de hipocótilos, hojas, embriones zigóticos y ejes embrionarios de las tres variedades y los explantes se cultivaron en MS + 2,4-D en concentraciones de 2-5 mg/L y ANA en concentraciones de 2-5 mg/L, además se mantuvo una concentración de sacarosa de 9 %, reportada por Cabrera et al., (2010) y Correira y Marquez (2011). Durante estos estudios preliminares, se observó que la formación de callo se dio en todos los casos, pero solo cuando se usó el eje embrionario extraído de las semillas y utilizando la variedad de tomate de árbol rojo puntón, se formaron embriones.

## **6.3. Extracción de las semillas de los frutos de *S. betaceum***

Se cortó los frutos por la mitad y con la ayuda de una espátula se extrajo las semillas. Se utilizó un tamiz y agua corriente para lavar y separar el mucilago adherido a las semillas. Luego, las semillas fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 horas y almacenadas en cajas Petri plásticas selladas con parafilm.

## **6.4. Preparación del medio de cultivo.**

En todos los ensayos se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 9% Sacarosa, 7 % agar y las concentraciones de ANA y de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de acuerdo a los objetivos de cada ensayo (Tablas 1 - 4).

Se ajustó el pH del medio a 5.8 y se esterilizó a 121° C por 20 minutos. Se dejó enfriar el medio de cultivo hasta aproximadamente 50° C y dentro de la cámara de flujo se repartió en cajas Petri plásticas pequeñas, 15 mL de medio por caja. Las cajas fueron selladas con parafilm y utilizadas de acuerdo a las necesidades.

### **6.5. Desinfección de semillas y extracción de los ejes embrionarios**

Se desinfectó las semillas sumergiéndolas uniformemente en etanol al 70 % durante 3 minutos, luego lavadas con agua destilada estéril por un minuto y sumergidas en hipoclorito de sodio al 4,5% más Tween-20 por 15 minutos. Finalmente las semillas fueron sometidas a cinco lavados en agua destilada estéril, con el propósito de eliminar cualquier residuo de cloro.

Una vez desinfectadas, en el interior de la cámara de flujo laminar, se procedió a extraer el eje embrionario de las semillas mediante el uso de un estereomicroscopio, un bisturí y una pinza. Se cortó las semillas por su parte lateral y mediante una ligera presión con la pinza se logró expulsar los ejes embrionarios, los cuales fueron colocados en el medio de cultivo MS.

### **6.6. Ensayos de variación de la concentración de ANA**

Se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 9% de sacarosa y las variaciones de ANA previamente definidas (Tablas 1-2).

Los ensayos 1 y 2, que incluyen las variaciones de ANA, fueron planeados para analizar los efectos de dicha hormona en la inducción de embriogénesis somática en *S. betaceum*. En el ensayo 1 se probó: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 mg/L ANA (Tabla 1) y en el ensayo 2 se probó: 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 mg/L ANA (Tabla 2); en ambos casos se incluyó un control con 0 mg/L ANA y se mantuvo la concentración de sacarosa en 9%.

En el Ensayo 1, se usaron 12 cajas Petri plásticas, con 4 explantes (eje embrionario) cada una, para un total de 48 explantes por cada una de las concentraciones de ANA. En el Ensayo 2 se usaron 12 cajas Petri plásticas, con 5 explantes (eje embrionario) cada una, para un total de 60 explantes por cada una de las concentraciones de ANA.

Las cajas fueron rotuladas con la fecha, detalles del ensayo y selladas con parafilm e incubadas por un período de 4 semanas en total oscuridad, a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C.

### **6.7. Ensayos de reducción de la concentración de $\text{NH}_4\text{NO}_3$**

Se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 9% de sacarosa y las variaciones de nitrato de amonio descritas (Tablas 3 y 4). Los ensayos 3 y 4 correspondientes a variaciones en la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , fueron planeados para analizar los efectos de la disminución del mismo, en la inducción de embriogénesis somática en *S. betaceum*.

En el Ensayo 3, como se detalla en la Tabla 3, se probó concentraciones de: 400, 800 y 1200 mg/L de nitrato de amonio, mientras se mantuvo fija la concentración de ANA a 5 mg/L (Cabrera et al., 2010) y en el Ensayo 4 (Tabla 4) se probó: 0, 200 y 400 mg/L de nitrato de amonio, manteniendo fija la concentración de ANA a 4.5 mg/L (basado en resultados preliminares de esta investigación). En ambos casos se incluyó un control con 0 mg/L nitrato de nitrato de amonio y se mantuvo una concentración de sacarosa de 9 %.

En el Ensayo 3, se emplearon 12 cajas Petri plásticas, con 5 explantes (eje embrionario) cada una, para un total de 60 explantes por cada concentración de nitrato de amonio. Para el ensayo 4 se emplearon 12 cajas Petri plásticas, con 4 explantes cada una, para un total de 48 explantes por cada concentración de nitrato de amonio.

Las cajas fueron rotuladas con la fecha y detalles del ensayo para ser finalmente selladas con parafilm e incubadas en total oscuridad a una temperatura de  $\pm 28$ °C por 4 semanas.



### **6.8. Inducción y cultivo in vitro de embriones somáticos.**

Cuando los embriones somáticos, recientemente formados, habían alcanzado un tamaño aproximado de 4 – 10 milímetros, fueron extraídos de las cajas Petri con la ayuda de un bisturí y una pinza y transferidos a frascos de vidrio con 50 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), libre de auxinas y una concentración de sacarosa de 3%. Se colocaron 4 embriones por frasco.

Los frascos fueron cerrados con plastic wrap y una banda de goma (Figura 1) y rotulados. Con el fin de estimular la inducción de los embriones somáticos, se los incubó en el cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad, a una temperatura de  $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Tras un periodo de 3-4 semanas las plántulas resultantes fueron transferidos a tierra como se muestra en las (Figuras 4 – 6).

### **6.8 Acimatación de las plántulas**

Una vez que las plántulas, regeneradas a partir de embriones somáticos, alcanzaron un tamaño aproximado de 12 cm, fueron extraídas del medio de cultivo con una pinza, lavadas sus raíces con agua destilada y plantadas en macetas pequeñas de barro, las cuales contenían tierra previamente esterilizada. Las macetas fueron colocadas dentro de frascos de vidrio de 2000mL, cuya boca fue cerrada con papel plástico sujeto con una banda de goma (Figura 4).

Se mantuvo los frascos en el cuarto de cultivo, durante 5 semanas, con un fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y una temperatura de  $18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Durante este tiempo, se realizaron paulatinamente orificios en el papel plástico hasta retirarlo completamente, con el fin de que la planta se aclimate a las condiciones externas.

Cuando las plantas alcanzaron el tamaño máximo (20 cm) dentro de los frascos de aclimatación, se plantaron en macetas plásticas de 2000mL con tierra negra fertilizada y fueron colocadas en el invernadero (Figura 6).

### **6.9. Toma de Datos y análisis estadístico.**

Para cada uno de los ensayos se elaboró una matriz de toma de datos en Excel. Se tomó datos de tiempo de aparición de callo, tiempo de aparición de embriones, tamaño de los embriones, porcentaje de callogénesis, porcentaje de embriogénesis, tiempo de inducción de embriones en MS y aclimatación de plántulas en tierra, con estos datos se realizaron gráficos en donde se resumen los resultados (Gráficos 6-14).

Con los datos obtenidos de porcentaje de embriogénesis somática, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), tomando en cuenta los ensayos 1 y 2 (con variaciones en la concentración de ANA y así también los ensayos 3 y 4 (con reducción en la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , por separado (Tablas 5-8), con el fin de analizar si existen o no diferencias significativas relacionadas a la aplicación de cada tratamiento, esta prueba de varianza se realizó con una significancia de 5%. Adicionalmente se realizó la prueba de Tukey, con una significancia de 5%, para el porcentaje de embriogénesis somática con el fin de analizar el ordenamiento de los tratamientos de acuerdo a su eficiencia en la inducción de embriogénesis somática (Tablas 9 y 10).

## **7. Resultados**

### **7.1. Efecto de la variación de ANA en la inducción de embriogénesis somática en *S. betaceum*.**

#### **7.1.1. Ensayo 1**

##### **7.1.1.1 Callogénesis**

Los callos se formaron entre los 12 y 16 días del cultivo de los ejes embrionarios en las distintas concentraciones de ANA (Figura 11). El color de los callos para la mayoría de casos fue blanco cremoso, pero con tonalidades de café para los callos en proceso de envejecimiento.

El porcentaje de callogénesis alcanzó un rango de 85.4-95.8% en las diferentes concentraciones de ANA, y su valor máximo (95.8%) correspondió al tratamiento con 4 mg/L de ANA. El control (0 mg/L de ANA) no formó callo como se puede ver en la (Figura 8).

##### **7.1.1.2. Embriogénesis somática**

Los embriones fueron perceptibles y se volvieron evidentes entre 19 y 25 días después de la siembra de los ejes embrionarios en los distintos tratamientos. El porcentaje de embriogénesis varió de 12.50% (6/48) a 43.75% (21/48) en las diferentes concentraciones de ANA, el mayor valor correspondió al tratamiento con 5 mg/L de ANA. El control (0mg/L de ANA) no formó embriones (Figura 7). El tamaño de los embriones somáticos antes de ser transferidos al medio de regeneración de plantas fue de 2,5-5,2 mm (Tabla 1).

### ***7.1.1.3. Inducción de embriones y aclimatación de plantas***

Todos los embriones formados en el proceso de embriogénesis fueron transferidos a medio MS sin hormonas para su inducción y posterior regeneración de plántulas.

La mayoría (50%-85%) regeneraron y formaron plántulas, las cuales fueron aclimatadas con una eficiencia de 71%-100% dependiendo de los tratamientos de los que provenían (Tabla 1).

## **7.1.2. Ensayo2**

### ***7.1.2.1. Callogénesis***

En este ensayo los callos comenzaron a aparecer entre los 12 y 17 días de cultivo de los ejes embrionarios en las distintas concentraciones de ANA analizadas (Figura 11).

En todos los tratamientos se formaron callo de color blanco a ligeramente amarillento. El porcentaje de callogénesis varió de 64.3% a 94.3%, siendo el valor mayor correspondiente al tratamiento de 5mg/L de ANA. El control (0 mg/L de ANA) no formó callo (Figura 8).

### ***7.1.2.2. Embriogénesis somática***

Los embriones se hicieron evidentes sobre los callos a los 17-28 días de cultivo de los ejes embrionarios en los distintos tratamientos (Figura 11). El porcentaje de embriogénesis varió entre 6.6% hasta 48.3%, en los distintos tratamientos, correspondiendo el de mayor valor a 4.5 mg/L de ANA (Figura 7). El control con 0 mg/L de ANA no formó embriones (Tabla 2).

### ***7.1.2.3. Inducción de embriones somáticos y aclimatación de plantas***

El tamaño de los embriones al momento de transferirlos al medio de inducción (MS basal) estaba en un rango entre 1,8 y 5,8 mm (Figura 13). Los embriones fueron inducidos a los pocos días de sembrados (6-12 días), lo cual se manifestó con la elongación de la radícula y la aparición de las primeras raíces. Finalmente, la eficiencia de regeneración de los embriones fue de 25% a 82%, dependiendo de los tratamientos de los que provenían. La eficiencia de aclimatación de las plántulas varió de 0% a 74% (Tabla 2).

### ***7.1.2.4. Análisis estadístico***

Tomando los datos de los dos ensayos (1 y 2) de variación de ANA, se detectó diferencias significativas entre las concentraciones de ANA analizadas, para porcentaje de embriogénesis somática, con una significancia ( $p=0.00106$  y  $p =0.0008$  respectivamente) como se muestra en las (Tablas 5- 6).

La dosis de ANA que indujo el mayor porcentaje de embriogénesis de entre todas las utilizadas fue 4.5 mg/L (Gráfico 7 y 8). La prueba de Tukey (5%) también identificó a la dosis de 4.5 mg/L de ANA como significativamente diferente siendo más eficiente que las demás tratamientos (Tabla 9).

## **7.2. Efecto de la disminución de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , en la embriogénesis somática de tomate de árbol**

### **7.2.1. Ensayo 3**

Para este ensayo se mantuvo fija la concentración de 5 mg/L de ANA, reportada por Cabrera et al, (2010) y se varió la concentración de nitrato de amonio entre 400 y 1200 mg; además se incluyó un testigo con 1600mg/L (Tabla 3).

### **7.2.1.1. Callogénesis**

Los callos comenzaron a aparecer entre los 13 y 17 días de cultivo de los ejes embrionarios en los distintos tratamientos. Los callos que fueron evidentes más rápidamente fueron los correspondientes al tratamiento de 400 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con alrededor de 13 días de espera, mientras que los que más se demoraron en aparecer, alrededor de 17 días, fueron los del tratamiento de 1200 mg/L (Figura 12). La mayoría de los callos variaban en color de blanco a ligeramente amarillentos. Se obtuvo un porcentaje de callogénesis entre 89.6-95%, el mayor porcentaje correspondió a 1200 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura 8).

### **7.2.1.2. Embriogénesis somática**

Los embriones se formaron entre 16 a 23 días después de iniciado el ensayo (Figura 12). El porcentaje de embriogénesis somática estuvo entre 33 – 48.6 %, correspondiendo 33 % al tratamiento con 1200mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y el 48.25 % al tratamiento con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de 400mg/L (Figura 7). Sin embargo valores similares fueron obtenidos para 1600 mg/L y 800 mg /L (38.3 y 43.4 % respectivamente).

### **7.2.1.3. Inducción de embriones somáticos y aclimatación de plántulas**

Los embriones somáticos tenían entre 1.7 y 6 mm de longitud aproximadamente al momento de transferirlos al medio de inducción (MS basal) (Figura 14). La regeneración de los embriones ocurrió entre 7 y 10 días lo cual se manifestó por la presencia de raíces. La eficiencia de regeneración de los embriones fue de 70% a 81%.

El porcentaje de plantas aclimatadas varió de 72% a 81% dependiendo del tratamiento del que provenían (Tabla 3).

## **7.2.2. Ensayo 4**

Para este ensayo se fijó en 4.5 mg/L la concentración de ANA, con base en los resultados obtenidos en el primer ensayo de esta investigación (Tabla 4), y se varió las concentraciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a 0, 200 y 400 mg/ más un control a 1600 mg/L, que es la concentración normal del medio MS.

### **7.2.2.1. Callogénesis**

Los callos aparecieron entre los 12 a 19 días de implementado el ensayo correspondiendo el menor tiempo de espera al tratamiento con 400 mg/L con alrededor de 12 días y el más tardío al control (0 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) con aproximadamente 20 días (Figura 12). Los callos eran en su gran mayoría, de color blanco con tonalidades amarillentas.

El porcentaje de callogénesis alcanzó valores de 68.75 a 92.3%, correspondiendo el valor más bajo al control (0 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y el valor más alto al tratamiento con 1600 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura 8).

### **7.2.2.2. Embriogénesis somática**

En cuanto al porcentaje de embriogénesis somática, se obtuvo valores entre 27.3 – 51.25 %. El valor de 27.3 % correspondió al tratamiento con 0 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en tanto que el 51.25 % correspondió a una concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de 400 mg/L, sin embargo valores similares fueron obtenidos para una concentración de 1600 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (Figura 7). Al momento de transferirlos al medio de inducción, los embriones medían entre 4,3 y 5,1 mm (Tabla 4).

### ***7.2.2.3.Inducción de embriones y aclimatación de plantas***

La inducción de los embriones somáticos ocurrió a los 8-22 días después de sembrados en medio MS libre de hormonas, lo cual fue evidente por la aparición de la raíz. Los más precoces fueron los que provenían de 0 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y los más tardíos los que provenían de 400 mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . La eficiencia de regeneración fue de 38-67% dependiendo de los tratamientos de los que provenían. La eficiencia de aclimatación varió entre 50 y 82% (Tabla 4).

### ***7.2.2.4.Análisis estadístico.***

Tomando en conjunto los datos de los dos ensayos con disminución de la concentración de nitrato de amonio (ensayos 3 y 4), el ANOVA no detectó diferencias significativas para la variable del porcentaje de embriogénesis somática ( $p=0.337$  y  $p=0.086$  respectivamente) mostrados en las Tablas 7-8.

La prueba de Tukey (5%) tampoco identificó a ninguna dosis de Nitrato de amonio como significativamente diferente.



## 8. Discusión

Según Correira y Canhoto (2010), para inducir la formación de embriones somáticos en *S. betaceum*, existe un proceso que puede ser directo o indirecto. Durante esta investigación se llevó a cabo un proceso de embriogénesis somática directa, al inducir la formación de callos embriogénicos directamente sobre el explante utilizado (eje embrionario), para posteriormente ser trasladado a un medio de regeneración de dichos embriones hasta plántulas (Amely et al., 2010).

El fenómeno de la embriogénesis somática indirecta fue observado por primera vez en suspensiones celulares de zanahoria y a partir de callos que crecían en medio de cultivo semisólido por Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo. En la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque dichos grupos aparecen en un número menor de callos (Jimenez, 2001).

Para este estudio se realizaron pruebas con el método directo, el cual no pasa a través de un cultivo previo de material vegetal, es decir, los explantes son expuestos al medio deseado en primera instancia con el fin de que regeneren callos y de los mismos germinen embriones. Se extrajo el eje embrionario de la semilla y como es sugerido por Correira y Canhoto (2010), todos los tratamientos se mantuvieron en oscuridad total en

la etapa de inducción embrionaria, mientras que en la etapa de regeneración de plantas, los embriones fueron transferidos a un medio MS + 3% sacarosa y con un fotoperiodo de 16/8 luz/oscuridad. Las ventajas de utilizar este proceso son la reducción del tiempo necesario al exponer el explante directamente al medio de inducción (Klimaszewzka y Cyr, 2002).

### **8.1. Efecto de la variación de ANA.**

Analizando los resultados de los ensayos 1 y 2, se observa que los valores más altos de calogénesis y embriogénesis están entre 4 y 5 mg/L de ANA, en tanto que el control, correspondiente a una concentración de ANA de 0 mg/L, se muestra ausencia de calogénesis, así como de embriogénesis somática, hecho que sustenta la aplicación de ANA como hormona promotora del proceso embriogénico. Con el fin de complementar los resultados obtenidos en el ensayo 1, en donde el porcentaje máximo de embriogénesis correspondió al tratamiento con 5mg/L ANA, muy cercano al valor obtenido en 4 mg/L ANA, se realizó un ensayo adicional, el ensayo 2, en el mismo se incluyeron variaciones de ANA correspondientes a 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 mg/L ANA, de esta forma fue posible analizar los efectos de concentraciones intermedias a las anteriores.

Como se muestra en las Figuras 7 y 9, correspondientes a los ensayos 1 y 2, todos los explantes formaron callo, siendo el porcentaje más alto el correspondiente a 4,5 mg/L ANA. Así mismo, todos los tratamientos presentaron embriogénesis somática (a excepción del control) siendo el valor más alto de 48.3% el correspondiente a una concentración de ANA de 4,5 mg/L.

Con base en estos resultados, queda clara la necesidad de aplicar ANA como promotora del proceso de embriogénesis somática, además se puede establecer que una concentración de 4,5 mg/L ANA, resulta ser la mejor combinación de todas las analizadas en este estudio, para estimular el proceso de embriogénesis somática en tomate de árbol.

En un estudio realizado por Ruiz y Castillo (2008), se describe los cambios en las células vegetales durante un proceso de embriogénesis, los cuales se manifiestan debido a que la auxina promueve divisiones longitudinales y transversales para formar pequeñas células isodiamétricas. Así pues para la formación del embrión somático a partir de los pro-embriones, es necesario adicionar al medio de cultivo bajas concentraciones de auxina o auxinas menos fuertes e incluso no adicionar auxinas, especialmente cuando se trabaja con plantas monocotiledóneas (Espinosa et al., 2005). En algunas especies es necesario adicionar una citoquinina (Nomura y Komamine, 1995). Existe una hipótesis que relaciona el nivel endógeno de auxinas con la polaridad de las masas embriogénicas. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad al difundirse dentro de las masas embriogénicas provocando la inhibición del proceso iniciado por las auxinas endógenas. Esta hipótesis refiere que el papel de las auxinas es doble (Nomura y Komamine, 1995).

De Jong., et al (1992) señalaron algunos aspectos que influyen en la asincronía de la embriogénesis somática, ellos son: la cantidad de nutrientes que un embrión somático puede tomar del medio de cultivo, la posible interacción entre los embriones y la concentración en que se encuentren los elementos de acondicionamiento liberados por los propios embriones somáticos al medio de cultivo. Pese a existir variables como las mencionadas anteriormente, sin la aplicación de ANA, como hormona promotora de la embriogénesis somática, todo indica que el proceso no tendría lugar.

Hecho que queda totalmente sustentado al revisar los controles con ausencia de ANA, en donde no se formaron callos ni embriones somáticos.

Al revisar los datos de aparición de callo y embriones somáticos, para los ensayos 1 y 2 presentados en la Tabla 1 y 2 además de las (Figuras 7 – 8), se puede notar que en ambos casos se redujo el tiempo necesario para la formación de callo y embriones, al utilizar los tratamientos con 4.0 – 4.5 y 5.0 mg/L ANA en al menos 8 días (callogénesis) y 6 días ( embriogénesis) con relación al más tardío que fue al utilizar 2,5 mg/L ANA; de esta manera se comprobó que además de inducir el proceso de embriogénesis somática, la adición de entre 4.0-5.0 mg/L ANA disminuye el tiempo necesario para la formación de callo y células embrionarias en *S. betaceum*, siendo la concentración óptima de 4,5mg/L ANA con un promedio de aparición de 10 días como se puede ver en la Figura 10.

El tamaño de los embriones (en mm), como se detalla en las (Figuras 13 y 14), en un rango de 1,8 – 5,8 mm para todos los tratamientos con ANA de los ensayos 1 y 2, quedando demostrado así que la adición de ANA en concentraciones cercanas a las óptimas reportadas en este estudio (4.0, 4.5, -5.0 mg/L) favorece el crecimiento de callos y los subsiguientes embriones correspondientes.

## **8.2 Efectos de la variación de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ en la embriogénesis**

Estudios realizados por Yusuf y Ikram-ul-Haq. (2004) y por Bornhoff y Harst (2000) demostraron que la reducción de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en el medio de cultivo resultaba ser beneficiosa para el proceso de embriogénesis somática en algunas especies vegetales.

Argumentaron los autores, que este efecto se debía al estrés oxidativo y nitrosativo en las células, como consecuencia de la producción de especies de oxígeno y de nitrógeno reactivos provenientes del  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fuente primaria de nitratos en el

medio, los cuales entran en contacto con enzimas oxidasas produciendo la muerte celular, lo cual sería provocado por condiciones de estrés en el material vegetal, en este caso el algodón (Valderrama, et al 2007). Sin embargo la respuesta embriogénica condicionada por la reducción del Nitrato de amonio, está fuertemente condicionada por el genotipo sobre el cual sea aplicado, lo cual hace necesario investigar más a fondo y de manera específica su reacción al ser aplicado en *Solanum betaceum*. Basado en estos estudios y en busca de mejorar la eficiencia de inducción de la embriogénesis somática obtenida en los ensayos previos, se decidió probar dosis reducidas, con relación a la dosis normal del medio MS (1600 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) hecho resumido en las Tablas 3 y 4.

Para esto se eligió mantener fijas las concentraciones de ANA que habían resultado más eficientes en los ensayos previos, esto es 5 mg/L y 4.5 mg/L de ANA (ensayos 1 y 2 respectivamente). Como muestran las Figuras 9 y 10, todos los explantes formaron callo, en todas las concentraciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  analizadas; además todos formaron embriones somáticos, con eficiencias diferenciadas dependiendo de cada tratamiento.

Resulta interesante notar que el porcentaje de embriogénesis más alto (51.25%) fue el correspondiente a una concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de 400mg/L (Figura 8), lo cual hace pensar en un posible aumento del potencial embriogénico, sin embargo los resultados estadísticos de las Tablas 7-8, muestran que no es significativamente diferente tanto para el ensayo 3 como para el ensayo 4 ( $p = 0.337$  y  $p = 0.086$ ), además en el control del ensayo 4, con 0 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , presenta un porcentaje de éxito embriogénico de 27.3 %.

Esto quizá estaría corroborando lo encontrado por Yusuf y Ikram-ul-Haq., (2004) en sus estudios, sobre el efecto de las dosis de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en el medio de cultivo, realizado en algodón, en donde al reducir las concentraciones de los nitratos en el medio

MS, estimulaban la formación de embriones, pero al reducir demasiado este potencial se veía realmente afectado.

Es probable que a una concentración de entre 400-1600 mg /L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , las diferencias se den por variaciones al azar y mas no por reducción del mismo, pero al reducirlo demasiado (200 mg/L o menos) el potencial si se ve afectado y reducido significativamente. Con el fin de complementar los resultados obtenidos en el ensayo 3, en donde el porcentaje máximo de embriogénesis se alcanzó con 400 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , se realizó un ensayo adicional, el ensayo 4, en el cual se incluyeron variaciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  correspondientes a: 0, 200 y 400mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , más un control con 1600mg/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de esta forma fue posible analizar los efectos al reducir su concentración estándar en medio MS de 1600mg/L (Murashige y Skoog, 1962)

En un estudio realizado por Wael y Aldaej (2014), en *Phoenix dactylifera* L. se analizó los niveles de fenoles, asociados a la calidad y supervivencia de callos producidos al variar la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  presente en el medio, el mayor nivel de supervivencia se obtuvo al utilizar una concentración de 800 mg/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , sin embargo los resultados al utilizar una concentración de 1600 mg/L en base al estandar MS, no fueron demostrados como significativamente diferentes. Como se muestra en la Figura 8, los porcentajes de embriogénesis fueron mayores al reducir la concentración de nitrato de amonio y utilizar el tratamiento con 400 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con un 48,6% de éxito al ser combinada con 5 mg/L ANA en el ensayo 3 y de 51,25 % de éxito al ser combinada con 4,5 mg/L ANA, en el ensayo 4. Sin embargo estas diferencias no son visiblemente mayores, y como se mencionó anteriormente estas variaciones pueden estar dadas por el azar, al no ser significativamente diferentes (Tablas 7 y 8).

Durante el estudio llevado a cabo por Wael y Aldaej (2014), quedó demostrada la relación del  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con la acumulación de metabolitos secundarios en las células. La mayor acumulación de contenidos fenólicos y anti oxidantes que favorecen el desarrollo de los callos durante el proceso de embriogénesis somática, se produjo al utilizar una concentración de 800 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , seguido de una concentración de 400 mg/L, lo cual en comparación a los resultados de este estudio, apoyan fuertemente la disminución de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con el fin de disminuir el tiempo necesario (en días) para la aparición de callo y embriones, pero no para aumentar el porcentaje global de éxito obtenido.

Al revisar los datos de aparición de callo, para los ensayos 3 y 4, en la Figura 12 se puede notar que en ambos casos se redujo el tiempo necesario para la aparición de callo en al menos 8 días y de hasta 10 días en células embrionarias, al utilizar los tratamientos con 400 y 800 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , en relación a los otros tratamientos utilizando 1200 y 1600 mg/L en al menos 6 días (Figura No. 12). De esta forma se puede determinar que la reducción de los niveles de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , en relación al estándar MS de 1600 mg/L, en un rango de entre 400 y 800 mg/L reduce el tiempo de espera para la obtención de callos.

Además, debido a los embriones obtenidos al utilizar 0 mg /L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , mismos que se detallan en la Figura 8, se demostraría que la reducción de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , hasta cierto límite (400 mg/L), en el medio, podría favorecer el desarrollo de callos en *S. betaceum* al disminuir el tiempo de espera necesario, probablemente asociado al potencial de supervivencia de los callos obtenidos. Sin embargo también se puede ver que esta reducción no es indispensable para la formación de embriones ya que resulta muy interesante y revelador que al utilizar 4,5 mg/L de ANA en ausencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se formen callos e incluso embriones.

Por lo que claramente la reducción de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , no representa un cambio significativo ni es un factor indispensable en cuanto al potencial de regeneración de embriones somáticos.

Observando los porcentajes de las Figuras No 7 y 8, se puede notar claramente que el proceso de embriogénesis somática en *S. betaceum* sigue un patrón gradual en donde los porcentajes varían poco a poco, solamente con excepción del control con 0 mg/L ANA, en donde se demostró que no existe regeneración embrionaria ya que la aplicación de ANA esta significativamente asociada al potencial embriogénico.

Esto contraste con lo obtenido por Cabrera., et al (2010) en donde se obtiene regeneración embrionaria solamente al utilizar la combinación de 5 mg/L ANA y no en las demás concentraciones de ANA utilizadas.

### **8.3. Inducción de embriones y aclimatación**

Como se puede ver en las Tablas 1-4, el número de días promedio de espera, para la aparición de raíz en los embriones cultivados, se mantiene constante y con muy poca variación, lo cual sugiere que una vez que se hayan formado los embriones, su desarrollo en el medio de inducción no está condicionado por la fuente del ensayo del cual provenía, dado que podía esperarse debido a que la inducción de la embriogénesis somática activa rutas de control genético similares a las que presenta la embriogénesis zigótica, lo cual se puede considerar como un fenómeno universal para todas las plantas; sin embargo genotipos individuales dentro de una especie muestran capacidad embriogénica variada y bastante específica (Jordan y Obando, 2001).



## 9. Conclusiones

Se aplicó un protocolo eficaz para la inducción de embriogénesis somática en *S. betaceum*, variedad Rojo Puntón, a partir de ejes embrionarios, en el cual es indispensable obtener los embriones en total oscuridad en la etapa de inducción embrionaria y posteriormente, exponerlos a la luz para su desarrollo hacia plántulas.

Se determinó las concentraciones óptimas de ANA necesarias para promover la formación de embriones somáticos y estas oscilan entre 4 y 5mg/L de ANA, siendo 4,5mg/L la mejor y más eficaz en combinación con 400 mg/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  la cual aparentemente disminuye el tiempo de espera necesario (en días) para la formación de callos y posteriormente estructuras embrionarias.

## 10. Recomendaciones

Es de vital importancia durante el transcurso de cualquier investigación que involucre técnicas in vitro, mantener siempre los protocolos de asepsia adecuados para así evitar contaminación cruzada y pérdida de material vegetal por mala manipulación.

Es importante establecer las concentraciones óptimas de factores de crecimiento y condiciones de cultivo para así evitar el uso excesivo de reactivos sin necesidad, en este caso, se obtuvo resultados similares al utilizar 4 veces menos concentración de Nitrato de amonio que el medio MS estándar.

Antes de iniciar un proceso de embriogénesis somática, es trascendental seleccionar bien el tipo de explante a utilizar realizado ensayos exploratorios preliminares ya que de esto va a depender en gran medida el éxito en la regeneración embrionaria.

## 11. Bibliografía

- Aboshama, H. (2011). *Direct Somatic Embryogenesis of Pepper (Capsicum annuum L.)*. Minufiya: World Journal of Agricultural Sciences 7: 755-764.
- Acosta, Q., Martinez, J., & Prohens, M. (2011). Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. *Gen Res Crop Evol*, 943-960.
- Alan, G., & Syed, A. (2009). *Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus*. Teheran: CODEN: EJEBAU.
- Amely, M., Lima, M., Sabino, R., & Birgite, S. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant. . En *Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458* . Valparaiso, Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso -- Chile.
- Ankita, K., & Handique, P. (2010). Standarization of sterilization techniques prior to in vitro propagation *Andrographis paniculata*. *Asian Journal of Science and Technology*, 119-122.
- Apraez, J., Romo, J., & Lagos, T. (2012). Regeneration of tree tomatoe plants induced by organogenesis from callus . *Ciencias Agricolas*, 108-115.
- Bajaj, Y. (2000). *Transgenic Trees*. Berlin: Baja Springer.
- Biodiversity, T. B. (2007). *Guidelines for the development of crop descriptors list*. Obtenido de [www.biodiversityinternacional.org/nc/publications/issue/developing\\_crop\\_descriptors\\_lists.html](http://www.biodiversityinternacional.org/nc/publications/issue/developing_crop_descriptors_lists.html)
- Bornhoff, B., & Harst, M. (2000). *Establishment of embryo suspension cultures of grapevines*. *Vitis*.
- Cabrera, A., & Arahana, V. (2010). Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. *COCIBA* .
- Cabrera, A., Arahana, V., & Torres, M. (2010). Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. *COCIBA*.
- Calva, G., & Perez, J. (2005). Cultivo de celulas y tejidos vegetales. *Fuente de alimentos para el futuro*, 11.
- Canhoto, J., Lopes, M., & M, D. (2005). Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* Cav). En *Protocol for somatic Embryogenesis in Woddy Plants* (págs. 379-389). SM Jain: PK Gupta.
- Cazares, D. (2013). *El comercio*. Obtenido de Tomate de arbol en Ecuador: <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/ano-hay-tomate-de-arbol.html>
- Cevallos, G., Fuentes, J., & Viteri, P. (2004). Manual de cultivo del tomate de arbol. Quito, Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP.
- Chevreau, E., & Thibault, B. (1992). Micropropagation of pear (*Pyrus communis*). *Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 18*, 224-261.
- Chung, A., & Khurana, P. (2012). Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Curr Science* , 715-730.

- Coreira, S., & Marquez, I. (11 de 2011). Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* Cav, optimization and molecular analysis . Coimbra .
- CORPEI. (2013). *Centro de informacion e inteligencia comercial*. Obtenido de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/tomate.pdf>
- CORPOICA. (2010). *Estudios biologicos y epidemiologicos de la antracosis del tomate de arbol y generacion de alternativas para su manejo integrado*. Obtenido de [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_si2/2006112710366\\_Estudios%20epidemiologicos%20antracosis%20tomate%20de%20arbol.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/2006112710366_Estudios%20epidemiologicos%20antracosis%20tomate%20de%20arbol.pdf).
- Correira, S., & Canhoto, L. (2010). Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* Sendt Tamarillo. *Trees DOI*, 575-580.
- Costa, S., & Shaw, P. (2007). How cells change fate. *Trends Cell Biology*, 101-106.
- Dalzoto, A., Docampo, D., Hernandez, S., & Zurrieta, P. (1997). Micropropagacion de los portainjertos de ciruelo Mariana (*Prunus cerasifera* x *prunus musionana*). *Phyton Vol 60*, 127-135.
- De Feria, M. (2000). Empleo de biorreactores para la multiplicacion de suspensiones celulares embriogenicas de *Coffea arabica*. *Tesis presentada en opcion al grado cientifico de Doctor en Ciencias Agricolas UCVL* . Santa Clara, Colombia.
- De Jong, A, Cordewener J, Lo Shiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A y De Vries, S (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*. 4: 425-433
- Espinosa, J., Ofelia, T., Trillos, G., Hoyos, R., & Kafuri, L. (2005). Potencial de propagacion in vitro para el tomate de arbol partenocarpico. . Medellin: Facultad Nacional de Agricultura.
- Fujimura, T., & Komamine, A. (1980). Synchronization of somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Plant Science*, 359-367.
- Guimares, M., & Sandra, L. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cyphomandra betacea* Cav. . *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Vol 15 No. 2, 161-168.
- Haccius, B., & Lakshmanan, K. (1965). Adventiv embryonen aus *Nicotiana*-Kallus der bei honen lichtintensitfiten kultiviert wurde. *Planta Berlin*, 102-104.
- Hutchinson, J., & Zimmerman, R. (1989). Tissue culture of temperate fruit and nut trees. *Hort. Rev*, 273-349.
- INEC, I. N. (2014). *Encuesta de superficie y prduccion continua (ESPAC)*. Quito: INEC.
- INIAP. (2003-2004). *Informes tecnicos Firclone convenio INIAPCIRAD*.
- INIAP, I. N. (2007). Cultivo de tomate de arbol. Quito, Ecuador: INIAP.
- Jimenez, V. (2001). REGULATION OF IN VITRO SOMATIC EMBRYOGENESIS WITH EMPHASIS ON TO THE ROLE OF ENDOGENOUS HORMONES. *Rev. Brasileira de Fisiologia Vegetal*.
- Jordan, M., & Obando, M. (2001). Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* Cav. *Horticulture*, 429-432.

- Klimaszewzka, K., & Cyr, D. (2002). Conifer somatic embryogenesis: I Development . *Dendrobiology* 48, 31-39.
- Leon, J. (2004). *Guia para el cultivo de tomate de arbol*. Quito: INIAP.
- Levitus, G., Echenique, V., & Rubinstein, C. (2004). *Biocnologia y mejoramiento vegetal. Metodos de propagacion de germoplasma*. Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria.
- Lister, E., Morrison, S., Kerkhofs, & Wright, M. (Enero de 2005). *Crop & Food Research Confidential Report No. 1281* . Obtenido de The nutritional composition and health benefits of New Zealand tamarillos : <http://www.tamarillo.com/vdb/document/153>
- Meadows, R. (2010). *Growing tamarillo relatives*. Nueva Zelanda: New Zeland Home Garden.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology. Plant* , 473-497.
- Nomura, K y Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: Torpe TA (Ed). *In vitro Embryogenesis in Plants*, pp. 249-265. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Ohira, K., Makoto, I., & Ojima, K. (1976). *Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture*. *Plant Cell Physiology* 583-590.
- Omamor, I., & Asemota, O. (2007). Fungal contaminants of the iol palm tissue in Nigerian Institute for Oil Plant. *African Research Vol 2*, 534-537.
- Orwa, A., Mutua, R., & Jamnadass, R. (20 de 08 de 2009). *Agroforestry Database*. Obtenido de [http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Cyphomandra\\_betacea.PDF](http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Cyphomandra_betacea.PDF)
- Park, Y., & Bonga, J. (2011). *Application of Somatic Embryogenesis in Forest Managment and Research*. Fredericton: Canadian Forest Service.
- Probiotek. (2012). *Murashige & Skoog medium*. Obtenido de <http://www.probiotek.com/producto/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- Ramirez, T. (2009). *Pucesi*. Obtenido de Perfil del tomate de arbol .
- Revelo, J., Alvarez, M., & Perez, E. (2008). El cultivo del tomate de arbol en Ecuador. En *Manual No 65* (pág. 88). Quito: EC.
- Riofrio, L., Arahana, V., & L Torres, M. (2010). Regeneracion de plantas de tomate de arbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. Quito, Ecuador: Colegio de Ciencias Biologicas y Ambientales USFQ.
- Rodriguez, I., Baney, W., Safia, K., Yao, P., & Asimwe, T. (2011). *In vitro plant regeneration of Cyphomandra betacea trough nodal culture*. Butare: National University of Rwanda NUR: Faculty of Agriculture.
- Ruiz, J., & Cstillo, J. (2008). *Regeneración de plántulas, vía embriogénesis somatica en Fragaria virginiana usando ANA y BAP*. Tujillo : REBIOL.
- Skoog, F., & Miller, R. (1957). *Chemical regulators of growth and organ formation in pant tissue culture in vitro*. *Physiology Plant* 100-127.
- Soria, N. (2005). *Informe tecnico de tomate de arbol (Solanum betaceum)*. Quito: Ministerio de agricultura y ganaderia.

- Tabiyeh, D., & Bernard, F. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoots culture. *Acta Horticulturae*, 201-204.
- Torres, M. d., & Arahana, V. (2010). *Manual de Porcedimientos " Laboratorio Biotecnologia Vegetal" USFQ. qYUTI: COCIBA.*
- Valderrama, R., Corpas, F, Rodriguez, M., & Del Rio, L. (2007). 2007. *FEBS Letters*, 453-461.
- Wael, S., & Aldaej, M. (2014). *Effect of ammonium Nitrate on antioxidants production of Phoenix dactylifera at vitro culture.* Giza: Asian Network for Scientific Information.
- Yamada, T., & Nakagawa, H. (1967). Studies of differentiation in culture cells. *Bot Mag Tokyo*, 68-74.
- Yusuf, Z., & Ikram-ul-Haq. (2004). Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Faisalabad, Pakistan: Plant Biotechnology Division, National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE).

## 12. Tablas

**Tabla No. 1:** Eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones y aclimatación de plántulas de *S. betaceum* obtenidos con varias concentraciones de ANA (Ensayo 1)

Concentración ANA (mg/L)	Promedio tamaño de embriones (mm)	Embriones sembrados en MS	Promedio de días hasta la aparición de raíz	Número y eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones	Número y eficiencia de aclimatación
3	2,5	7	9	5 (71%)	4 (80%)
4	4,9	20	6	17 (85%)	13 (76%)
5	5,2	21	7	14 (66%)	10 (71%)
6	4,1	11	9	9 (81%)	6 (66%)
7	3,6	6	9	3 (50%)	3 (100)
Control 0	0	0	0	0 (0%)	0 (0%)

**Tabla No. 2:** Eficiencia del proceso de regeneración de plantas a partir de embriones y aclimatación de las plántulas de *S. betaceum* obtenidas con varias concentraciones de ANA (Ensayo No 2).

Concentración ANA (mg/L)	Promedio tamaño en cm de los embriones (mm)	Embriones sembrados en MS	Promedio de días hasta la aparición de raíz	Número y eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones	Número y eficiencia de aclimatación
2.5	1,8	4	12	1 (25%)	0 (0%)
3.0	2,7	6	8	3 (50%)	1 (33%)
3.5	3,1	11	6	6 (54%)	4 (67%)
4.0	4,9	22	7	18 (82%)	14 (78%)
4.5	5,8	29	7	23 (79%)	17 (74%)
5.0	4,7	25	9	17 (68%)	12 (71%)
0 Control	0	0	0	0 (0%)	0 (0%)

**Tabla No. 3** Eficiencia del proceso de regeneración de plantas a partir de embriones y aclimatación de las plántulas de *S. betaceum* obtenidas con reducción en la concentración de nitrato de amonio en el medio de cultivo MS (Ensayo No. 3).

Concentración de Nitrato de amonio (mg/L)	Tamaño promedio de los embriones (mm)	Embriones sembrados en MS	Promedio de días hasta la aparición de raíz	Número y eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones	Número y eficiencia de aclimatación
400	58	33	8	26 (78%)	19 (73%)
800	60	26	7	21 (81%)	17 (81%)
1200	53	20	10	14 (70%)	11 (78%)
Control 1600	48	23	9	18 (78 %)	13 (72%)

**Tabla No. 4.** Eficiencia del proceso de regeneración de plantas a partir de embriones y aclimatación de las plántulas de *S. betaceum* obtenidos con disminución de nitrato de amonio en el medio MS (Ensayo No. 4)

Concentración de Nitrato de amonio (mg/L)	Promedio tamaño de los embriones (mm)	Embriones sembrados en MS	Promedio de días hasta la aparición de raíz	Número y eficiencia de regeneración de plantas a partir de embriones	Número y eficiencia de aclimatación
400	6,4	27	22	18 (67%)	13 (72%)
200	5,1	19	14	11 (58%)	9 (82%)
0	4,3	13	8	5 (38%)	3 (60%)
1600 Control	5,9	20	14	13 (65%)	9 (69%)

**Tabla No. 5** Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para el porcentaje de embriogénesis somática obtenida entre cada uno de los tratamientos llevados a cabo en el ensayo 1 con variaciones en la concentración de ANA.

Sources	SS	df	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	15212,1212	5	4,7170753	0,0010647	2,3682702	0,6522433	0,21972328
Within Groups	38698,8636	60					
Total	53910,9848	65					

**Tabla No. 6** Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para el porcentaje de embriogénesis somática obtenida entre cada uno de los tratamientos llevados a cabo en el ensayo 2 con variaciones en la concentración de ANA.

Sources	SS	df	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	24915,4401	6	14,1311654	0,0008062	2,24640798	1,18897993	0,52952877
Within Groups	18513,1313	63					
Total	43428,5714	69					

**Tabla No. 7** Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para el porcentaje de embriogénesis somática obtenida entre cada uno de los tratamientos llevados a cabo en el ensayo 3 con variaciones en la concentración de Nitrato de amonio.

Sources	SS	df	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	4441,90547	3	2,3482614	0,0862380	2,8270487	0,4524399	0,0808232
Within Groups	26482,0076	42					
Total	30923,913	45					

**Tabla No. 8** Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para el porcentaje de embriogénesis somática obtenida entre cada uno de los tratamientos llevados a cabo en el ensayo 4 con variaciones en la concentración de Nitrato de amonio.

Sources	SS	df	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between groups	2012,72727	3	1,15782868	0,33777514	2,8387454	0,32225016	0,01064648
Within Groups	23178,1818	40					
Total	25190,9091	43					

**Tabla No. 9.** Prueba de Tukey para porcentaje de embriogénesis somática al variar las concentraciones de ANA, en los ensayos 1 y 2.

ANA mg/ L	N	Mean	Grouping	ANA mg/ L	N	Mean	Grouping
0	60	0.0000	C	0	48	0.00000	C
2.5	60	0.6606	C	3	48	0.19519	B C
3.0	60	0.1001	B C	4	48	0.41160	A B
3.5	60	0.1874	B C	5	48	0.43702	A B
4.0	60	0.3636	B	6	48	0.23212	B
4.5	60	0.4834	A	7	48	0.12512	B C
5.0	60	0.4161	A B				

**Tabla No. 10.** Prueba de Tukey para porcentaje de embriogénesis somática al variar las concentraciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en los ensayos 3 y 4

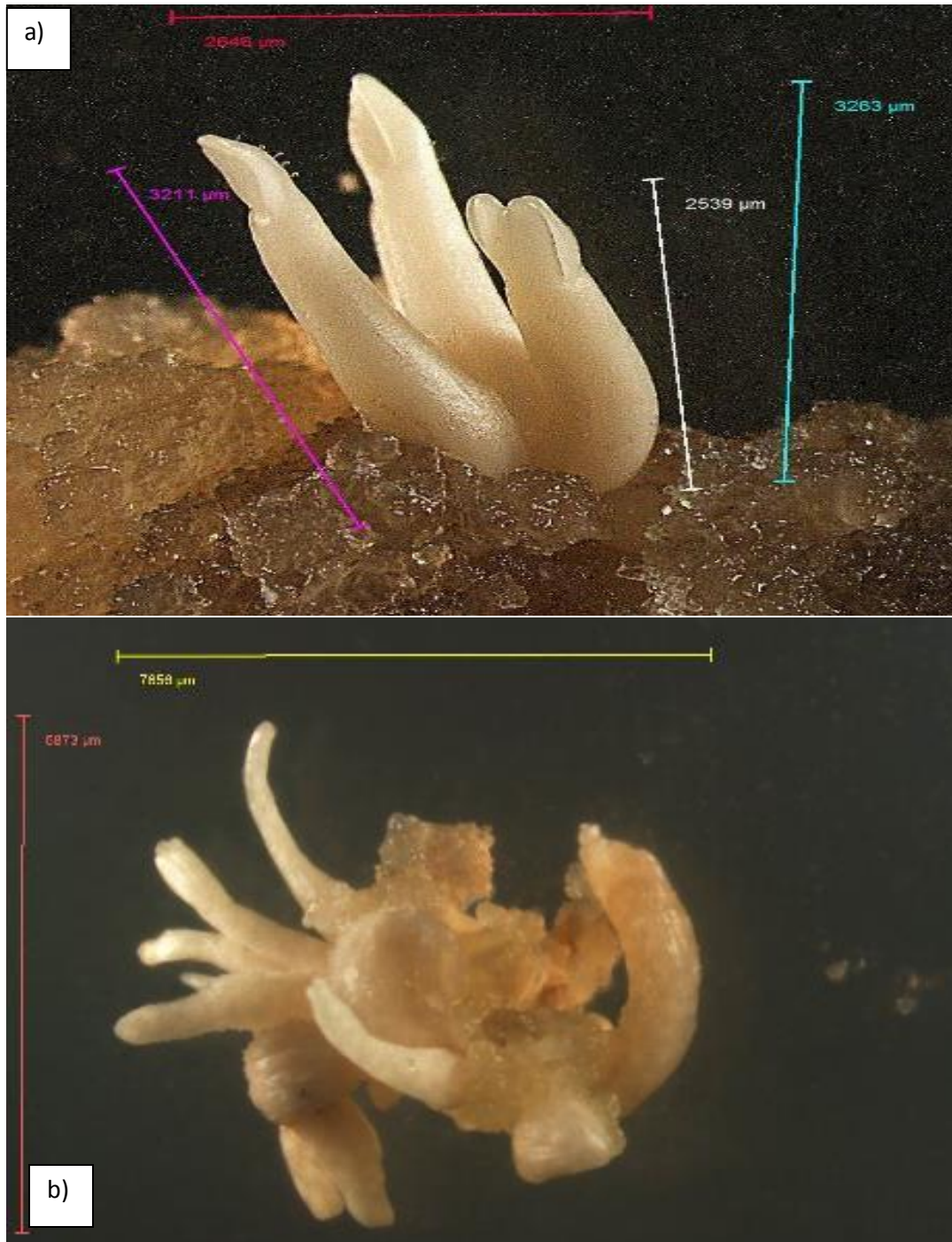
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ mg/ L	N	Mean	Grouping	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ mg/ L	N	Mean	Grouping
400	60	0.4861	A	400	48	0.51252	A
800	60	0.4386	B C	200	48	0.39056	B C
1200	60	0.3341	B C	0	48	0.27341	C
1600	60	0.3874	A B C	1600	48	0.41602	A B



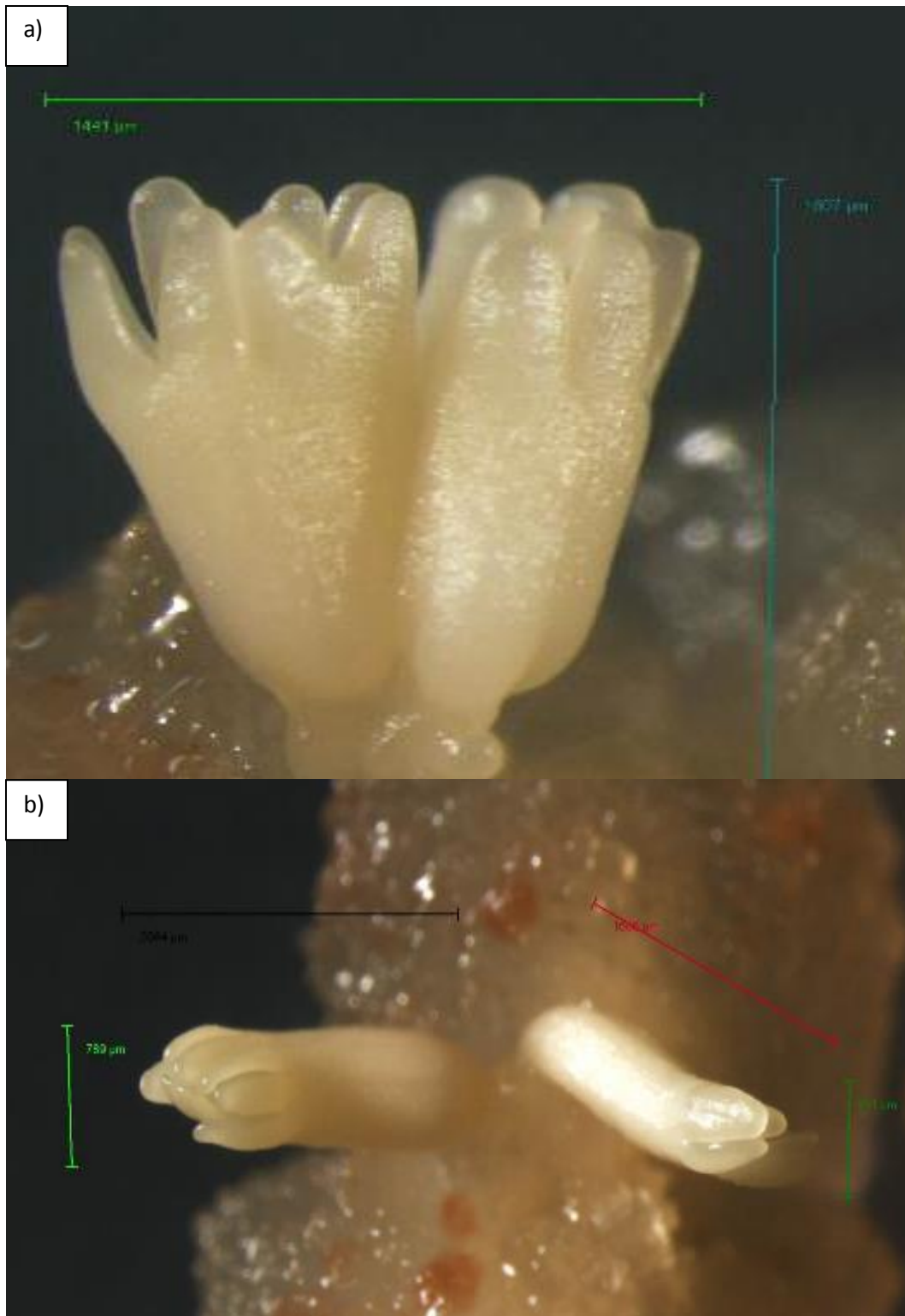
### 13. Figuras.



**Figura No. 1** Disposición de los embriones somáticos de *Solanum betaceum* en su etapa de inducción en MS en el cuarto de cultivo de la Universidad San Francisco de Quito.



**Figura No. 2** Correspondiente a los ensayos 1 y 2 con variaciones en la concentración de ANA a) Embrión obtenido a los 15 días en el ensayo No. 1 a una concentración de ANA de 4mg/L y b) Embrión obtenido en ensayo No. 2 a los 14 días a una concentración de ANA 4.5 5mg/L. Etapa de inducción de los embriones en medio MS libre de hormonas.



**Figura No. 3** Correspondiente al ensayo 3 y 4 con variaciones en la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a) Embrión obtenido en ensayo No. 3 a una concentración de Nitrato de amonio de 400 mg/L y b) Embrión obtenido en ensayo No. 4 a una concentración de Nitrato de amonio de 1600 mg/L.. Etapa de inducción de los embriones en medio MS libre de hormonas.



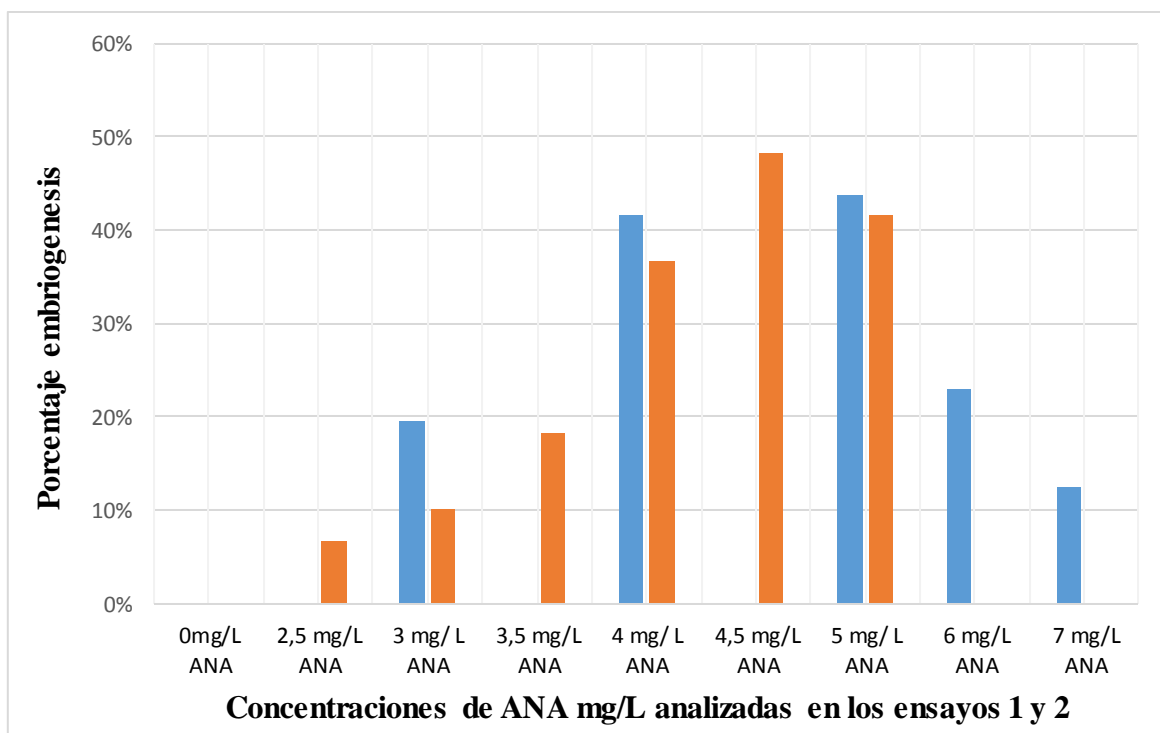
**Figura No. 4** Planta de *Solanum betaceum* obtenida en el tratamiento con 4,5 mg/l ANA en etapa de aclimatación después de ser cultivada en MS



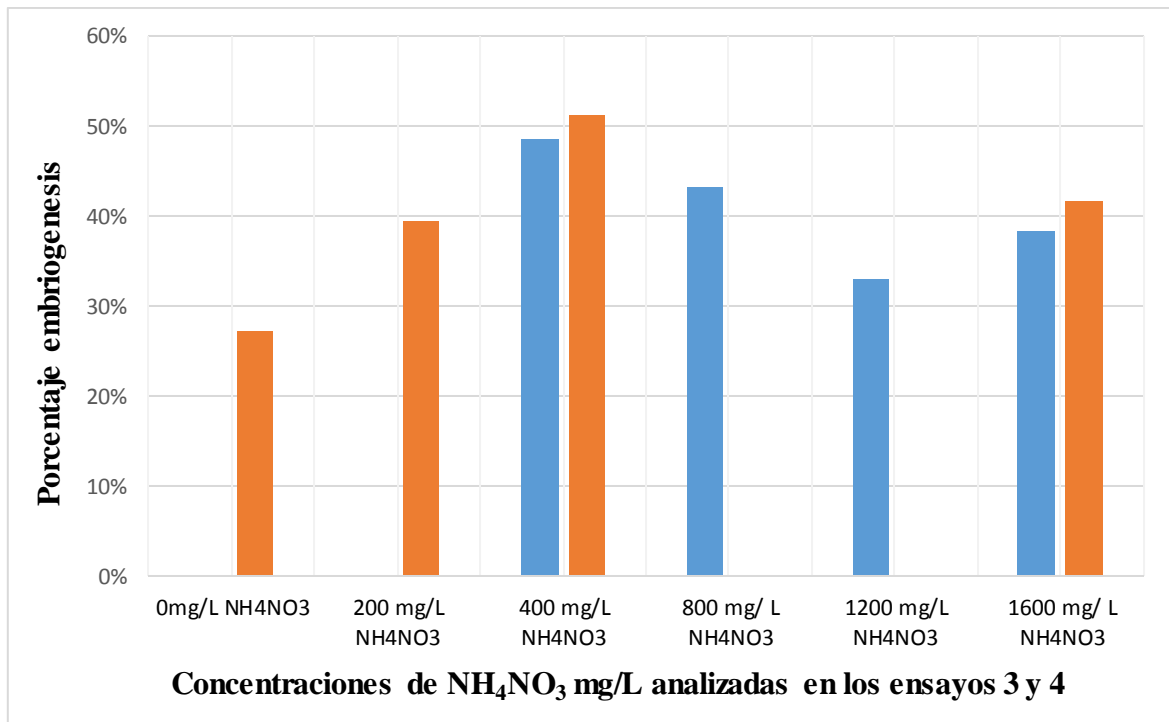
**Figura No. 5** Planta de *Solanum betaceum* obtenida a través de embriogénesis somática, correspondiente al ensayo No 2, tratamiento de 4,5 mg/L ANA, en etapa de aclimatación y siendo transferida a suelo.



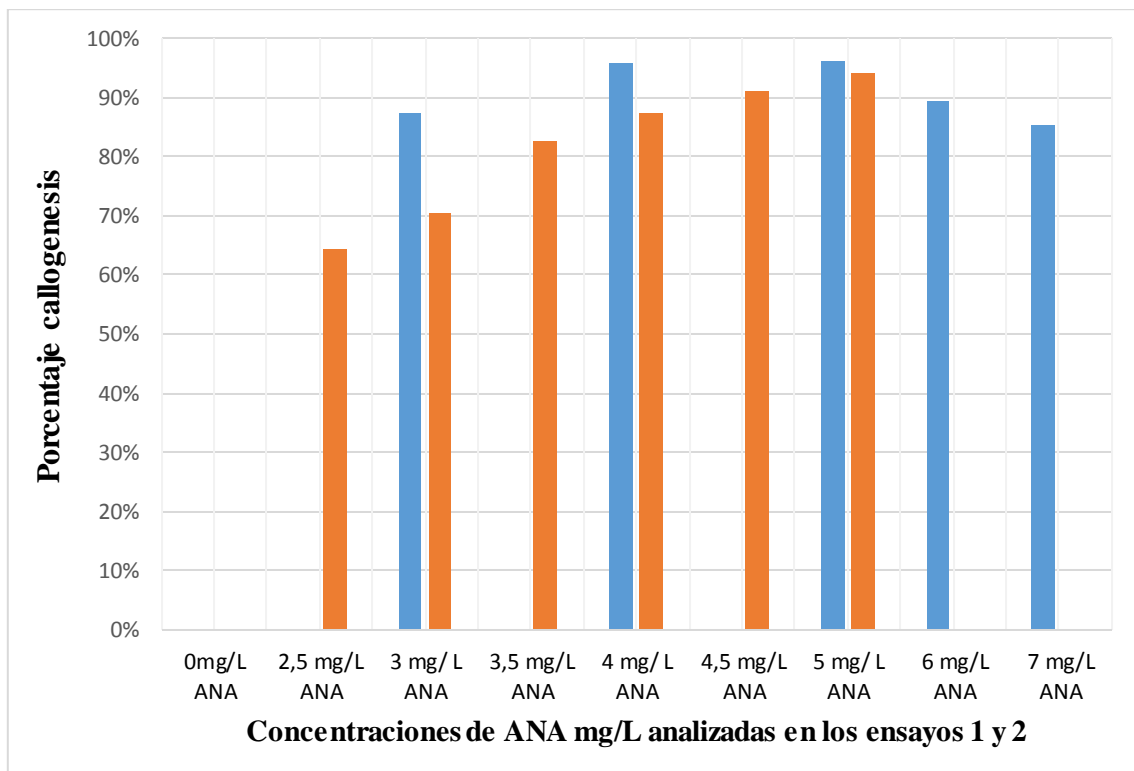
**Figura No. 6** Plantas de *Solanum betaceum* obtenidas a los 4 meses aproximadamente, a través de un proceso de embriogénesis somática, aclimatadas en el invernadero de la Universidad San Francisco de Quito.



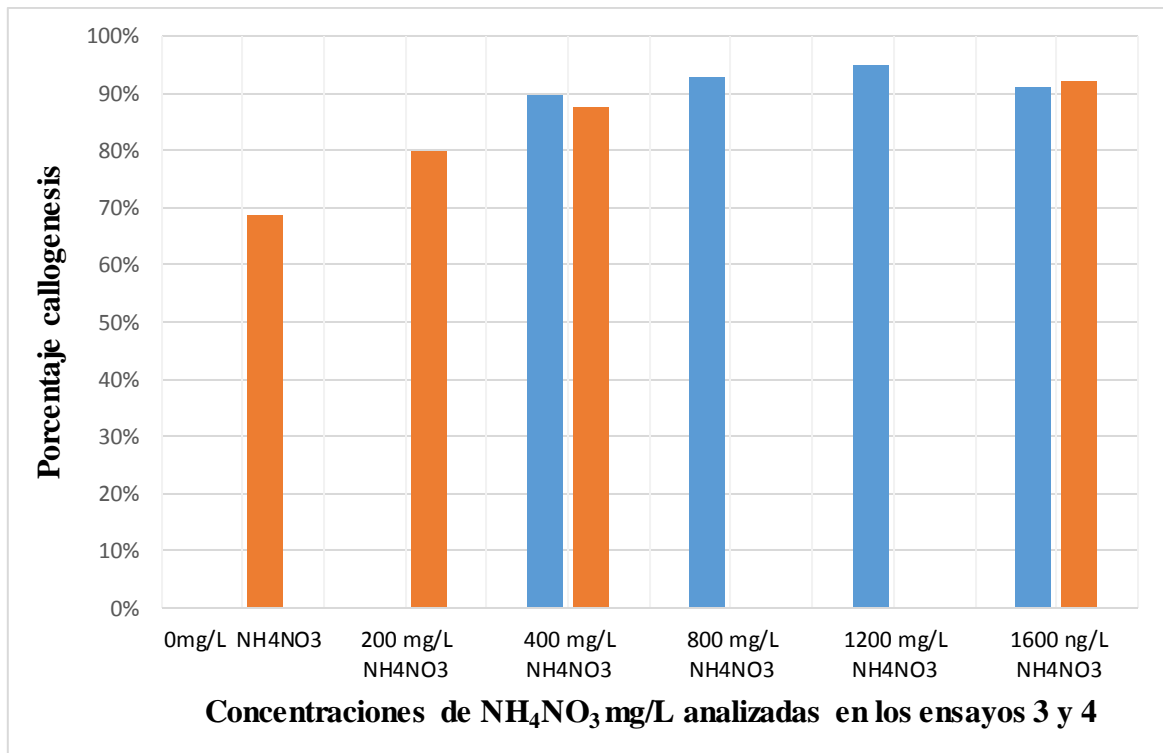
**Figura No. 7.** Porcentaje de embriogénesis somática obtenido al variar las concentraciones de ANA (Ensayos 1 y 2).



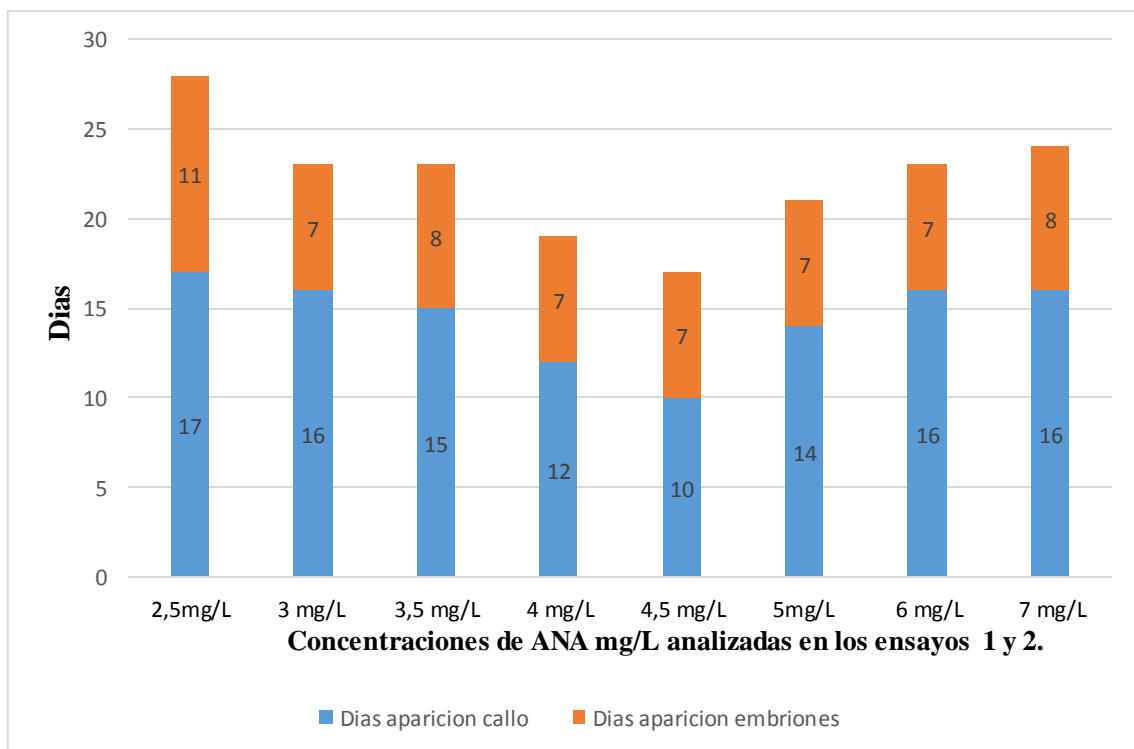
**Figura No. 8.** Porcentaje de embriogénesis somática obtenido al disminuir la concentración de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> en el medio MS (Ensayos 3 y 4).



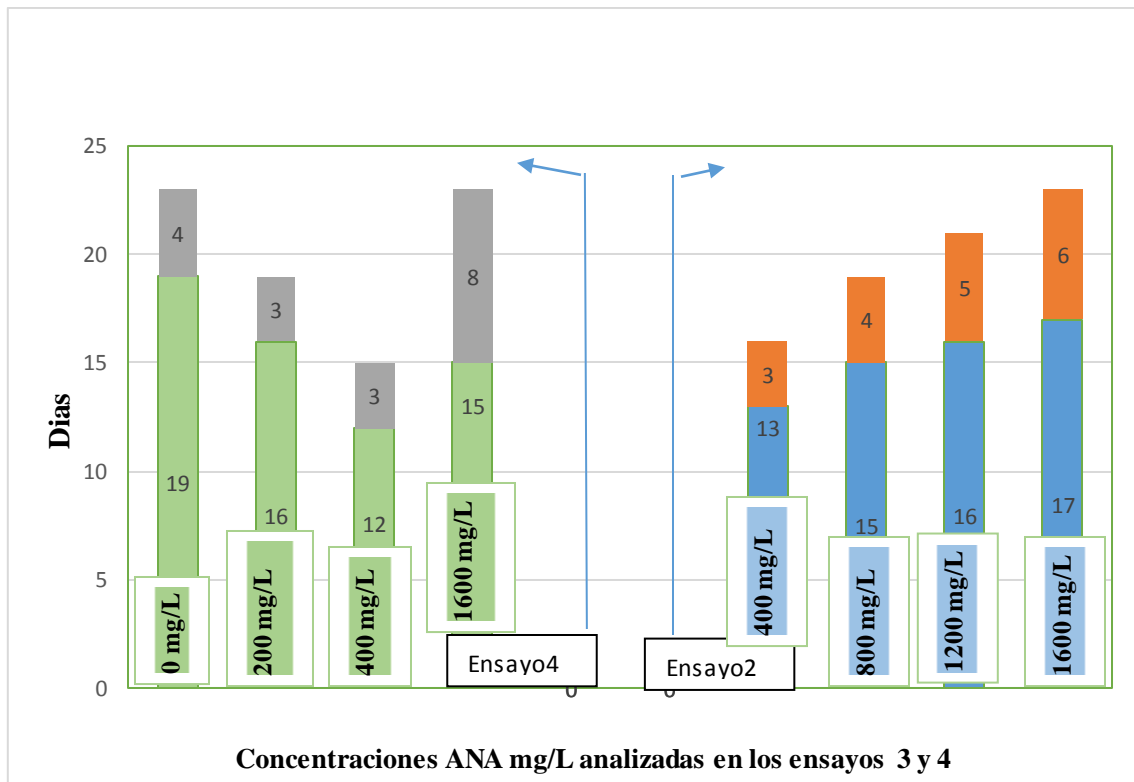
**Figura No. 9** Porcentajes de callogenesis obtenidos para los ensayos No. 1 y 2 con variaciones en la concentración de ANA.



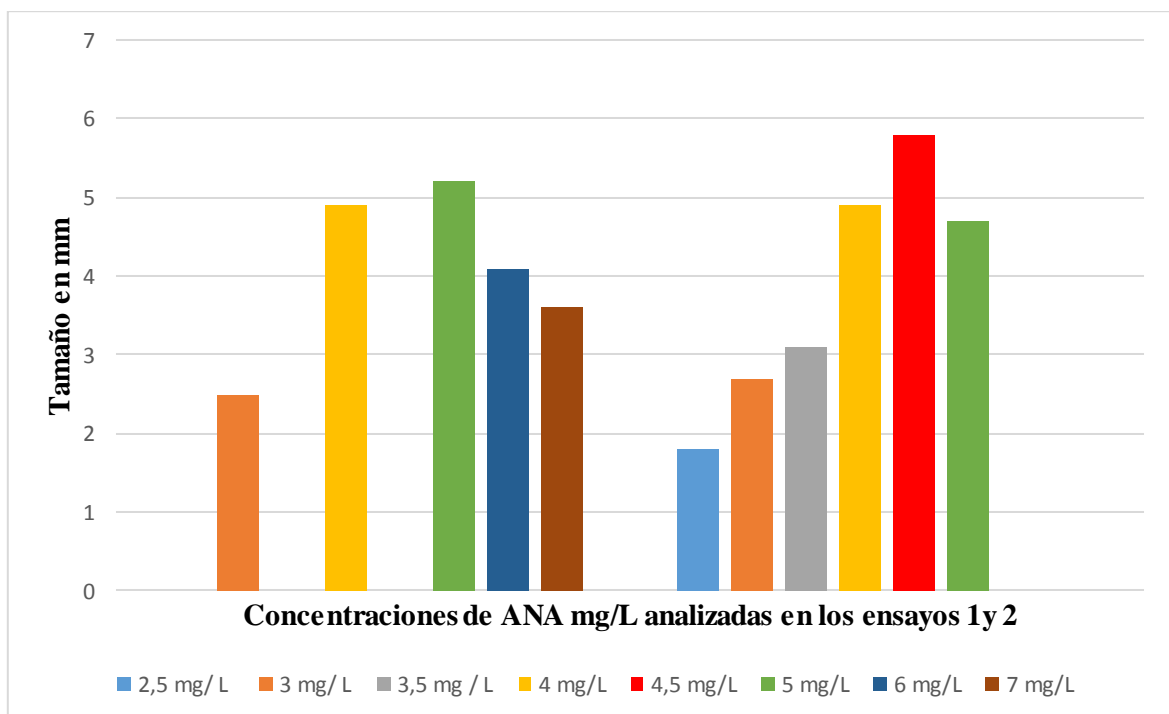
**Figura No.10** Porcentajes de callogenesis obtenidos para los ensayos 3 y 4 con variaciones en la concentración de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.



**Figura No. 11.** Días de aparición de callo y de embriones somáticos en los ensayos 1 y 2, con variaciones en la concentración de ANA.

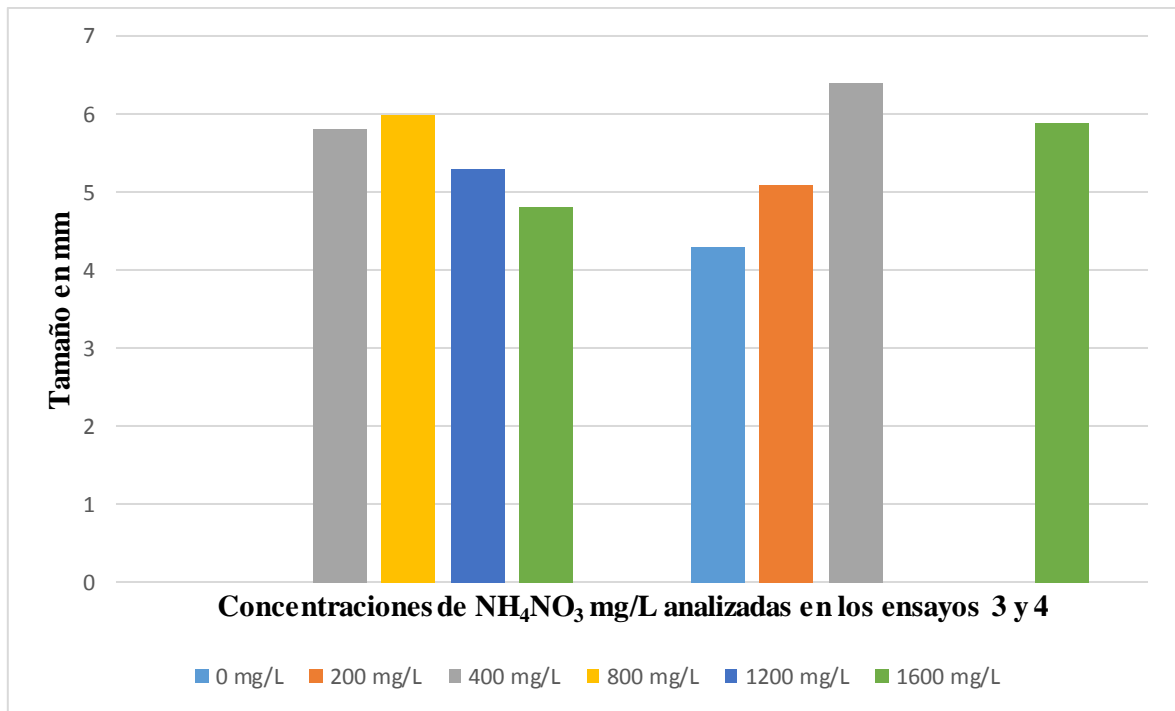


**Figura No. 12** Días de aparición de callo y embriones somáticos en los ensayos 3 y 4, con variaciones en la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .



**Figura No. 13** Tamaño en (mm) de los embriones somáticos obtenidos en los ensayos 1 y 2





**Figura No. 14** Tamaño en (mm) de los embriones somáticos obtenidos en los ensayos 3 y 4