

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

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

José Julián Apraez M¹., Janio Fabián Romo D¹., Tulio Cesar Lagos B².

Fecha de recepción: Agosto 15 de 2011

Fecha de aceptación: Diciembre 11 de 2011

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener plantas de tomate de árbol (*C. betacea*) bajo condiciones *in-vitro*, mediante la organogénesis inducida en callos. Se evaluaron los tratamientos MS (testigo), MS+2,4-D5 μ M, MS+2,4-D10 μ M y MS+2,4-D15 μ M. Para el segundo, tercer y cuarto tratamiento se agregó 13 μ M de Cinetina. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, para un total de 16 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo compuesta por diez contenedores de vidrio con capacidad de 120 ml cada uno. En cada contenedor se agregaron 20 ml de medio de cultivo, sembrándose tres callos de aproximadamente 5 mm de diámetro, teniendo 120 callos por unidad experimental. El mayor porcentaje de plantas regeneradas (14,66 %) se obtuvo con MS+2,4-D5 μ M y el menor porcentaje (2,91%) con MS+2,4-D15 μ M. La mayor cantidad de raíces, tallos, hojas y plantas formadas ocurrieron con MS+2,4-D5 μ M, con valores de 0,52, 0,14, 0,15 y 0,05, respectivamente y el menor valor se obtuvo con MS+2,4-D15 μ M con valores 0,09, 0,04, 0,008 y 0, en su orden.

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

¹ Ingenieros Agrónomos Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. julianap@hotmail.com; nioro10@hotmail.com.

² Profesor Asociado. Ph.D. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, Pasto, Colombia. tclagos@udenar.edu.co

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain tree tomato plants (*C. betacea*) in vitro, by induced organogenesis in callus. A complete randomized block design, with four treatments and four replications was used. Treatments studied were: (1) MS (check), (2) MS + 2.4D 5 μ M, (3) MS + 2.4D 10 μ M y (4) MS + 2.4 D 15 μ M; 13 μ M of kinetin were added to treatments 2, 3, and 4. The experimental unit consisted of 10 glass containers, with a capacity of 120 ml. In each container 20 ml of culture medium were added and were sown three calluses with a diameter of 5 mm. The highest percentage of regenerated plants (14,66%) was obtained with treatment MS + 2,4 D 5 μ M (T2), and the lowest (2,91%) with MS + 2,4D 15 μ M. Formation of roots, stems, leaves and regenerated plants was higher using MS + 2.4D 5 μ M (T2), with values of 0,52, 0,14, 0,15 and 0,05, respectively, while lower values were obtained with treatment 4, MS + 2.4 15 μ M, with values 0,09, 0,04, 0,008 and 0, for the same characteristics.

Key words: in vitro, hormones, growth medium, morphogenesis, Murashige and Skoog.

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*C. betacea*) ha comenzado a tomar gran importancia económica en Colombia debido al alto consumo en las diferentes presentaciones y al contenido de vitaminas y demás compuestos que ayudan a prevenir enfermedades. Este cultivo genera 642 jornales/ha, lo que significa que una hectárea requiere de 0,89 personas trabajando 261 días al año; es decir, se necesita cultivar 1,23 ha para generar un empleo permanente por año (Agrocadenas, 2008). Además, su incorporación en sistemas de cultivo para la exportación, hace necesario que se desarrollen tecnologías que permitan obtener plantas de buena calidad sanitaria para los agricultores.

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

producidas por el hongo *Colletotrichum acutatum* Penz, causante de la antracnosis en el tomate de árbol.

Brotos de tomate de árbol subcultivados en presencia de 1,07 μ M de ANA (Ácido Nafalenacético), 0,88 μ M de BA y 0,58 μ M de GA₃ (ácido giberélico) iniciaron la formación de raíces, luego de cuatro semanas, obteniéndose plántulas que se desarrollaron rápidamente en un sustrato de suelo no estéril. La regeneración de plantas a partir de las yemas axilares fue del 67%. Estas produjeron nuevos brotes en presencia de 0,11 μ M de ANA y 11,41 μ M de zeatina (Z) y posteriormente, se enraizaron en un medio y tiempo similar a los anteriores. Los pecíolos, cotiledones y ovarios formaron directamente embriones somáticos, después de un período de aproximadamente 45 días (Obando y Jordan, 2001).

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

tica. En varias especies frutales y forestales se han hecho estudios para obtener plantas *in-vitro* por medio de organogénesis indirecta (Dalzoto y Docampo *et al.*, 1997).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo estuvo orientado a la evaluación de medios de cultivo *in-vitro* con diferentes concentraciones de Auxinas y Cinetinas en la morfogénesis de tomate de árbol a partir de callos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Nariño, con temperatura promedio de 20°C, humedad relativa de 75% y un fotoperiodo de 16 horas luz.

Fase de laboratorio. Se sembraron callos provenientes de material de tomate de árbol existente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, en contenedores de vidrio de 120 mL los callos tenían un diámetro aproximado de 5mm.

Medios de cultivo. Los callos sometidos a organogénesis formados a partir de cultivo de hipocotilos y yemas de tomate de árbol se evaluaron en los medios basados en modificaciones hormonales del medio básico MS + ANA (5 mL.L⁻¹) + cinetina (2 mL.L⁻¹) + sacarosa (30 g.L⁻¹) + agar (6 g.L⁻¹) a un pH = 5,7.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos estudiados para la organogénesis a partir de callos fueron MS (Testigo), MS+5µM2,4-D, MS+10µM2,4-D y MS+15µM2,4-D. La concentración de cinetina en los tratamientos segundo, tercero y cuarto fue de 13 µM. La

variación de los tratamientos se presentó en concentraciones de 5, 10 y 15 µM de 2,4-D. y cuatro repeticiones, para un total de 160 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo compuesta por diez contenedores con capacidad de 120 ml. En cada frasco se agregaron 20 ml de medio de cultivo, sembrándose tres callos de aproximadamente 5 mm de diámetro, teniendo 30 callos por unidad experimental.

Variabes a evaluar. Las variables evaluadas correspondieron a peso de callos en g (PC), volumen de callos en mL (VC), callos con morfogénesis en porcentaje (CM), plantas regeneradas en porcentaje (PR), número de órganos (NO), número de raíces (RAIZ), número de tallos (TALLOS), número de hojas (HOJAS), plantas formadas por callo (PLANTAS).

Análisis estadístico. Las variables evaluadas se sometieron al Análisis de Varianza bajo el modelo de Bloques Completos al Azar. En aquellas variables donde se observaron diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación de medias DMS (Diferencia Mínima Significativa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso de callos (PC). En PC se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. El mayor promedio de PC se presentó con el tratamiento MS+5µM2,4-D (0,41g). Esto sugiere, que la concentración más baja de 2,4-D influyó en el incremento de PC. Entre los otros tratamientos no existieron diferencias (Fig.1). Esto concuerda con los hallazgos de Bornman y Vogelmann (1984) quienes afirman que el aumento en la concentración de auxinas, puede dar lugar a descensos en la tasa de proliferación de brotes, lo cual se relaciona con una reducción en la absorción de cinetinas y de iones por cambios en el potencial de agua en

el medio de cultivo haciendo que el desarrollo del callo sea más lento. Además, Calderón y Rotella (1998) encontraron que una baja concentración de auxinas, o en ausencia de éstas, se consigue una mayor elongación.

Volúmen de los callos (VC). En esta variable se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento MS+5 μ M2,4-D (0,46 mL) y los medios MS(0,34 mL), MS+10 μ M2,4-D (0,2 mL) y MS+15 μ M2,4-D (0,2 mL). Entre los últi-

mos tres tratamientos no se observaron diferencias estadísticas. Como en PC, los mayores valores se obtuvieron con la menor concentración de 2,4-D (Fig 1). Resultados similares obtuvieron Roca y Mroginski (1991) en *Agave* sp., encontrando que las diferencias entre los medios obedecieron a ligeros cambios en la concentración de 2,4-D, mostrando mejores resultados los tratamientos con menor contenido de reguladores de crecimiento, para este caso auxinas.

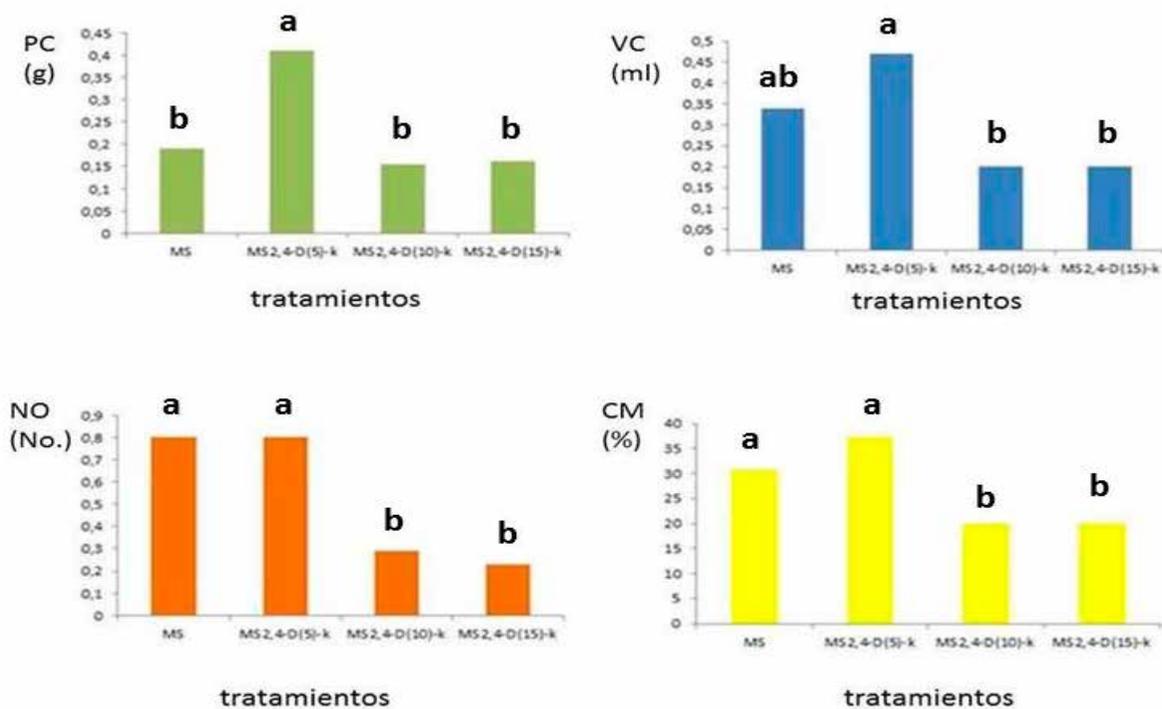


Figura 1. Comparación de promedios para el peso de los callos (PC), el volumen de los callos (VC), el número de órganos (NO) y el porcentaje de callos con morfogénesis (CM), para los medios de cultivo.

Número de órganos (NO). Entre los tratamientos MS (0,8) y MS+5 μ M2,4-D (0,8) no se presentaron diferencias en el NO, al igual que entre MS+10 μ M2,4-D (0,29) y MS+15 μ M2,4-D (0,23). Pero si se observaron diferencias entre los dos primeros y los dos últimos (Fig.1). Como en los casos anteriores, los tratamientos con menores concentraciones de 2,4-D fueron los de mayor NO. Para lograr una mo-

fogénesis completa es necesario establecer un balance en la concentración de auxina/cinetina, por que puede suceder que al aumentar la cantidad de cinetina respecto a la auxina, se induce la formación de brotes (Barceló *et al.*, 1995).

Callos con morfogénesis (CM). En CM se observaron diferencias significativas entre

MS+5 μ M2,4-D (37%), MS (30,79%) y los tratamientos MS+10 μ M2,4-D (20,08%) y MS+15 μ M2,4-D (20%). Es de anotar que no existieron diferencias entre los dos primeros ni entre los dos últimos tratamientos (Fig. 1). Al igual que para las anteriores variables, los medios con menor contenido de 2,4-D (MS+5 μ M2,4-D) mostraron mejor respuesta de morfogénesis. En este caso, se comprueba que las Cinetinas estimulan la morfogénesis. Por otro lado, la conservación del crecimiento de callos indiferenciados es generalmente lograda con concentraciones similares de cinetina y auxina. Una alta relación molar de cinetina sobre auxina tiende a inducir desarrollo de estructuras, mientras que una alta relación de Auxina sobre Cinetina induce poco desarrollo, por lo tanto, su balance debe ser esencial para el desarrollo de los diferentes órganos (George y Sherrington, 1984).

Plantas regeneradas (PR). Acorde con la Fig. 2, el porcentaje de PR fue diferencial entre los tratamientos, presentándose igual comportamiento que en las variables anteriores. Los mayores valores de PR se observaron en MS (15,75%) y MS+5 μ M2,4-D(14,66%), los cuales no mostraron diferencias entre sí. Igualmente, los medios MS+10 μ M2,4-D (5,08%) y MS+15 μ M2,4-D (2,91%), no se diferenciaron

significativamente entre sí, pero si presentaron diferencias con los dos primeros tratamientos, lo que permite inferir que hay un efecto limitante de 2,4-D, dado que a medida que aumenta su contenido en el medio, los valores de PC, VC, NO, CM y PR son menores a medida que se aumenta su concentración, esto concuerda con lo manifestado por Powers y Backhaus (1989) quienes trabajaron con la regeneración de plantas a través de organogénesis y determinaron que el medio MS más 2,4-D en una dosis de 1,4 μ M fue el mejor para la generación de tejido caloso y la diferenciación de brotes. Con dosis de 4,4 a 5,4 μ M de 2,4-D, fueron limitantes para el crecimiento.

Formación de raíces, tallos, hojas y plantas.

Los resultados de la Fig. 3 revelan que en un 99,48% no ocurrió la organogénesis. Los tratamientos MS y MS+5 μ M2,4-D mostraron mayor generación de brotes que MS+10 μ M2,4-D y MS+15 μ M2,4-D. En comparación al trabajo de Hamidah *et al.* (1997) quienes lograron inducir gran número de estructuras con 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, se podría afirmar entonces que el comportamiento observado esta relacionado con el tipo y la concentración de auxina utilizada ya que hubo menor crecimiento con altos contenidos de 2,4-D.

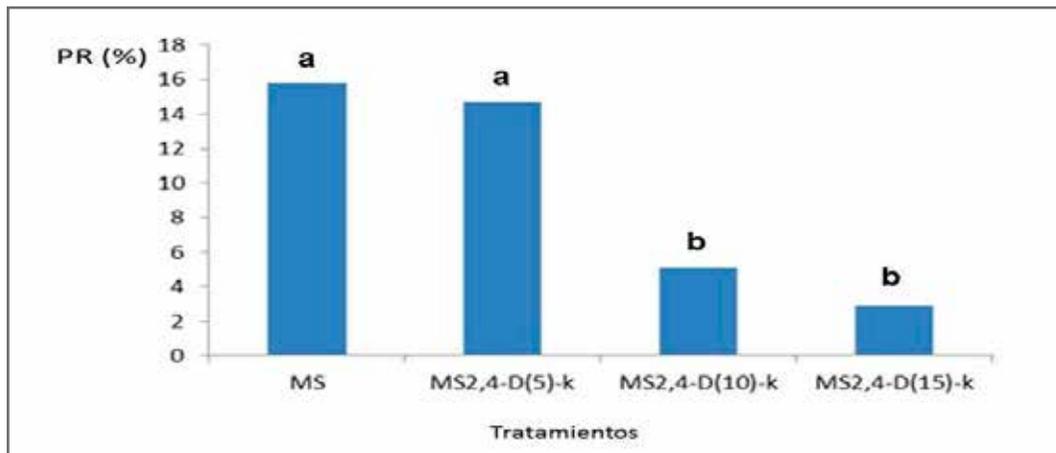


Figura 2. Efecto de MS,MS+5 μ M2,4-D, MS+10 μ M2,4-D y MS+15 μ M2,4-D sobre callos de *C. betacea* en el porcentaje de regeneración de plantas (PR).

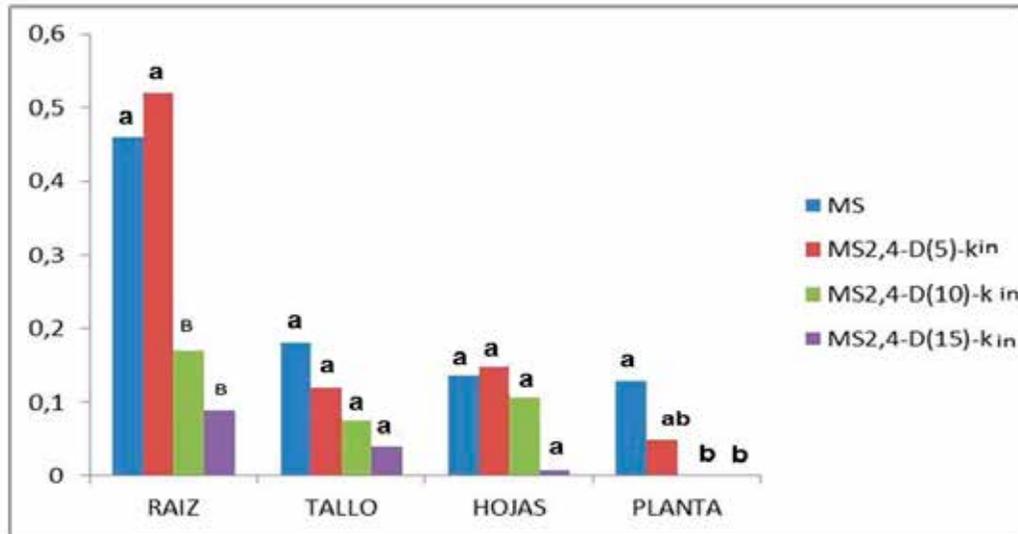


Figura 3. Organogénesis observada en *C. betacea* con los tratamientos MS, MS+5µM 2,4-D, MS+10µM y MS+15µM 2,4-D.

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

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

Tanto en caulogénesis como en filogénesis no se presentaron diferencias significativas (Fig. 3). El número de tallos formados osciló entre 0,04 y 0,18 y de hojas formadas osciló entre los valores 0,008 y 0,15. En este orden de ideas, Burch y McGaw (1993) señalan que el incremento endógeno en auxinas produce cambios en el desarrollo de la senescencia de las hojas o el incremento del crecimiento del brote.

En cuanto en la organogénesis completa no se presentaron diferencias significativas entre MS y MS+5µM 2,4-D. Los medios MS+10µM 2,4-D y MS+15µM 2,4-D no formaron plantas (Fig.3). Es de anotar, que la organogénesis completa depende del balance de la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, puesto que el medio con menor concentración de 2,4-D presentó un mayor número de plantas completas. Estos resultados no concuerdan con lo planteado por Muñoz (2000) quien señala que un aumento en la concentración hormonal origina la proliferación de una gran cantidad de brotes de *Castanea sativa*. Según Vieitez y Vieitez (1982) a concentraciones de

1 ó 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D se obtiene el máximo número de brotes en material juvenil, por lo que concluyeron que la concentración óptima para la proliferación de órganos se encuentra entre 0,1-0,5 mg.L⁻¹ y que la multiplicación de brotes en medio de cultivo carente de 2,4-D es prácticamente nula; es de anotar, que las respuestas hormonales dependen en gran medida de los contenidos hormonales internos de los tejidos de cada especie en particular (Roca y Mroginsky, 1991).

En la Fig. 4 se observa diferentes tipos de organogénesis obtenidos con los diferentes medios en el cultivo de callos de *C. betacea*. Estos resultados permiten plantear que el alto contenido hormonal puede ocasionar que los callos no se desarrollen y permanezcan inactivos, dando lugar a que no haya proliferación ni crecimiento de los mismos. Bajo estas condiciones, para inducir la diferenciación de los callos, se deben cultivar en medio MS sin 2,4-D, obteniéndose raíces y plántulas.

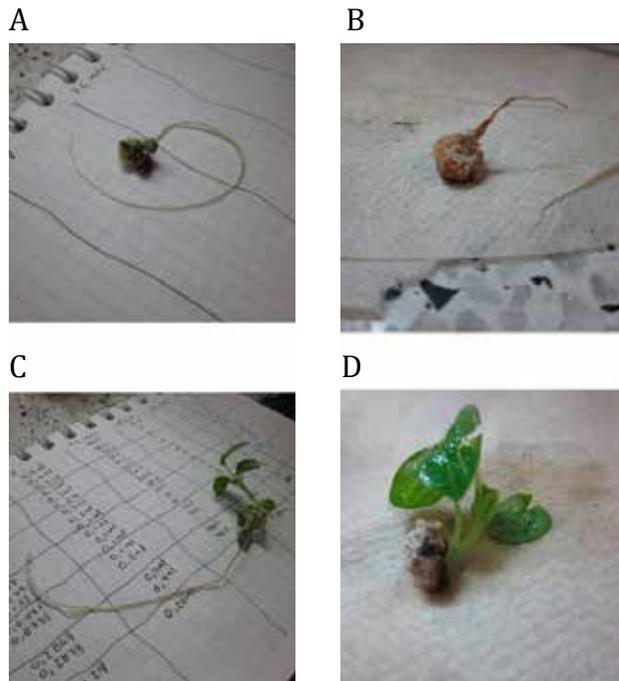


Figura 4. Estructuras obtenidas con diferentes medios de cultivo en *C. betacea*. (A) raíces; (B) tallos; (C) plantas y (D) hojas.

En todos los medios de cultivo utilizados no se obtuvo una buena morfogénesis, concluyéndose que la combinación de hormonas utilizadas no fue la adecuada. Para lograr organogénesis a partir de callos, es necesario que el medio de cultivo sea suplementado con una menor concentración de cinetinas, ya que con esto se logra disminuir la división celular y favorecer la elongación del tejido por la acción de las auxinas (Arredondo, 2000). Onamu *et al.* (2003) sostienen que los reguladores de crecimiento pueden inducir procesos de morfogénesis en el tejido, también pueden ocasionar una respuesta inhibitoria de dicho proceso, además de influenciar características físicas de los brotes obtenidos, hecho que se evidenció en este trabajo, en la respuesta inhibitoria presentada en los tratamientos hormonales, donde a pesar de reportar una alta producción de brotes organogénicos, estos presentaban algunas anomalías morfológicas como albinismo.

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo expresan su agradecimiento al grupo de Investigación en Producción de Frutales Andinos de la Universidad de Nariño por su colaboración en la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- AGROCADENAS. 2008. Análisis - Estadísticas. [En línea]. 2008. Disponible en Internet: <http://www.Agronet.gov.co /Agronetweb/ AnalisisEstadisticas/ tabid/73/Default.aspx>. consulta: 1 marzo de 2011
- ARREDONDO, A. 2000. Establecimiento de cadenas proliferativas y enraizamiento in-vitro de *Juglans regia* L. a partir de embriones. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 55 p
- BARCELO, J., NICOLAS, G., SABATER, B. y SANCHEZ, R. 1995. Fisiología Vegetal. 6ª ed. Madrid: Ediciones Pirámide S.A. 662 p.
- BORNMAN, C.H. y VOGELMANN, T.C. 1984. Effect of rigidity of gel médium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in-vitro in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61:505-512.
- BURCH, L. y McGAW, B. 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. In: AZCON-BIETO, J., M. TALON. Madrid, España: McGraw-Hill. 319-325pp.
- CALDERON, X. y ROTELLA, R. 1998. Establecimiento in-vitro de *Beilschmiedia berteriana* (Gay) Kostermans (Lauraceae). *Información Tecnológica.* 9(5): 269-275.
- DALZOTO, A. y DOCAMPO, D. 1997. Micropropagación de los portainjertos de ciruelo Mariana 2624 (*Prunus cerasifera* x *Prunus musionana*) y Pixy (*Prunus insisia* L.) de sanidad controlada. *Phyton.* (60):127-135.
- GEORGE, E. y SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. 1a. ed. Basingstoke, Exegetics Limited. 709p.
- HAMIDAH, M., GHANI, A. y DEBERGH, P. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48:189-193.
- 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. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. 50 p.
- LEE, H., CRUZ, J. y GARCIA, B. 2003. Proliferación de brotes múltiples y aclimatación de anturio (*Anthurium adreanum* L.) Midori y Kalapana cultivadas in-vitro. *Rev. Fitotec. Mex.* 26(4): 301-307.
- MARGARA, J. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo in-vitro. Madrid, Mundi- Prensa. 236p.
- MUÑOZ, M. 2000. Multiplicación in-vitro de clones selectos de *Castanea sativa* Mill. Memoria de Título. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile. 39 p.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- OBANDO, M. y JORDAN, M. 2001. Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo) cultivated in-vitro. *Acta Horticulture.* (560): 429 - 432.
- ONAMU, R., OBUKOSIA, S., MUSEMBI, N. y HUTCJINSON, M. 2003. Efficacy of Thidiazuron In-vitro propagation of carnation shoot tips: Influence of Dose and Duration of Exposure. *African Crop Science Journal.* 11(2): 125-132.
- POWERS, D.E. y BACKHAUS, R.A. 1989. In-vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16. 57-60 pp.
- ROCA, M. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali. 970 p.
- VIETEZ, A. y VIETEZ, M. 1982. *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated in-vitro. *Scientia Horticulturae.* 18: 343-351.