

**OPTIMIZACION DE LA REGENERACION DE LULO (*Solanum quitoense*),
ORIENTADA A LA TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS**

VANESA SEGOVIA BUCHELI



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCIA - SEDE LA RABIDA-
HUELVA (ESPAÑA)**

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT

II MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

2002

OPTIMIZACION DE LA REGENERACION DE LULO (*Solanum quitoense*),
ORIENTADA A LA TRANSFORMACION GENETICA DE PLANTAS

VANESA SEGOVIA BUCHELLI

Proyecto de Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Master en Biotecnología de Plantas.

Directora:

ZAIDA LENTINI
Bióloga, MSc, Ph.D.
Staff Principal

Unidad de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT

Tutor de Laboratorio:

PAUL CHAVARRIAGA AGUIRRE
Biólogo, Ma, MSc
Asociado de Investigación

Unidad de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCIA - SEDE SANTA MARIA DE
LA RABIDA-HUELVA (ESPAÑA)

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

2002

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. REVISION DE LITERATURA	3
1.1 Generalidades Sobre Lulo	3
1.1.1 Clasificación taxonómica y características	4
1.1.2 Fitomejoramiento en lulo	6
1.2 Cultivo de Tejidos en Lulo	7
1.3 Efecto del Ultrasonido en Cultivo de Tejidos	9
2. MATERIALES Y METODOS	10
2.1 Localización	10
2.2 Material Vegetal	10
2.2.1 Establecimiento de la colección SqEH	11
2.2.2 Establecimiento de la colección SqEG	11
2.3 Medios de Cultivo	12
2.4 Micropropagación	12
2.4.1 Efectos del medio de cultivo y aireación	12

2.4.2 Ensayo de aireación en diferentes medios	13
2.4.3 Efecto de la posición de la yema	15
2.5 Regeneración de plantas	15
2.5.1 Embriogenesis somática	15
2.5.2 Organogénesis	18
2.5.2.1 Efecto del Origen de los Explantes en Organogénesis de lulo	18
2.5.2.2 Efecto de medios de organogénesis en lulo	18
2.5.2.3 Efecto del explante en la organogénesis de lulo	20
2.5.2.4 Efecto del Pretratamiento del explante en la Organogénesis de lulo	20
2.5.2.5 Efecto del medio de Micropropagación en la regeneración	22
2.5.2.6 Diseño experimental y Análisis Estadístico	22
2.6 Fase de Invernadero	23
2.7 Fase de Campo	24
3. RESULTADOS Y DISCUSION	25
3.1 Efecto del Medio de Cultivo y la Aireación en la Micropropagación	25
3.2 Ensayo de aireación en diferentes medios	34

3.3 Efecto de la posición de la yema	40
3.4 Regeneración de plantas	42
3.4.1 Embriogenesis Somática	42
3.4.2 Organogénesis	44
3.4.3 Efecto del medio de Micropropagación en la regeneración	52
3.5 Fase de Invernadero y campo	54
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5. BIBLIOGRAFÍA	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala establecida para comparar la respuesta de los medios CI, CEFA, 1/2MS y A, con tapón e espumilla en la tapa (condiciones de aireación).

Figura 2. Identificación de yemas de acuerdo a su posición en la planta

Figura 3. Sonicador (Branson 450) en cámara de flujo laminar.

Figura 4. Plantas in vitro de lulo micropropagadas en 1/2MS, Atkinson y Hendrix.

Figura 5. Decoloración blanquecina en las hojas de lulo después de 12 subcultivos (aproximadamente cada mes) en medio 1/2MS.

Figura 6. (A) Días a enraizamiento de lulo en medios de propagación 1/2MS y A, a treinta días de sembrado en el medio de cultivo. Valores seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes; (B) Registro fotográfico

Figura 7. Efecto de la aireación en medios CI, CEFA, 1/2MS y A.

Figura 8. Comparación del estado de desarrollo de plántulas de lulo subcultivadas en los medios CEFA, CI, 1/2MS y A bajo condiciones de aireación (con espumilla en la tapa), a los 60 días después del subcultivo.

Figura 9. Desarrollo de plántulas de lulo en condiciones de aireación, cultivadas en los medios CI, CEFA, 1/2MS y A, hasta los 60 días. Donde la escala 1 representa plantas menos desarrolladas y la escala 5 las más desarrolladas.

Figura 10. Días de enraizamiento en plantas micropropagadas a partir de la yema en posición 1, 2 y 3.

Figura 11. Hoja cotiledonar de lulo en medio de embriogénesis a los 55 días.

Figura 12. Hojas expandidas de lulo (SqE) fenolizados después de 30 días en medio Hendrix

Figura 13. Hojas apicales en medio de regeneración: Antes de pretratamiento (A); Después del pretratamiento (B) y 15 días en medio de regeneración (C).

Figura 14. Brote regenerado a partir de lámina foliar a los 30 días de iniciar el ensayo.

Figura 15.(A) Evolución de pecíolos en el proceso de regeneración. (B) Pecíolo regenerando brotes múltiples a los 50 días en medio Ultzen.

Figura 16. Regeneración de brotes a los 55 días en dos genotipos de lulo, en tres medios de cultivo, utilizando pecíolo y hoja como explante. Las plantas donantes de los explantes fueron micropropagadas en medio 1/2MS.

Figura 17. Regeneración en medio Ultzen de pecíolos provenientes de plantas micropropagadas en medios A o 1/2 MS.

Figura 18. Plantas regeneradas desarrolladas en invernadero. Genotipo con espinas(A) y sin espinas(B)

Figura 19. Cultivo de plantas regeneradas y clones en campo a los 90 días después del transplante.

Figura 20. Desarrollo en campo de plantas regeneradas y clones mantenidos in vitro medidos por el tiempo de generación del botón floral, floración y fruto.

Figura 21. Llenado de fruto: (1) Flor abierta; (2) 15 días después de antesis; (3) 45 días

después de fecundación.

Figura 22. Días de llenado de fruto en plantas regeneradas y clones: Observaciones realizadas en campo a 20 plantas regeneradas y 20 clones durante 90 días.

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medios de Micropropagación evaluados en lulo

Cuadro 2. Medios de Regeneración evaluados en lulo

Cuadro 3. Efecto en el promedio de longitud de raíz, ancho de hoja, altura y número de nudos de los genotipos SqE y Sq con los protocolos; Hendrix, Atkinson y 1/2 MS, a los 45 días después del subcultivo

Cuadro 4. Número total de plantas de acuerdo al número de raíces producidas por planta en los genotipos SqE y Sq en tres medios de propagación, a los 45 días después del subcultivo.

Cuadro 5. Altura, ancho de la hoja y número de nudos de los genotipos SqE y Sq en los medios A y 1/2 MS, a los 60 días de cultivo.

INTRODUCCION

El lulo (*Solanum quitoense*), también conocido como naranjilla, es un arbusto de la familia *solanaceae*, cuya fruta tropical de pulpa color verde es utilizada para la preparación de refrescos, mermeladas y otros dulces (Denis *et al*, 1985). Actualmente su uso se ha diversificado en la producción industrial de jugos, yogur, saborizantes y alimentos procesados, lo cual ha representado un crecimiento en la producción nacional del 7.8% anual en el periodo 1992-2001 por esta razón se tiene en cuenta en los programas nacionales de reemplazo de cultivos ilícitos (CCI. *On line*, 2000). Este cultivo tiene bajos niveles tecnológicos y es típico de pequeños y medianos productores. Para que el cultivo de lulo sea una alternativa rentable para ellos, se necesitan materiales homogéneos que garanticen una buena producción y que requiera una reducida aplicación de costosos agroquímicos, estos materiales pueden lograrse a través del fitomejoramiento.

Los programas nacionales de fitomejoramiento se dedican a obtener materiales óptimos para darlos a los agricultores, pero en lulo han enfrentado dificultades por ser una planta alógama y por su ciclo de vida largo (Lozada J.V, 1974). En la actualidad la biotecnología, a través de la transformación genética, plantea obtener plantas mejoradas en menos tiempo y sin acudir a los cruces sexuales para ello (CEPRAP. *on line*, 2002), por lo que es posible emplear ésta técnica en la obtención de plantas de lulo mejoradas que puedan tolerar plagas y enfermedades. Pero la biotecnología en frutales tropicales avanza lentamente, y en lulo no se encuentran estudios reportados en transformación genética .

En 1999 el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se propuso desarrollar un protocolo de transformación genética de lulo para apoyar los procesos de fitomejoramiento (CIAT-Annual Report, 2000). El primer paso en el desarrollo de éste protocolo es tener un sistema de regeneración altamente eficiente. Análisis preliminares realizados en la Unidad de Biotecnología del CIAT, utilizando el único protocolo reportado para regeneración de lulo (Hendrix *et al*, 1987), indicaron que no fue reproducible con los materiales de Colombia, esto

condujo a la necesidad de desarrollar una metodología de regeneración para dichos clones. Debido a la ausencia de otros reportes en esta planta, es posible iniciar las investigaciones tomando como base distintos protocolos propuestos en diferentes plantas de la familia *Solanaceae*.

El objetivo de éste trabajo es optimizar el proceso de regeneración en lulo, a través del ensayo de diferentes reportes para brindar un protocolo eficiente, que en el futuro sirva como base para obtener plantas transgénicas con resistencia a plagas y enfermedades, de tolerancia a sus enemigos naturales y pueda ser una opción de siembra rentable para pequeños agricultores en Colombia.

1. REVISION DE LITERATURA

1.2 GENERALIDADES SOBRE LULO

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), también conocido como naranjilla (Ecuador), naranjita de Quito (Perú), lulun (Méjico) y llamado lulum por los Incas (Morton, 1987), es una planta arbustiva que produce frutos de pulpa color verde, ricos en minerales y vitamina C (Denis, 1985). El jugo tiene sabor dulce agrio, utilizado en la preparación de refrescos, helados, mermeladas y otros dulces, pero no se consume en fresco por su carácter ácido. Es una de las frutas exóticas más apetecidas en los mercados nacionales así como en los internacionales, debido a su sabor y color, que la hacen atractiva en comparación con otras frutas (Lobo y Medina, 1999).

Es una planta originaria de los bosques húmedos de la región sub-tropical, en las vertientes oriental y occidental de la cordillera de los Andes, entre 1.200 y 2.800 m.s.n.m. en las regiones pertenecientes a los países de Ecuador, Colombia y Perú. Esta zona de origen está entre 1°37 latitud norte y 4°25 latitud sur y entre las paralelas 62° y 79° (Reyes, 1987).

Colombia y Ecuador son los principales productores, pero también crece en Venezuela, Perú, Panamá, Costa Rica y Guatemala (Heiser, 1993). En Colombia, es un cultivo promisorio que esta ganado importancia en el sector industrial para la fabricación de jugos, yogurt, saborizantes, refrescos y alimentos procesados. La producción ha crecido 7.8% por año en el período 1992-2001 (CCI, *On line*), con un área sembrada de 4.790.2 Ha y una producción anual de 37.313.3 Ton, cultivadas por pequeños y medianos agricultores, por lo que no es un cultivo tecnificado, se caracteriza por su gran variabilidad dentro y a través de las regiones productoras. Aún así, por sus

potencialidades económicas, se tiene en cuenta en el programa de suplantación de cultivos ilícitos (CCI, *On line*).

1.2.1 Clasificación taxonómica y características

Reino:	Vegetal
Subreino:	Espermatofitas
División:	Angiospermae
Subdivisión:	Dicotiledonea
Clase:	Simpetala
Orden:	Tubiflorales
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Especie:	Solanum quitoense (Lamark)
Variedades:	quitoense (tallo sin espinas) septentrionale (tallo con espinas)

El lulo pertenece a la familia *Solanaceae*, la cual tiene cerca de 70 géneros con más de 2.000 especies, la mayor parte distribuidas a través de climas cálidos del neotrópico, aportando gran cantidad de plantas utilizadas por el hombre, tales como la papa (*Solanum tuberosum*), el pepino dulce (*Solanum muricatum*), la berenjena (*Solanum melogena*), el tomate (*Lycopersicum esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) entre otras. El género *Solanum* con aproximadamente 1.200, especies es el mas grande y extensamente distribuido de la familia (<http://florawww.eeb.uconn.edu...>) .

El lulo es una planta herbácea, robusta, de 1,8 a 3,0 m de altura, corteza color gris, hojas grandes, gruesas y succulentas, ovadas y dentadas, que pueden medir hasta 45 cm de largo, color verde oscuro con nervaduras de color púrpura en el haz y blanca o purpúreas en el envés. Toda planta, excepto el haz de las hojas, tiene pubescencia lanosa. Comienza a florecer 5 meses después del transplante, las flores color blanco o lila claro, se agrupan en racimos en un pedicelo corto que contiene hasta diez flores justamente debajo y frente de las hojas. El llenado de fruto comienza 8 meses después del transplante y continua sin

interrupción durante 2 años, el fruto es globular y mide entre 4,0 y 6,5 cm de diámetro, con el exterior color naranja brillante y esta cubierto de vellos cortos quebradizos que caen fácilmente al frotarlos. Internamente el fruto se asemeja al tomate. La cascara es gruesa y coriácea. La pulpa verde claro, pegajosa, ácida y jugosa, contiene muchas semillas, ligeramente mayores que las del tomate. Una planta puede tener una producción de 2 kg por cosecha, generalmente maduran de uno a seis frutos por racimo (Schultes y Cuatrecasas, 1958).

Se reproduce por semilla sexual que es la forma mas común. La propagación por estacas o injerto es posible, pero muy susceptible a las enfermedades fungosas. Las plantas están listas para el transplante a campo definitivo aproximadamente dos meses después de la siembra en almácigo. Su desarrollo es mejor en áreas con temperaturas moderadas (entre 14 y 22 °C), abundante humedad (zonas entre los 800 y 2000 m de altitud), en suelos fértiles que no sean arenosos y en pendientes bien drenadas con precipitación pluvial mínima de 1.500 mm/año (Morton, 1987).

Se considera como una especie diploide con número cromosómico de $2n=24$, pertenece al tipo de cultivos altamente heterogéneos y heterocigotos debido a que tiene polinización cruzada natural. Las especies mas relacionadas con el lulo, son en su mayor parte arbustos comestibles, de números cromosómico $2n=2x=24$. El lulo no presenta mucha diversidad, las poblaciones llamadas septentrionale, se caracterizan por tener espinas y las quitoense están desprovistas de espinas, característica que al parecer está comandada por un solo gen en interacción con el ambiente (Lobo, 1995).

Entre los principales enemigos naturales del lulo se encuentran, el nemátodo *Meloidogyne incognita*, que produce nódulos en la raíz y constituye uno de los principales limitantes para el cultivo, el ataque del minador del fruto *Neoleusindes elegantalis*, la pudrición del fruto causada por *Colletotrichum gloesporioides* y la pudrición algodonosa (*Sclerotinia sclerotiorum*). Se ha reportado una enfermedad que afecta con mayor incidencia en zonas de alta humedad relativa, el patógeno asociado a la enfermedad pertenece al género *Phytophthora* (Lobo, 1983).

1.1.2 Fitomejoramiento en lulo

Los trabajos de fitomejoramiento en lulo son escasos, hasta ahora se ha avanzado en la producción de cruces interespecíficos entre *S. quitoense* y especies relacionadas como; (1) *S. sessiliflorum*, llamado cocona y utilizado ampliamente en el Amazonas; (2) *S. hirtum*, llamado lulo de perro, un material silvestre que tiene como característica la resistencia al *Meloidogine incognita*.

El cruce interespecífico entre lulo y cocona (*S. quitoense* x *S. sessiliflorum*), buscaba incrementar la base genética del lulo. Fue realizado por primera vez en Ecuador por un granjero en su finca, Raúl Viteri, quien obtuvo un híbrido cual denominó “Puyo”, que tiene como característica ser vigoroso, altamente productivo y de semilla estéril por lo que debe ser propagado vegetativamente (Torre y Camacho, 1981). La desventaja del híbrido es que la fruta es mas pequeña que la de lulo, para lo cual se hace necesario una aplicación de 2,4-D muy diluida para lograr incrementar el tamaño del fruto (Heiser, 1993).

Basados en las experiencias de Viteri, Charles Heiser de la Universidad de Indiana (Norte América) comenzó a trabajar en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Palora, en Ecuador, generando otro híbrido entre lulo y cocona que llamaron “Palora”. El cual tiene fruto más grande que el Puyo, no requiere la aplicación de 2,4-D y el jugo comienza a oxidarse 24 horas después de preparado, mucho mas tarde que el Puyo, sin embargo los consumidores prefieren el Puyo, por el color de su pulpa (Heiser, 1993).

En Colombia se busca encontrar un material resistente a *M. incognita* (uno de los principales limitantes para el cultivo) con base al cruce entre *S. quitoense* x *S. hirtum* realizado Charles Heiser en la Universidad de Indiana, quien envió la F2 a CORPOICA, donde se realizaron retrocruzamientos con *S. quitoense*, y se seleccionaron algunas plantas a partir de las cuales se derivó la variedad “Lulo La Selva” (Bernal *et al.*, 1998). La fruta de éste híbrido es de tamaño pequeño y no puede ser utilizada en fresco, ya que se abre y esto impide su comercialización. Actualmente se realizan retrocruces con *S.*

quitoense para seleccionar clones con alta calidad en su fruto y que conserven la resistencia a nemátodos de *S. hirtum*. Por tratarse de un material híbrido, su propagación se realiza en forma asexual, a través de técnicas *in vitro* o mediante la siembra de estacas semileñosas o brotes provenientes de plantas adultas y vigorosas.

Hasta el momento el fitomejoramiento en lulo ha producido clones que presentan características indeseables heredadas de alguno de los parentales, como consecuencia del cruce sexual. Actualmente es posible incorporar directamente características deseadas en una planta utilizando la biotecnología.

La biotecnología es considerada como un conjunto de técnicas biológicas modernas, que busca apoyar los procesos de fitomejoramiento sin emplear la vía sexual, propagando genotipos normalmente inestables en la reproducción sexual y disminuyendo el número y la duración de los ciclos reproductivos necesarios para un programa de selección. Estas técnicas se pueden integrar en dos grupos: (1) aquellas que conducen a la fijación y multiplicación de un genotipo, por ejemplo la micropropagación o el cultivo de tejidos; (2) las dirigidas a la modificación de un genotipo como la ingeniería genética. (Petiard y Deshayes, 1987).

1.2 CULTIVO DE TEJIDOS EN LULO

La práctica del cultivo de tejidos vegetales ha cambiado la forma de aprovechar la propagación de plantas, facilitando una rápida multiplicación de clones y la obtención de plantas libres de virus, así como la posibilidad de propagar vegetativamente plantas recalcitrantes (difíciles de propagar) o para obtener una rápida multiplicación de semilleros en casos donde la semilla presente problemas.

Recientemente se ha documentado la aplicación de esta tecnología en propagación de árboles y arbustos, lo que ha sido aprovechado por algunas compañías para facilitar la comercialización a gran escala de frutales, ornamentales y algunas especies para reforestación (Lineberger, 2000). Pero el mayor impacto del cultivo de tejidos no esta en

el área de micropropagación, si no, en el área de regeneración, que hasta el momento es indispensable para la transformación genética.

Desde 1983, cuando se anunció por primera vez la inserción de genes bacterianos en plantas (Herrera-Estrella *et al* , 1983; Bevan *et al.*, 1983; Frlaey *et al* ., 1983), la transformación genética se ha constituido en una herramienta importante para la obtención de plantas mejoradas con características diferentes de las presentes dentro de la base genética de su especie, como por ejemplo la resistencia a plagas y enfermedades. En este sentido se obtuvieron avances importantes en diferentes plantas, y entre ellas algunas solanáceas como tomate (*Lycopersicum esculentum*) , papa (*Solanum melógena*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*), generando la oportunidad de obtener cultivos más rentables. En especies frutales se avanza lentamente con esta tecnología, pero también se han obtenido algunos avances en papaya, cítricos, tomate de árbol, melón y piña (AGBIOS. *On line*).

En lulo sería importante lograr implementar esta técnica como complemento a los procesos de fitomejoramiento, pero aun no se ha recopilado suficiente experiencia. Hasta ahora se ha trabajado la micropropagación a través del cultivo de meristemos, como una forma alternativa de propagación que ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas tradicionales. En Colombia esta técnica es utilizada en centros de investigación y producción de lulo, para lograr una rápida propagación clonal, de un gran número de plántulas en un corto período y con poca mano de obra, además de que se aprovecha la facilidad de transporte del material *in vitro*. La regeneración de plantas no ha sido muy estudiada hasta la fecha, existe una publicación de la Universidad de Florida (Hendrix, 1987) que reporta organogénesis en lulo.

1.4 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN CULTIVO DE TEJIDOS

El ultrasonido es la base de una técnica conocida como SAAT (del inglés Sonication Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation), utilizada para incrementar la eficiencia de transformación genética con *Agrobacterium* en especies poco o nada susceptibles a la infección. Su principio consiste en aplicar ultrasonido al explante

mientras esta en contacto con la bacteria. El incremento de la eficiencia de transformación, probablemente resulta por los miles de microheridas causadas al explante (afectando células epidérmicas y de mesófilo) que incrementan la probabilidad de infectar células vegetales (OHIO-STATE. *On line*).

Originalmente, la técnica fue planteada por Frizzel (1988), quien estudió los efectos físico, químicos y biológicos del ultrasonido. Posteriormente Joersbo y Brunstedt (1990) lo utilizaron para insertar ADN desnudo en protoplastos de tabaco, pero fue Trick y Finner (1997), en la Universidad del estado de Ohio, quienes implementaron el ultrasonido en los procesos de transformación con *Agrobacterium*, patentando la técnica con el nombre de SAAT (Patente # 5,693,512, otorgada Diciembre 2, 1997).

Basados en la experiencia de la técnica SAAT en transformación, este trabajo experimentará por primera vez el uso del ultrasonido para incrementar la respuesta organogénica en tejidos de lulo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Localización

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos e invernaderos de la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca (Colombia) entre los 3° 30' Norte y 76° 19' Oeste, a una altura de 965 m.s.n.m., con una precipitación anual promedio de 763 mm, humedad relativa de 78% y una temperatura media anual de 24.5°C. La fase de campo se realizó en el corregimiento de DAPA a 27 Km del CIAT, finca “Casa Loma”, a una altura de 1700 m.s.n.m y 21°C.

2.2 Material Vegetal

El Centro Frutícola Andino-CEFA proporcionó clones *in vitro* de lulo con espinas (var. *septentrionale*), denominado en este trabajo como SqE y lulo sin espinas (var. *quitoense*) denominado como Sq. Estas plantas tienen como característica un porte arbustivo de crecimiento (1.8-3 m), bastante ramificadas, de hojas grandes, bordes ondulados, flores actinomorfas dispuestas en las axilas de las ramas formando pequeños corimbos, de frutos grandes esféricos cubiertos de pelusilla punzante, raíces pivotantes y secundarias, bien desarrolladas y leñosas. Las dos variedades difieren en que la *septentrionale* esta provista de espinas en el tallo, ramas, peciolo y en las nervaduras de las hojas tanto en el haz como en el envés (Schultes y Cuatrecasas, 1958). Estos genotipos fueron seleccionados por CEFA en fincas productoras del norte del Valle del Cauca y no cuentan con datos de pasaporte.

Adicionalmente se establecieron las colecciones *in vitro* SqEH (sección 2.2.1) y SqEG (sección 2.2.2) originados a partir de semillas sexuales, para repetir los protocolos descritos por Hendrix (1985) y Guimaraes (1988).

2.2.1 Establecimiento de la colección SqEH

Basados en lo reportado por Hendrix, se compró un fruto de lulo en el supermercado y se le extrajeron 100 semillas. Se sembró una semilla por pote de 8 pulgadas que contenía una combinación de Suelo:Arena (3:1) previamente esterilizada a 80 °C durante 2 horas. Después de 45 días de la siembra se extrajeron los ápices de 2 cm de longitud y fueron llevados a cultivo *in vitro*. En cámara de flujo laminar se realizó la desinfección de los ápices, sumergiéndolos en una solución 20% (v/v) de blanqueador comercial/agua en un volumen de 100 ml con 3 gotas de twin, durante 10 minutos con agitación continua.

Posteriormente se hicieron 5 lavados, con agua bidestilada y deionizada estéril.

Utilizando pinzas quirúrgicas autoclavadas se tomaron los ápices y con un bisturí estéril No.11 se eliminaron los primeros 3 mm de la base haciendo un corte en forma diagonal. Seguidamente se colocaron los ápices en tubos de ensayo de 250 x 20 mm que contenían 5 ml de medio de propagación con sales y vitaminas MS (Murashige and Skoog, 1962), 3% de sacarosa, 7 g/L de agar, pH 5.7 y enriquecido con 0.02 mg/L de BAP y 0.02 mg/L de ANA (Hendrix *et al.* 1987). Se incubaron por 45 días a 21.5 °C, y 15 horas de fotoperíodo con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$.

2.2.2 Establecimiento de la colección SqEG

La semilla se obtuvo de un fruto obtenido en supermercado, y se desinfectó según lo descrito por Guimaraes y colaboradores (1988) bajo condiciones asépticas en cámara de flujo laminar, mediante la inmersión en Etanol 70% durante 2 minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 20 minutos. Después se realizaron 3 lavados con agua bidestilada y deionizada estéril. Las semillas se germinaron en un medio basal MS y fueron cultivadas por 12 días a 21.5 °C, $50 \mu\text{mol S}^{-1} \text{ m}^{-2}$ y 15 horas de fotoperíodo.

2.3 Medios de Cultivo

Los medios se prepararon según lo descrito en los diferentes protocolos de micropropagación o regeneración especificados más adelante. Una vez ajustado el pH con NaOH 1N ó HCL 1N, los medios fueron esterilizados en el autoclave durante 15 minutos, a 100 °C, a una presión de 20 psi. Seguidamente los medios fueron servidos en recipientes estériles en la cámara de flujo laminar. Para micropropagación se sirvieron 5 ml de medio por tubo de ensayo de 250x20mm ó 50 ml por frasco de 120 mm de alto x 90 mm de diámetro. Para regeneración se sirvieron 20 ml por caja de petri 100x15 mm.

2.4 Micropropagación

Después de recibir los clones de CEFA se pretendió multiplicar el material en el medio de cultivo recomendado por ese centro, pero el material vegetal se desarrolló muy lentamente, presentando una apariencia de escasas raíces y lámina foliar delgada, lo cual proporcionaba un material poco tolerante a los procesos de regeneración (en el futuro transformación genética). Por lo tanto se probaron diferentes medios de cultivo para establecer una metodología de micropropagación que garantizara la obtención de material vegetal vigoroso, que al ser utilizado en los ensayos de regeneración mantenga su viabilidad.

2.4.1 Efectos del medio de cultivo y aireación: Este ensayo se realizó para observar la respuesta de los genotipos Sq y SqE en diferentes medios de propagación reportados en la literatura. Ensayos preliminares compararon la respuesta entre el medio utilizado en CORPOICA (CI) para micropropagación de lulo, el reportado por la Universidad de Florida (Hendrix *et al*, 1987) y el utilizado para tomate de árbol por Atkinson y Gardner (1993). En vista de los pobres resultados obtenidos con estos medios y con base en la amplia experiencia que se tiene en la Unidad de Biotecnología del CIAT en micropropagación de yuca (*Manihot esculenta*), se realizó una primera comparación involucrando el medio de yuca 4E (Roca, 1984) modificado, reduciendo las sales MS a la mitad de su concentración ($\frac{1}{2}$ MS, Cuadro 1) y adicionando un tapón de espuma (*Disposable Plugs Bouchons*, de apertura 28 to 35 mm) en la tapa del tubo de ensayo.

Adicionalmente, se evaluó el medio más utilizado para el mantenimiento de bancos de germoplasma de papa (Hussey y Stacey , 1981), denominado medio A (Cuadro 1). Se realizó una comparación entre el medio ½MS y el medio A, ambos con tapón de espumilla en la tapa.

Los nudos con yemas axilares se extrajeron de plantas previamente establecidas en cultivo *in vitro* en el medio de CEFA. Con un bisturí No. 11 y pinzas estériles las hojas fueron eliminadas y al tallo se le realizaron cortes diagonales, extrayendo trozos de 1.5 cm de largo que incluían una yema axilar (nudo). Posteriormente se colocaron en un tubo de ensayo 250 x 20 mm con 5 ml de medio.

Los tubos de ensayo fueron incubados en cámara de crecimiento, con una temperatura de 21.5 °C y con un fotoperíodo de 15 horas a $50\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, utilizando un diseño experimental completamente al azar, con un tamaño de muestra de 50 plantas por tratamiento. Las observaciones se realizaron durante 45 días y se evaluó el enraizamiento, determinado por el número y longitud de raíces, expansión de la lámina foliar (medida por el ancho promedio de la segunda y la tercera hoja de cada planta), altura de plantas y número de nudos. Los datos fueron analizados con la prueba paramétrica de varianza para las mediciones y la no paramétrica de Chi-cuadrado (χ^2) para conteos o frecuencias. Cuando en los análisis de varianza se encontró significancia del 5 %, se procedió a realizar la prueba de Ryan Einot Gabriel Welsch (Ryan , 1960; Einot and Gabriel, 1975; Welsch, 1977) para separación de medias de rango múltiple. Para realizar los análisis se utilizó el paquete estadístico de SAS (1989).

2.4.2 Ensayo de aireación en diferentes medios: Considerando la aireación como un factor importante en la micropropagación de lulo, se probó la efectividad de los medios CI y CEFA comparada con los medios A y 1/2MS, todas con espumilla en la tapa.

Los nudos de yemas axilares se extrajeron de acuerdo a lo descrito en el numeral 2.4.1 y se cultivaron a una temperatura de 21.5 °C y con un fotoperíodo de 15 horas a $50\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Cuadro 1. Medios de Micropropagación evaluados en lulo.

Compuestos	CI	CEFA	Hendrix	Atkinson	1/2MS	A
Sales MS (mg/L)						
MICROS	MS	MS	MS	MS	½ MS	MS
MACROS						
CoCl ₂ . 6H ₂ O 0.025						
CuSO ₄ . 5 H ₂ O 0.025						
FeNa EDTA 36.70						
H ₃ BO ₃ 6.20						
KI 0.83						
MnSO ₄ . 2H ₂ O 16.90						
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0.25						
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O 8.6						
Glycina (mg/L)	2	-	2	-	-	-
Tiamina HCL (mg/L)	1	0.4	1	10	1	0.5
myo-Inositol (mg/L)	100	100	100	100	100	-
Pantotenato de calcio (mg/L)	-	-	-	-	-	2.5
Pyridoxina HCL (mg/L)	0.5	-	0.5	1	-	1
Acido Nicotínico (mg/L)	0.5	-	0.5	1	-	5
Azúcar (g/L)	30	30	30	30	20	30
Agar (g/L)	6	-	7	8	4.5	-
Gel Rite (g/L)	-	2	-	-	-	3.5
.pH	5.7	5.7	5.7	6.2	5.7	5.9
ANA (mg/L)	-	-	0.02	0.1	0.02	-
BAP (mg/L)	-	0.5	0.02	1	0.04	-
GA ₃ (mg/L)	-	-	-	-	0.05	-

Hendrix: Hendrix *et al*,1987.**Atkinson:** Atkinson *et al*, 1993.**(1) Vitaminas B5:** Gamborg, 1978.**1/2MS :** 4E (Roca, 1984) modificado.**A:** Hussey y Stacey, 1984.**CEFA:** Centro Frutícola Andino(*com. pers.*).**CI:** CORPOICA (*com. pers.*)

El ensayo se organizó con un diseño experimental completamente al azar y un tamaño de muestra de 20 plantas por tratamiento. Las observaciones se realizaron durante 60 días, de acuerdo a una escala preestablecida en la cual se caracterizó las plántulas según el número de hojas expandidas, ancho de hoja promedio, altura y número de raíces (Figura 1). Los análisis se realizaron con la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado (X^2), utilizando el paquete estadístico de SAS (1989).

2.4.3 Efecto de la posición de la yema: Una vez seleccionado el mejor medio de micropropagación, se realizó un ensayo para evaluar el potencial de micropropagación de las yemas respecto a su posición en la planta cultivada *in vitro*. Para facilitar el seguimiento del ensayo se realizó una numeración descendiente de las yemas (Figura 2) en donde la yema No.1 correspondía al ápice de la planta. Treinta plantas mantenidas *in vitro* fueron micropropagadas de acuerdo al procedimiento antes descrito en la sección 2.4.1. Se evaluó el tiempo para emergencia de las raíces y para el desarrollo las de hojas. La formación de callo se calificó como una característica indeseable.

2.5 Regeneración de plantas

Se evaluaron dos vías de regeneración; la embriogenesis somática y la organogénesis. Debido a los escasos estudios reportados de regeneración de lulo, los ensayos se establecieron basados en protocolos descritos para otras especies pertenecientes a la familia *Solanaceae*.

2.5.1 Embriogenesis somática

La ausencia de reportes de embriogenesis somática en lulo condujo a establecer estos ensayos con base al protocolo de Guimaraes y colaboradores (1988), quienes reportaron embriogénesis somática en tomate de árbol (*Cyphomandra betaceum*, solanacea). Se evaluó la capacidad de generar embriones somáticos en lulo a partir de hojas cotiledonares, con el medio basal MS suplementado con 2% de sacarosa, pH 5.6, 0.8% de agar (Guimaraes *et al.* 1988) y enriquecido con diferentes concentraciones de 2,4-D (0.5, 1, 3 y 9 mg/L) y caseína hidrolizada (200 mg/L). Los explantes se extrajeron de la de la colección SqEG (semillas pregerminadas *in vitro*).



CARACTERISTICA	ESCALA				
	1	2	3	4	5
No. de Hojas	2	3	4	5	>5
Ancho Hoja promedio (cm)	0.3-0.5	0.5-1.5	1.5-2.5	2.5-3.5	3.5-4.5
Altura (cm)	1-1.5	1.5-2.5	2.5-3.5	3.5-5.5	5.5-7.0
No. de Raíces	0	1-2	3	4	>4

Figura 1. Escala establecida para comparar la respuesta de los medios CI, CEFA, 1/2MS y A, con tapon e espumila en la tapa (condiciones de aireación).

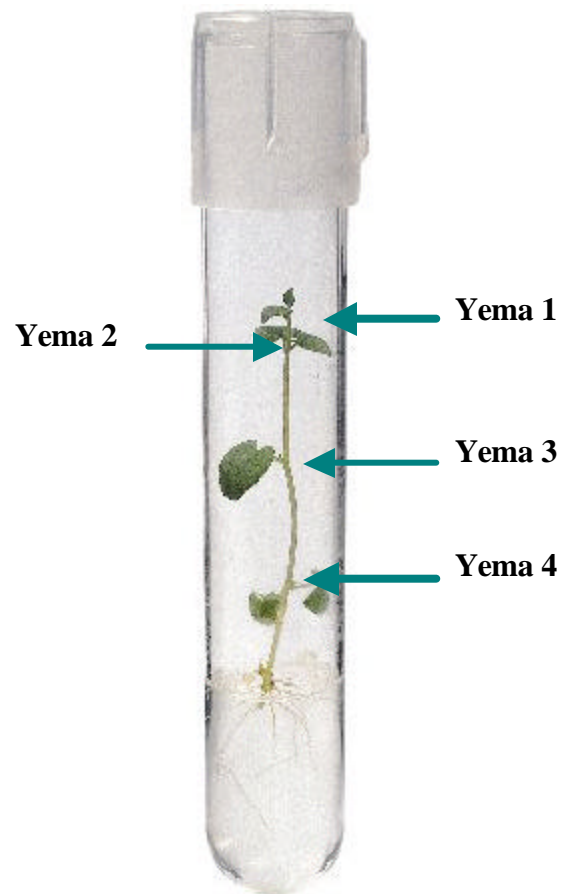


Figura 2. Identificación de yemas de acuerdo a su posición en la planta

Las hojas cotiledonares se cortaron 12 días después de la germinación, de acuerdo a lo descrito por Guimaraes, con la ayuda de pinzas quirúrgicas y un bisturí No. 11 estériles. Estas fueron colocadas en papel filtro estéril y humedecido con agua para evitar la deshidratación. Se eliminaron los bordes superior e inferior (ápice y peciolo) y fueron sembrados de manera que el haz mantuviera contacto con el medio de cultivo. Estos se mantuvieron en oscuridad durante 30 días y a 21.5°C de temperatura.

2.5.2 Organogénesis

2.5.2.1 Efecto del Origen de los Explantes en Organogénesis de lulo: El lulo por ser una planta alógama presenta una alta variabilidad entre plantas propagadas por semilla, es decir, que de un mismo fruto se puede obtener plantas genéticamente diferentes (Quiroga y Doering , 1982). Esta variación genética constituye una variable adicional, que dificulta la estandarización de protocolos de regeneración y transformación. Para estos ensayos se requiere trabajar con plantas propagadas vegetativamente (clones), y así homogeneizar la procedencia genética. Por este motivo, si bien inicialmente se utilizaron plantas provenientes de semilla sexual, los ensayos posteriores se realizaron solamente utilizando clones de las colecciones Sq y SqE.

2.5.2.2 Efecto de medios de organogénesis en lulo: Se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo sobre la capacidad organogénica de lulo en los genotipos Sq y SqE (Cuadro 2) . Los ensayos preliminares comprendieron tres tratamientos; el medio **H** reportado para organogénesis de lulo (Hendrix *et al* , 1987) desarrollado en la Universidad de Florida (USA), en el laboratorio de el Dr. Richard Litz; el medio **U1** reportado por Ultzen (1993) para organogénesis de tomate (*Lycopersicum esculentum*); el medio **AG** utilizado para organogénesis de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) por Atkinson y Gardner (1993). Con base en los resultados obtenidos, se decidió evaluar variantes de los medios U1 y H. El medio U1 fue suplementado con caseína hidrolizada (200 mg/L) y la hormona AIA fue reemplazado por ANA 0.1 ó 1 mg/L, la Zeatina

Cuadro 2. Medios de regeneración evaluados en lulo.

Compuestos				H	HM	AG	U1	U2		
Sales MS (mg/L)				MS	MS	MS	MS	MS		
MICROS		MACROS								
CoCl2. 6H2O	0.025	CaCl2	332.02							
CuSO4. 5 H2O	0.025	KH2PO4	170							
FeNa EDTA	36.70	KNO3	1900							
H3BO3	6.20	MgSO4	180.54							
KI	0.83	NH4NO3	1650							
MnSO4. 2H2O	16.90									
Na2MoO4.2H2O	0.25									
ZnSO4. 7 H2O	8.6									
Glycina (mg/L)				2	2	-	-	-		
Tiamina HCL (mg/L)				1	1	10	10	10		
myo-Inositol (mg/L)				100	100	100	100	100		
Pyridoxina HCL (mg/L)				0.5	0.5	1	1	1		
Acido Nicotínico (mg/L)				0.5	0.5	1	1	1		
Azúcar (g/L)				30	30	30	10	20		
Glucosa (g/L)				-	-	-	10	-		
Agar (g/L)				7	-	8	3	3		
Gel Rite (g/L)				-	2	-	1	1		
Caseina Hidrolizada (mg/L)				-	-	-	-	200		
.pH				5.7	5.7	6.2	5.7	5.7		
ANA (mg/L)				-	-	0.01	-	0.1	1	
BAP (mg/L)				-	2	1	-	0.3	1	3
KIN (mg/L)				5	-	-	-	-		
AIA (mg/L)				0.01	-	-	0.02	-		
Zeatina (mg/L)				-	-	-	2	-		

H: Hendrix *et al*,1987.**HM:** Hendrix modificado por Litz.**U2:** Ultzen modificado.**AG:** Atkinson y Gardner, 1993.**U1:** Ultzen *et al* 1993.

fue reemplazada por BAP 0.3, 1 y 3 mg/L respectivamente, (medio **U2**). El medio H fue modificado por sugerencia del Dr. Richard Litz (comunicación personal) cambiando la KIN por BAP (2 mg/L) y el agar por Gel Rite (2 g/L), este medio fue denominado **HM** (Cuadro2).

Los explantes fueron incubados a una temperatura de 21.5 °C y con dos días de oscuridad, seguidos de 35 días de luz con fotoperíodo de 15 horas a $50\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, con excepción del tratamiento con el medio H, donde los explantes fueron incubados directamente en la luz, como lo describe Hendrix.

2.5.2.3 Efecto del explante en la organogénesis de lulo: Se comparó la respuesta organogénica entre láminas foliares y pecíolos. El único protocolo reportado a la fecha para organogénesis de lulo (Hendrix *et al*, 1987) utiliza el cultivo de lámina foliar. Considerando la mayor respuesta organogénica de pecíolos reportada por algunos autores en solanáceas, como tabaco (Cassells *et al*, 1982) y papa (Lentini *et al*, 1990), y en otras especies como uva (Colby *et al*. 1991) y papaya (Yang *et al*.1996), surgió la inquietud de probar pecíolos como explante para la regeneración. La lámina foliar de la primera hoja expandida, fue cortada con un bisturí No. 11 y pinzas estériles, en segmentos de 0.25 ó 1 cm^2 , conservando la nervadura central y separando el pecíolo de la hoja, ambos explantes fueron cultivados con el haz en contacto con el medio.

2.5.2.4 Efecto del Pretratamiento del explante en la Organogénesis de lulo: Debido a que el tejido de lulo posee una alta densidad de tricomas y con el objeto de incrementar contacto con el medio de cultivo, el explante se sonicó para producir pequeñas heridas en el tejido antes de su cultivo. El pretratamiento consistió en incubar las hojas durante 30 minutos en 50 ml de medio MS líquido contenido en un frasco de compota y enriquecido con Zeatina o BAP, según el medio de regeneración a utilizar (sección 2.5.2.2., Cuadro 2). El frasco se colocó bajo el sonicador (modelo 450, 50 Hz, Branson Ultrasonic Corporation; Figura 3) en la cámara de flujo laminar y se sonicó durante 1 minuto con una intensidad de 60 voltios. Al terminar el sonicado se aplicó vacío durante 15 minutos. Posteriormente los explantes se sacaron del medio líquido y se colocaron en un papel filtro estéril para absorber el exceso de humedad.

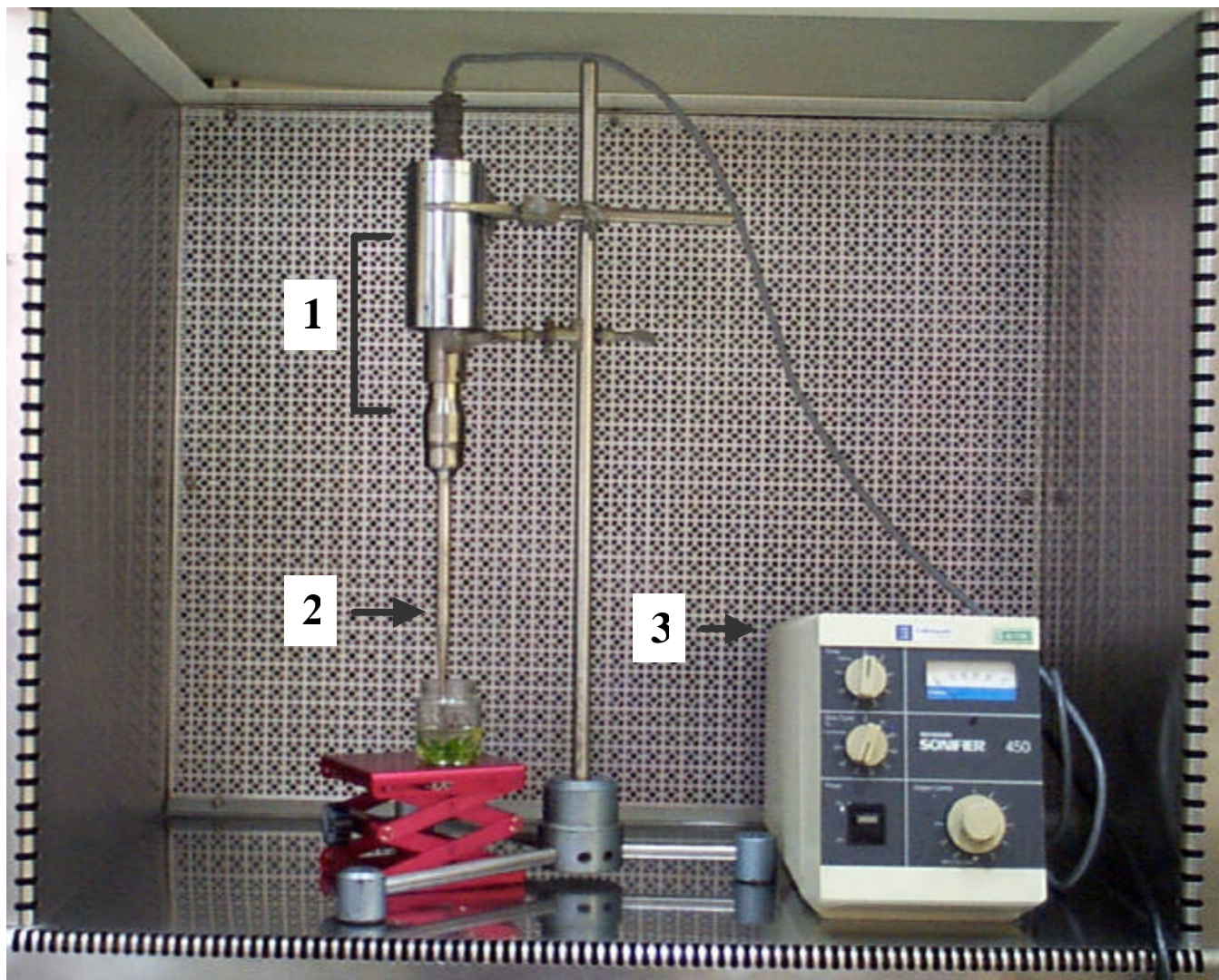


Figura 2. Sonicador (Branson 450) en cámara de flujo laminar.(1) Condensador-Resonador, (2) Punta y (3) Fuente

Posteriormente se separaron los pecíolos de la lámina foliar y se cultivaron de acuerdo a los procedimientos descritos en 2.5.2.3.

2.5.2.5 Efecto del medio de Micropropagación en la regeneración: Este ensayo se realizó con las mejores variables obtenidas del análisis 2.5.2.4, con el objetivo de evaluar si la respuesta organogénica es afectada por el medio de micropropagación utilizado en el mantenimiento de las plantas donantes. Para ello se multiplicaron 75 plantas en medio A y 1/2MS en diferentes tiempos de incubación (15 días para medio A y 30 días para 1/2MS), para coincidir con el estado de desarrollo de las plantas, ya que en el medio A las plantas mostraron un desarrollo equivalente al del medio 1/2MS, más temprano. La lámina foliar de la primera hoja expandida, fue separada de la planta con un bisturí No. 11 y pinzas estériles, posteriormente se le realizó el pretratamiento (numeral 2.5.2.4), se eliminó la lámina foliar y el peciolo fue cultivado en medio U1 (numeral 2.5.2.2) a una temperatura de 21.5 °C y con dos días de oscuridad, seguidos de 35 días de luz con fotoperíodo de 15 horas a $50\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

2.5.2.6 Diseño experimental y Análisis Estadístico

Los ensayos de regeneración se realizaron en dos etapas: En la primera etapa se efectuaron ensayos preliminares para determinar el potencial de regeneración de lulo mediante embriogénesis somática y organogénesis. Estos ensayos se organizaron con 2 repeticiones en forma de 2 bloques completos al azar, de estructura factorial, con cinco unidades experimentales por cada bloque, cada unidad constituida por una caja de petri con 4 láminas foliares y 4 pecíolos, para evaluar organogénesis (Sección 2.5.2.2) y 5 hojas cotiledonares por caja de petri para evaluar embriogénesis (Sección 2.5.1). Se cuantificó el número de embriones o brotes producidos por explante en un período de 55 días.

En la segunda etapa, una vez identificada la mayor capacidad de regeneración por organogénesis, se realizaron experimentos para seleccionar el mejor medio de cultivo y comprobar la efectividad del pretratamiento a los explantes. Se evaluaron tres

tratamientos que consistieron en comparar el medio H sin pretratamiento (testigo), con los medios HM y U1 con pretratamiento. El ensayo se dispuso en 4 repeticiones con forma de bloques completos al azar de estructura factorial y cinco unidades experimentales, cada una constituida de 4 láminas foliares y 4 pecíolos por caja de petri. Se evaluaron el número de días en regeneración y número de brotes por explante, en un período de 55 días.

Los datos fueron analizados con la prueba paramétrica de varianza y la no paramétrica de Chi-cuadrado (X^2), según el caso. Conteos o frecuencias se realizaron con un enfoque no paramétrico y las mediciones de tiempo con el enfoque paramétrico. Adicionalmente se realizó una asociación general de respuesta, según la prueba estadística Cochran Mantel Haenszel (1959).

El ensayo 2.5.2.5, se dispuso en 3 repeticiones con forma de bloques completos al azar de estructura factorial y cinco unidades experimentales, cada una constituida por 5 pecíolos por caja de petri, evaluando el número de explantes que regeneran. Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado (X^2). Todos los análisis estadístico se realizaron utilizando el paquete estadístico de SAS (1989).

2.6 Fase de Invernadero

Veinte plantas regeneradas y veinte clones originales (testigo) mantenidos *in vitro* durante 45 días fueron llevadas al invernadero con una temperatura de 21 °C y 78% de humedad relativa. Las plantas fueron sacadas del tubo de ensayo y lavadas cuidadosamente para eliminar los residuos de agar en la raíz. Se plantó una planta por pote de 8 pulgadas que contenía una combinación de suelo: arena (3:1) previamente esterilizado a 80 °C durante 2 horas. Para facilitar la adaptación de las plantas al invernadero, se cubrieron con vasos de poliuretano con perforaciones que facilitaban el intercambio gaseoso, ocho días después la cubierta fue retirada. Desde el momento del trasplante se fertilizó con urea 5 g/L, plantex 5 g/L y Coljap desarrollo 5 g/L, aplicados en forma intercalada cada semana. El desarrollo de la planta en invernadero fue seguido

durante 45 días comparando el desarrollo de los clones originales con las plantas regeneradas, registrando altura, número y forma de hojas, teniendo en cuenta posibles cambios en la morfología de la planta.

2.7 Fase de Campo

Después de 45 días en invernadero, veinte plantas regeneradas por organogénesis y veinte clones originales (testigos) fueron llevados a campo con el objeto de comparar su desarrollo y fructificación. En un terreno de 120 m² fueron transplantadas guardando una separación de 2 m² entre planta. Un mes después del transplante cada una fue abonada con super fosfato triple (20g/L) y urea (20g) y Sulfato de potasio (20g) colocados en el suelo a 20 cm del tallo con una frecuencia de aplicación cada treinta días. En la fase de floración se aplicó borax (5g/20L) para favorecer el llenado de fruto. Las plagas y enfermedades fueron controladas con aplicaciones ocasionales de elosal (4ml/L), confidor (3mg/L), lorsban (1ml/l) y vertimec (3 ml/L). El control de malezas fue moderado pues el lulo es muy susceptible en suelo descubierto, por lo tanto se limpió la zona de aporte para cada planta y el resto del terreno se dejó cubrir de malezas. Se realizaron mediciones de altura y número de hojas cada 8 días, así como tiempo de floración y llenado de fruto.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Efecto del Medio de Cultivo y la Aireación en la Micropropagación

Las plantas de los dos genotipos SqE y Sq, donadas por CEFA, fueron subcultivadas en el medio y las condiciones recomendados por ellos, que incluía el sellado de los tubos con tapas plásticas. Después de 30 días de subcultivo se observó una apariencia general frágil en la planta, tallos elongados y flexibles, lenta emisión de raíz y de lámina foliar poco desarrollada, características no recomendables en un explante que va a ser sometido a diferentes ensayos de regeneración, ya que tiende a perder su viabilidad durante el proceso. Tratando de mejorar estas condiciones se probó el medio CI, igualmente con tapa plástica, pero la respuesta de las plantas no varió, por lo tanto se acudió a los medios reportados en la literatura para lulo (Hendrix) y tomate de árbol (Atkinson), con los cuales no se obtuvo mejor respuesta.

Analizando las características que presentaban las plantas, tales como apariencia frágil, poca expansión de la lámina foliar, tallos elongados y pocos nudos, se encontró similitud con los efectos típicos causados por el etileno en el cultivo *in vitro* de algunas especies.

Adicionalmente, se observó que la poca emisión de raíces podría afectar el desarrollo general de la planta, por lo que se trató de promover el enraizamiento con el uso de la mitad de las sales MS, tomando como base reportes de micropropagación en especies forestales (Monn, 1987; Kelvska, 1995; Susanto, 1995).

Considerando estos factores, se exploró como una alternativa de micropropagación de lulo, la adición de una espumilla en la tapa para facilitar el intercambio gaseoso del

explante y el uso de un medio de cultivo con la mitad de las sales MS. La respuesta de los dos clones a este tratamiento fue evaluada y comparada con la respuesta a los protocolos reportados para lulo y tomate de árbol.

Cuarenta y cinco días después de iniciado el ensayo, se observaron plantas completas en todos los tratamientos. Las plantas que se cultivaron según los protocolos descritos por Hendrix y Atkinson, mostraron un desarrollo débil, lámina foliar delgada, hojas cloróticas y bajo número de raíces. En contraste las plantas fueron vigorosas, con lámina foliar ancha, hojas color verde intenso y gran número de raíces cuando se cultivaron en el medio $\frac{1}{2}$ MS con tapón de espuma en la tapa (Figura 4).

El medio $\frac{1}{2}$ MS con espuma en la tapa mostró raíces más numerosas y dos veces más largas que las presentadas en los medios Hendrix y Atkinson (Cuadro 3 y 4), de la misma forma, al comparar el ancho de hoja de plantas cultivadas en los mismos medios, se presentaron hojas con el doble de ancho en $\frac{1}{2}$ MS comparadas con las hojas de las plantas subcultivadas en los otros medios (Cuadro 3). En cuanto a la altura se encontraron plantas más pequeñas y con mayor número de nudos en el medio $\frac{1}{2}$ MS con espuma, diferente a Atkinson y Hendrix, donde se produjeron plantas más largas, con menor número de nudos, por lo tanto mayor distancia internodal (Cuadro 3).

No se observaron diferencias significativas entre los genotipos, en las variables ancho de hoja, número de nudos y número y longitud de raíz. Las plantas del genotipo Sq fueron un poco más altas que el genotipo SqE en los tratamientos (Cuadro 3), aunque la diferencia no fue muy grande.

Los resultados indican que el tratamiento $\frac{1}{2}$ MS con espuma en la tapa permite un desarrollo de plantas más vigorosas en la micropropagación de lulo. Sin embargo, después de doce subcultivos (aproximadamente uno cada mes), se presentó una decoloración blanquecina en las hojas de las plántulas mantenidas en el medio $\frac{1}{2}$ MS (Figura 5), efecto que se mantuvo durante el subcultivo *in vitro*, pero que desapareció cuando las plantas fueron cultivadas en suelo. Esta observación eliminó la posibilidad de



Figura 4. Plantas in vitro de lulo micropropagadas en $\frac{1}{2}$ MS, Atkinson (AT) y Hendrix (H).

Cuadro 3. Efecto en el promedio de longitud de raíz, ancho de hoja, altura y número de nudos de los genotipos SqE y Sq con los protocolos; Hendrix, Atkinson y 1/2 MS, a los 45 días después del subcultivo.

	Genotipo	Sin Espumilla		Con Espumilla
		Hendrix	Atkinson	1/2 MS
Longitud de Raíz (cm)	SqE	5.6 b (0.18)	5.8 b (0.19)	11.2 d (0.23)
	Sq	5.5 b (0.15)	5.2 b (0.07)	11.2 d (0.23)
	Promedio ⁽¹⁾	5.6 b (0.11)	5.5 b (0.10)	11.2 d (0.16)
Ancho hoja (cm)	SqE	1.7 c (0.05)	1.7 c (0.06)	3.8 d (0.06)
	Sq	1.6 c (0.06)	1.5 c (0.06)	4.0 d (0.06)
	Promedio ⁽¹⁾	1.6 c (0.04)	1.6 c (0.04)	4.0 d (0.04)
Altura (cm) ⁽¹⁾	SqE	11 b (0.22)	11 b (0.22)	7 c (0.18)
	Sq	12 a (0.15)	13 a (0.25)	8 c (0.19)
	Promedio ⁽¹⁾	12 b (0.18)	12 b (0.15)	7.5 c (0.13)
Número de nudos ⁽¹⁾	SqE	6 c (0.23)	6 c (0.22)	10 b (0.22)
	Sq	6 c (0.24)	6 c (0.24)	11 a (0.21)
	Promedio ⁽¹⁾	6 c (0.16)	6 c (0.16)	10 b (0.16)

Los valores representan los promedios de 2 repeticiones con 50 plantas de cada genotipo por protocolo, error estándar entre paréntesis.

(1) Promedios en los diferentes niveles del mismo factor, seguidos por letra diferente indican diferencia significativa según la prueba Ryan Einot Gabriel Welsch, con una probabilidad $p=0.05$.

Cuadro 4. Número total de plantas de acuerdo al número de raíces producidas por planta en los genotipos SqE y Sq en tres medios de propagación, a los 45 días después del subcultivo.

No. de Raíces	Hendrix	Atkinson	MS 1/2
2	33	41	0
3	60	50	0
4	7	9	0
>4	0	0	100
Total	100	100	100

Los valores representan la frecuencia obtenida en 2 repeticiones con 50 plantas de cada genotipo por tratamiento.

Datos significativamente diferentes según la prueba de Chi-cuadrado ($X^2 = 303.06$; $p = 0.001$; $gl = 6$).

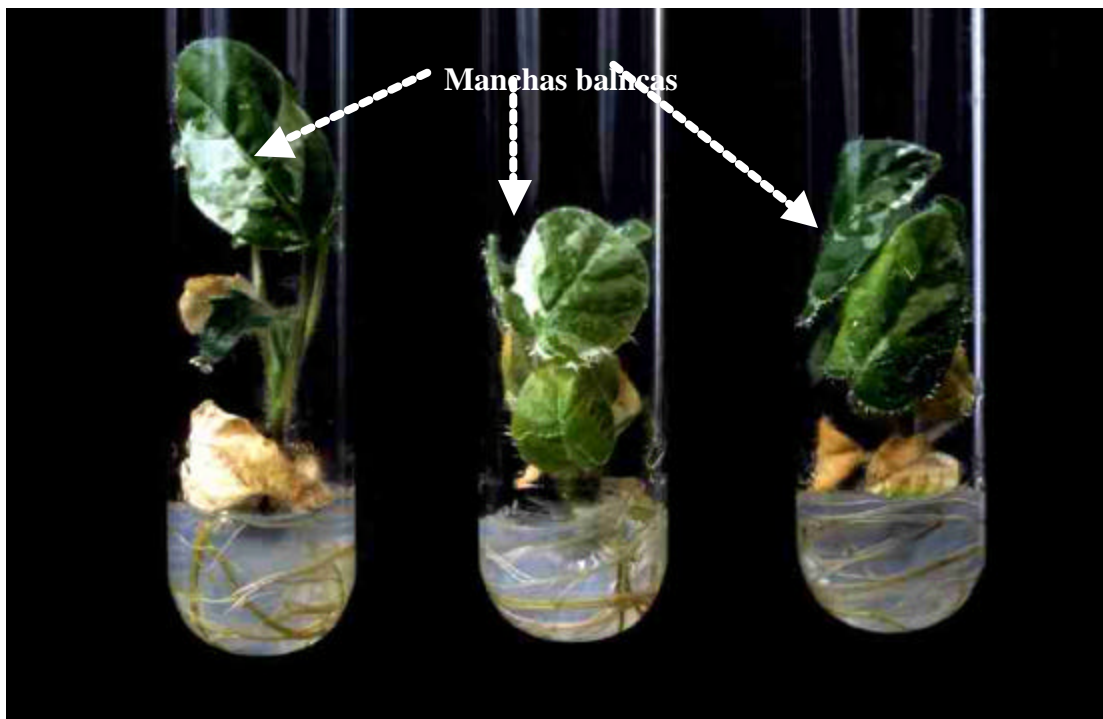


Figura 5. Decoloración blanquecina en las hojas de lulo después de 12 subcultivos (aproximadamente cada mes) en medio 1/2MS.

que se tratase de una variegación genética y sugirió que probablemente las plantas sufrieron un deterioro fisiológico por la exposición prolongada a reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo ½ MS (Cuadro 1). Por esta razón se buscó ensayar otro medio sin reguladores de crecimiento.

Se evaluó como alternativa el medio A (Cuadro 1), teniendo en cuenta la ausencia de hormonas en sus componentes y por que es utilizado para el mantenimiento *in vitro* a largo plazo del germoplasma de papa (*Solanum melogena*).

Se realizó una comparación de la respuesta de los dos genotipos a los medios A y ½ MS, ambos con espumilla en la tapa. Las plantas cultivadas en medio A mostraron un desarrollo radicular más temprano y profuso respecto a las del medio ½ MS (Figura 6A). Este desarrollo temprano también fue observado en una mayor expansión de las hojas y altura de las plantas a las tres primeras semanas de subcultivo (Figura 6B). Sin embargo estas diferencias tienden a desaparecer a los 60 días, cuando no se observaron diferencias significativas en ancho de hoja, altura y número de nudos (Cuadro 5). En los dos medios las plantas presentaron más de 4 raíces, aunque a los 60 días las plantas en el medio ½ MS presentaron raíces más largas, esta característica no influyó en el desarrollo de las plantas.

Los resultados indican que el medio A con espumilla en la tapa es más eficiente en la producción de material vegetal vigoroso, de lámina foliar ancha, color verde intenso y gran número de raíces, además de que no se presenta la decoloración en las hojas después de numerosos subcultivos.

La aparente ventaja de una emisión de raíces más largas al usar 1/2MS no afectó el desarrollo de las plantas al obtener resultados equivalente con el medio A, que contiene sales MS completas. Aunque algunos autores consideran favorable el uso de la mitad de las sales MS en forestales como *Quercus bicolor* (Monn, 1987), *Picea omonica* (Kelvska, 1995) y en algunos *citrus* (Susanto, 1995), por considerarlas susceptibles al contenido total de MS, en lulo, aparentemente este no es un factor importante.

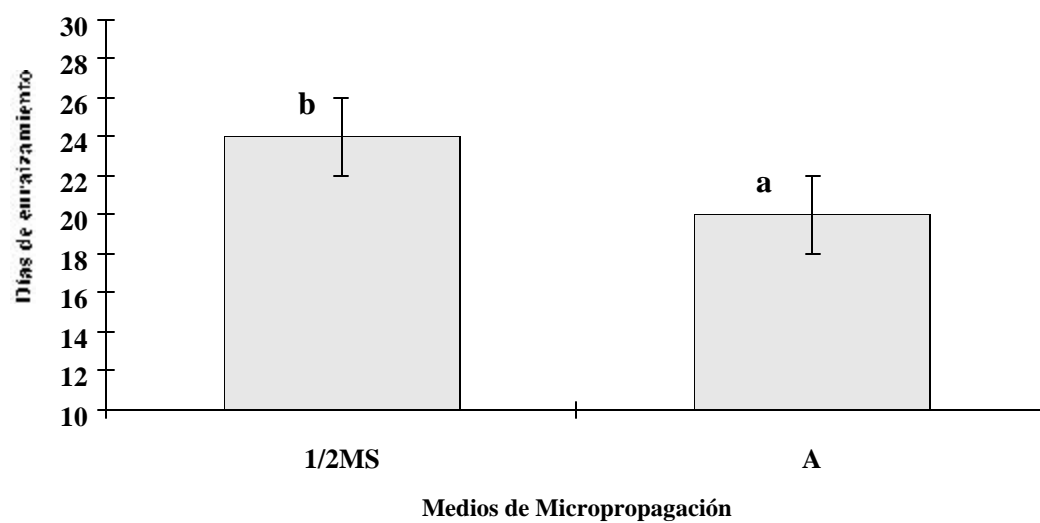
A**B** $\frac{1}{2}$ MS**A**

Figura 6. (A) Días a enraizamiento de lulo en medios de propagación 1/2MS y A, a treinta días de sembrado en el medio de cultivo. Valores seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes (prob.=0.012); (B) Registro fotográfico.

Cuadro 5. Altura, ancho de la hoja y número de nudos de los genotipos SqE y Sq en los medios A y 1/2 MS, a los 60 días de cultivo.

	Genotipo	Espumilla	
		A	1/2 MS
Altura (cm)	SqE	7 b (0.14)	6 b (0.16)
	Sq	7 a (0.20)	7 a (0.18)
Número de nudos	SqE	9 c (0.16)	8 c (0.22)
	Sq	9 d (0.23)	10 d (0.22)
Ancho de hoja (cm)	SqE	3.6 e (0.05)	3.6 e (0.08)
	Sq	3.5 f (0.01)	3.7 f (0.08)
Largo Raíz (cm)	SqE	7 g (0.23)	11 h (0.23)
	Sq	7 g (0.23)	11 h (0.23)

Los valores representan los promedios de 2 repeticiones con 50 plantas de cada genotipo por protocolo, error estándar entre paréntesis.

⁽¹⁾ Promedios en los diferentes niveles del mismo factor, seguidos por letra diferente indican diferencia significativa según la prueba Ryan Einot Gabriel Welsch, con una probabilidad $p=0.05$.

La desaparición del efecto de decoloración en las hojas con el uso del medio A, indica que el componente hormonal del medio ½ MS afecta el material vegetal cuando es utilizado por largos períodos, lo cual se debe tener en cuenta, pues al parecer el lulo es muy sensible al estímulo hormonal.

Todas las plantas vigorosas se obtuvieron con el uso de la espumilla en la tapa, al parecer este efecto positivo está directamente relacionado con el contenido de etileno en el cultivo *in vitro*, ya que las características observadas en plantas sin aireación, tales como plantas elongadas, pocos nudos gran distancia internodal y lamina foliar delgada, son propias del efecto causado por el etileno, efecto que desaparece al favorecer el intercambio gaseoso con la espumilla en la tapa, obteniendo plantas de lámina foliar ancha, menos altura y mayor número de nudos, con menor distancia internodal.

Al comparar plántulas de lulo cultivada sin aireación con registros fotográficos de *Brasica campestris* cultivadas bajo el efecto de etileno (Lentini *et al.*, 1990), se encuentran semejanzas en los tallos elongados con entrenudos distantes y lámina foliar pequeña.

El etileno es producido por todo tipo de tejidos, incluyendo callos, suspensiones y brotes. Los efectos fisiológicos varían de acuerdo a la concentración del gas, produciendo efectos deseables e indeseables. Su efecto sobre la expansión de la lámina foliar y la presencia de tallos elongados ha sido reportado en diferentes especies (Abeles, 1985, citado por Lentini. *et al.* 1990), incluyendo frutales como papaya (*Carica papaya*; Lai-ChuoChun. *et al.*, 1998), sandía (Thomas *et al.*, 2000) y chirimolla (*Anona squamosa*; Zobayed *et al.*, 2002). En *Kalanchoe blosfeldium* se presentaron menos nudos por planta cuando se cultivó en recipiente cerrados (Horn *et al.*, 1988).

No es muy clara la acción del etileno sobre el enraizamiento de plántulas, ya que ha sido reportado como promotor y como inhibidor dependiendo de la especie (Fabijam, 1981), pero según las observaciones registradas, los tratamientos sin espumilla en la tapa

presentaron escasa raíz, lo cual implica un posible efecto negativo sobre el proceso de enraizamiento.

Hasta el momento, otros autores no habían considerado el intercambio gaseoso en la micropropagación de lulo. Pero estas observaciones sugieren la importancia de profundizar en los efectos del etileno, para lo cual se puede medir la cantidad del gas en recipientes con y sin aireación, utilizar inhibidores de etileno y observar el comportamiento del desarrollo de la planta o inyectar el gas a concentraciones determinadas en recipientes hermético y medir sus consecuencias en las plántulas, de esta manera se podrían realizar conclusiones más certeras del efecto del etileno en el cultivo *in vitro* de lulo.

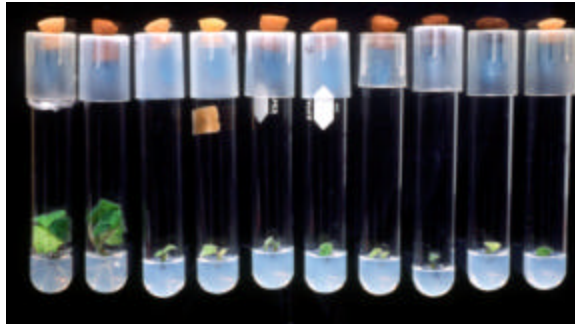
3.2 Ensayo de aireación en diferentes medios

Considerando los beneficios de la aireación en la micropropagación de lulo, se decidió comparar la efectividad de los medios CI y CEFA (normalmente utilizados por otros laboratorios en Colombia para micropropagación de lulo) con espumilla en la tapa. Esta respuesta fue comparada con los medios A y 1/2MS con aireación, los cuales generaron plantas vigorosas en el ensayo anterior.

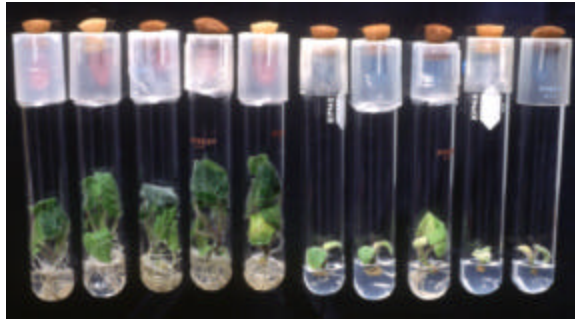
Las observaciones se realizaron según una escala establecida, de 1 a 5, caracterizando la planta según el número de hojas, el ancho promedio de las hojas, la altura y el número de nudos, siendo uno la planta menos desarrollada y cinco la que alcanzó mayor desarrollo. Para simplificar el análisis, se agrupó los grados 3, 4 y 5 (que representan plantas desarrolladas) y fueron comparados con los grados 1 y 2, que representan explantes sin desarrollar y plantas comenzando su fase de desarrollo, respectivamente.

En todos los tratamientos se observaron plantas completas, pero el número de plantas vigorosas obtenidas varió dependiendo del medio de cultivo (Figura 7), los análisis estadísticos respaldaron esta observación ($X^2 = 27.1$; prob= 0.007; gl= 12), indicando que el desarrollo de las plantas depende del medio utilizado (Figura 8). En el medio CI la

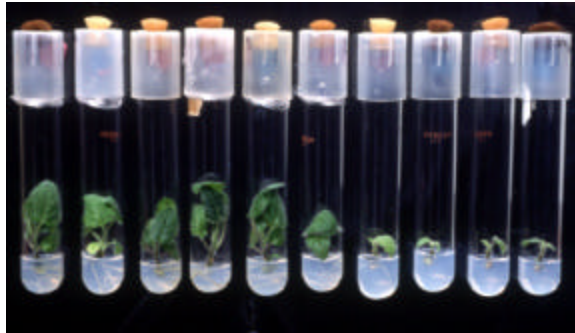
CI



CEFA



$\frac{1}{2}$ MS



A

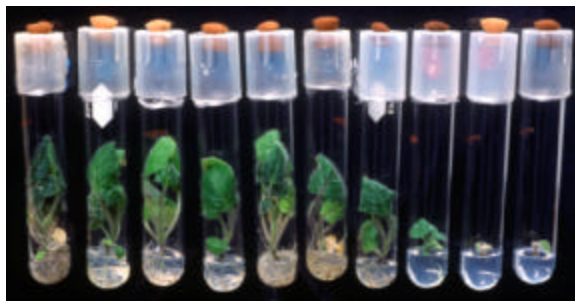


Figura 7. Efecto de la aireación en el medio CI, CEFA, 1/2MS y A

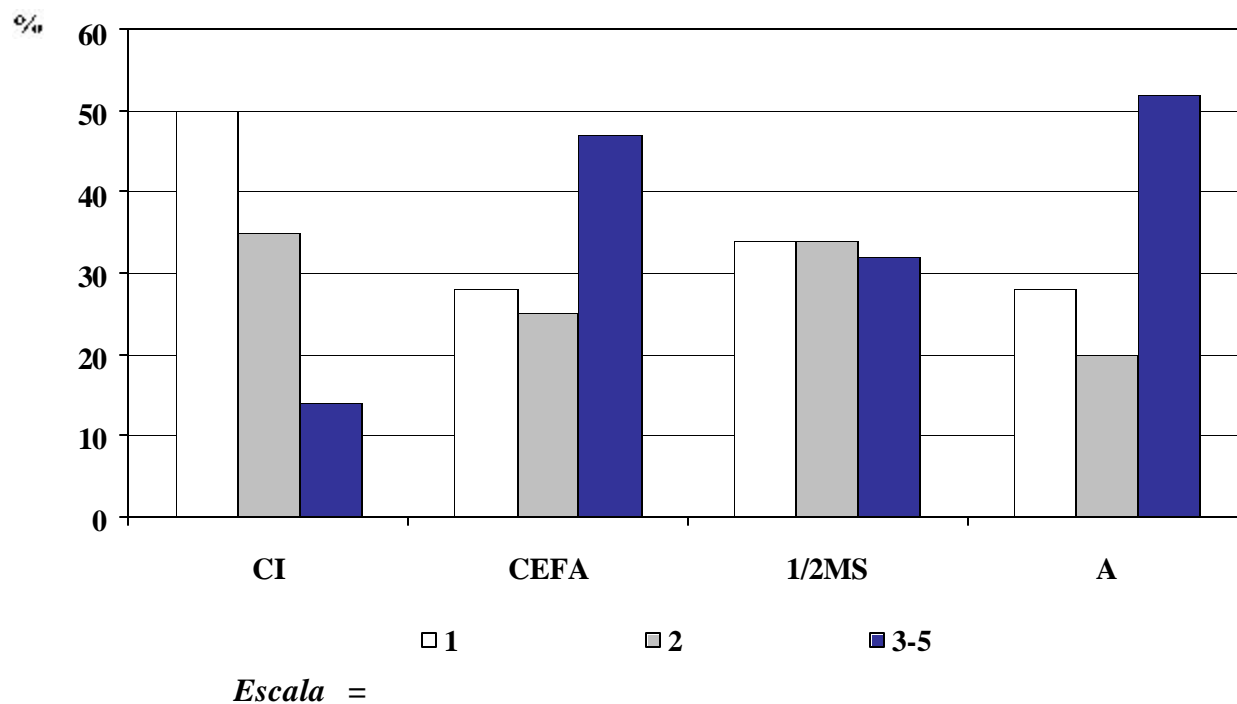


Figura 8. Comparación del estado de desarrollo de plántulas de lulo subcultivadas en los medios CEFA, CI, 1/2MS y A bajo condiciones de aireación (con espumilla en la tapa), a los 60 días después del subcultivo.

mitad de las plantas presentó un desarrollo de grado 1, un 35 % de grado 2 y apenas un 14 % de plantas alcanzaron los grados 3–5. En contraste, los medios CEFA y ½ MS mostraron del 25% al 28 % y 35 % de las plantas con un grado de desarrollo 1 y 2, respectivamente, y aproximadamente de un 30% al 50% plantas en un desarrollo de 3-5. El mejor desarrollo se obtuvo en el medio A, donde más del 50% de las plantas mostraron un desarrollo grado 3-5, siendo el medio que produjo el mayor porcentaje de plantas desarrolladas (Grado 5).

En términos generales se presentó un retraso en el desarrollo de las plantas en todos los medios ensayados (Figura 9). La respuesta más temprana se registró en el medio A, el cual ha sido considerado como el de mejor respuesta, produciendo plantas desarrolladas de grado 3-5 después de 35 días del subcultivo, lo cual contrasta con las primeras observaciones registradas en el numeral 3.1, en donde se presentaban plantas desarrolladas 15 días después del subcultivo. En los otros medios se observaron plantas grado 3-5 a los 45 días en el medio CEFA, 54 días en el medio 1/2MS y tomó casi dos meses en el CI.

Estos resultados sugieren que las plantas de la colección *in vitro* han sufrido un proceso de deterioro, probablemente ocasionado por continuos subcultivos realizados para su mantenimiento. Otros investigadores no recomiendan realizar más de 12 subcultivos *in vitro*, por lo que se hace necesario renovar constantemente la colección con materiales de campo o invernadero.

En este experimento las plantas en el medio CEFA mostraron un desarrollo significativamente mayor que el presentado al utilizar éste medio sin espumilla en la tapa (sección 3.1), adicionalmente, llama la atención que las plantas en el medio CEFA mostraron un desarrollo levemente mejor respecto al medio ½ MS, mientras un 10% de las plantas en medio CEFA se desarrollaron en grado 5, ninguna planta en medio ½ MS alcanzó éste nivel de desarrollo hasta los 60 días, lo cual contrasta con las primeras observaciones obtenidas en la sección 3.1, que indicaron al medio 1/2MS como muy

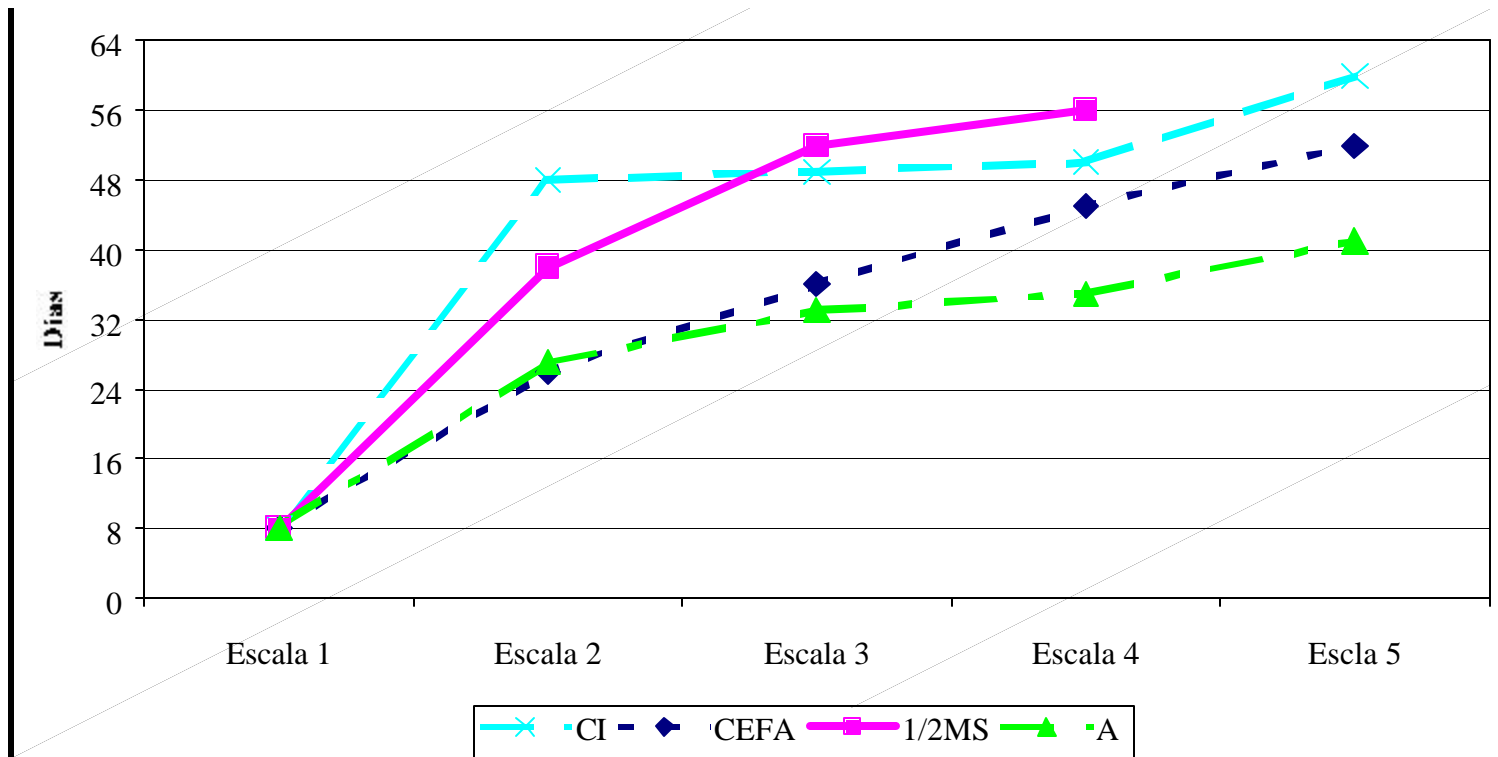


Figura 9. Desarrollo de plántulas de lulo en condiciones de aireación, cultivadas en los medios CI, CEFA, 1/2MS y A, hasta los 60 días. Donde la escala 1 representa plantas menos desarrolladas y la escala 5 las más desarrolladas.

superior al CEFA, pero como se observó, al implementar la aireación se obtuvo respuesta casi equivalente entre los 2 medios.

Estos resultados reafirman la importancia del intercambio gaseoso (facilitado con la espumilla en la tapa) en la obtención de plántulas de lulo vigorosas y apoyan la hipótesis de que el etileno puede afectar en el cultivo *in vitro* de estas plantas, por lo que se recomienda realizar las pruebas sugeridas en el numeral 3.1, para corroborarlo.

Adicionalmente se plantea que este factor actúa en interacción con el medio de cultivo utilizado, como se observó, la respuesta fue diferente entre medios aunque todos estuvieron en condiciones de aireación.

El uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para el mantenimiento a largo plazo de lulo *in vitro*, puede causar un deterioro en las plantas, como fue observado en la sección 3.1, por lo tanto no se recomienda emplear medios suplementados con hormonas.

Un factor común en los medios de menor respuesta (CI y ½ MS) es el uso de agar como gelificante, el cual posee algunas desventajas comparado con el gel Rite (utilizado en medio A y CEFA), tales como la presencia de algunas impurezas orgánicas que pueden afectar el desarrollo de las plantas, así como la menor difusión de sustancias solubles que reducen la disponibilidad para el tejido vegetal (Scherer, 1988).

Las vitaminas del medio A difieren de los otros medios ensayados en algunos aspectos; como la ausencia de myo-inositol, la cual es una de las vitaminas esenciales, la presencia de pantotenato de calcio y la alta concentración de ácido nicotínico. Se conoce que el requerimiento de vitaminas varía de acuerdo a la naturaleza de la planta y el tipo de cultivo (George, 1993), algunos experimentos han mostrado que la supresión de algunas vitaminas favorecen el desarrollo de las plantas (Linsmaier y Skoog, 1965). El pantotenato de calcio no es utilizado con frecuencia, pero se ha encontrado que juega un papel importante en el cultivo de algunos tejidos (Morel, 1946; Telle y Gautheret, 1947;

Gautheret, 1948, citados por George, 1993), por lo que no es extraño que favorezca la respuesta en lulo.

Como ya se mencionó, las mejores plantas fueron obtenidas con el medio A, lo cual lleva a confirmarlo como el que proporciona la mejor opción para micropropagación de plántulas lulo en condiciones de aireación.

3.3 Efecto de la posición de la yema

El subcultivo continuo de diferentes yemas en el medio A con espumilla en la tapa, presentó asincronía en el desarrollo de la población. Algunas plantas mostraron un crecimiento más acelerado y en otras se observó la formación de callo friable al rededor de la yema, el cual impidió la brotación de raíz afectando el desarrollo normal de las plantas o inhibiéndolo totalmente.

Se consideró que la posición de la yema respecto al ápice de la planta podría ser un factor determinante en este fenómeno, por lo cual se identificó la posición de diferentes yemas (Figura 2) y se colocaron en medio de propagación para hacer un seguimiento de su desarrollo.

La respuesta de las yemas presentó un comportamiento diferencial, observando un alto potencial de propagación en las primeras yemas que fue decayendo al acercarse a la base de la planta. La mejor repuesta se obtuvo en las yemas No.1 y 2 reflejado en un rápido enraizamiento que comenzó a los 16 días (Figura 10). De la yema No. 3 en adelante se presentó una lenta producción de raíces tardando más de 27 días en comenzar a enraizar, de la misma forma, en estas yemas se presentó con alta frecuencia la formación de callo friable en la base del explante ($\chi^2 = 26.66$; prob= 0.001; gl= 2), impidiendo el desarrollo normal de la planta, efecto que no se presentó en las primeras yemas.

Las yemas 1 y 2 presentaron un rápido enraizamiento, pero se observó que la expansión foliar fue más rápida a partir de la yema 1 (datos no se muestran), probablemente por que

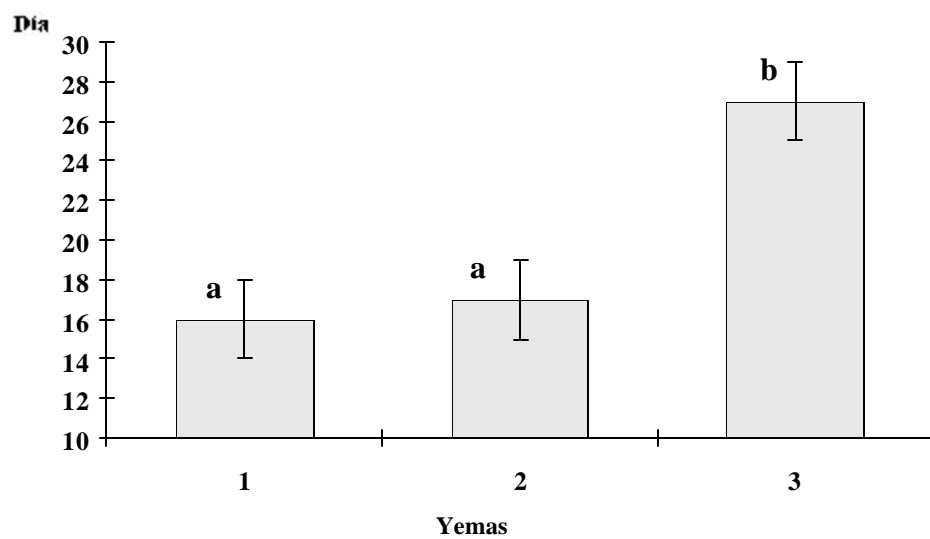


Figura 10. Días de enraizamiento en plantas micropropagadas a partir de la yema en posición 1, 2 y 3.

esta contiene el ápice de la planta, que ya posee hojas formadas en el momento de ser colocado en el medio de cultivo, diferente a la yema 2 que debe empezar a desarrollar hojas nuevas. Por lo tanto se escogió la primera yema para establecer una colección donante que aportaría los explantes para los ensayos de regeneración y la segunda yema para establecer la colección de mantenimiento del material *in vitro*.

Con la primera yema se obtienen plantas homogéneas en su estado de desarrollo, logrando sincronizar la producción de explantes para los ensayos de regeneración.

Probablemente las primeras yemas se favorecen del gradiente hormonal intrínseco que contienen las plantas, la cual presenta una acumulación de auxinas en el ápice, que se va difundiendo hacia la base (George, 1993), además de que hay mayor actividad celular en sus tejidos, contrario a las yemas inferiores, las cuales necesitan mas tiempo para inducir actividad celular y responder a los medios de micropropagación.

La formación de callo en las yemas inferiores podría estar relacionada con la concentración de citoquininas que tiene la planta en la zona basal (George, 1993), la cual, al interactuar con el medio de cultivo favorece la formación de callo.

3.4 Regeneración de plantas

3.4.1 Embriogenesis Somática: Como una alternativa para obtener plantas regeneradas de lulo se ensayó la embriogénesis somática a partir de hojas cotiledonares, con base en el protocolo reportado por Guimaraes para otra solanácea (*Cyphomandra betacea*).

El sometimiento de los explantes a diferentes concentraciones de la auxina 2,4-D (0.5, 1, 3 y 9 mg/L), no mostró respuesta embriogénica en los tejidos. Los primeros 8 días presentaron un incremento en el tamaño, a los 20 días se observó una apariencia cloróticas en el tejido y la aparición de estructuras friables (Figura 11). A los 30 días se registró fenolización y posteriormente la muerte del explante.

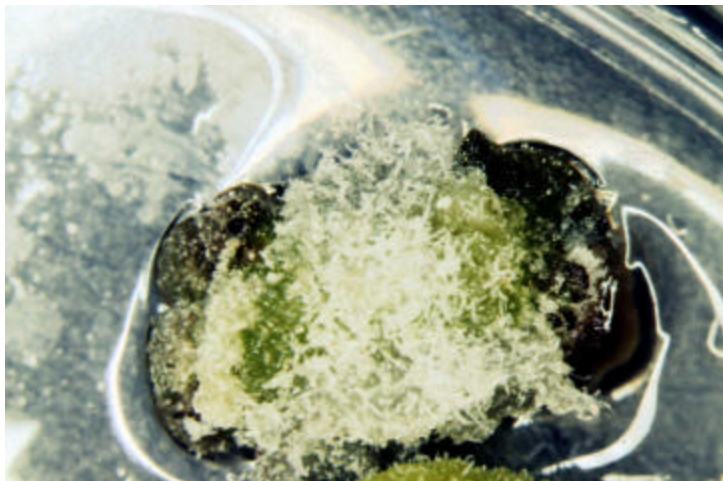


Figura 11. Hoja cotiledonar de lulo en medio de embriogénesis a los 55 días.

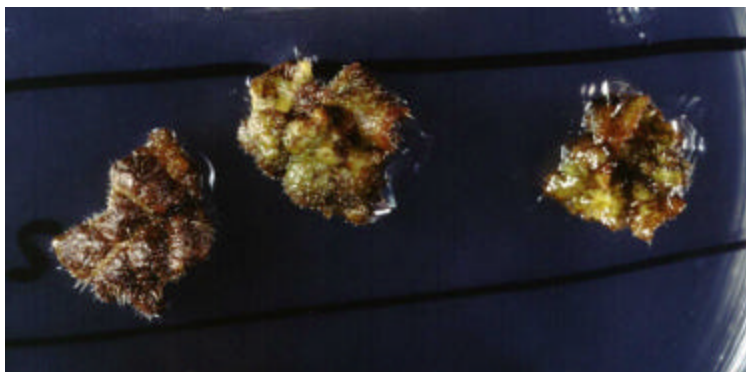


Figura 12. Hojas expandidas de lulo (SqE) fenolizados después de 30 días en medio Hendrix

Generar embriones somáticos no solo es importante por su aplicación en los métodos de transformación genética, si no por la aplicación práctica que embriogénesis tiene en la multiplicación a gran escala y en la posibilidad de hacer crioconservación para generar un banco de germoplasma (Von Arnold., *et al.* 2002).

Desde que Rienert (1958) y Steward *et al* (1958) describieron la inducción de embriones somáticos en zanahoria (*Dacus carota*), se estableció que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar callos embriogénicos *in vitro*, siempre y cuando se encuentre el explante, el medio de cultivo y las condiciones ambientales apropiadas (Von Arnold. *et al.* 2002), de hecho se ha conseguido generar embriones somáticos en numerosas especies vegetales, incluyendo algunas solanáceas como *Nicotiana tabacum* (Stolarz, 1991; Haccius *et al.*, 1965), *S. melogena* (Saito y Nishimura, 1994), *S. aviculare* (Alizade y Mantell. 1991) y *S. tuberosum* (García *et al.*, 1995).

Las concentraciones hormonales probadas en lulo están en el rango de las reportadas para solanáceas, aun así, no se observaron embriones somáticos. Se sabe que los patrones de respuesta al cultivo de tejidos están determinados epigenéticamente y están influenciados por el estado de desarrollo de la planta madre y la naturaleza del explante (Litz y Gray, 1995), por lo que sería interesante probar diferentes estados de desarrollo en la planta madre, además de variar la auxina utilizada y ensayar el uso de reguladores de crecimiento del tipo de la nueva generación tales como oligosacaridos, jasmonatos, poliaminas brassinosteroides, los cuales han logrado inducir embriones somáticos en algunas especies recalcitrantes (Von Arnold *et al.* 2002).

3.4.2 Organogénesis: Se realizaron ensayos preliminares para obtener brotes regenerados a partir de hojas apicales de los clones SqE y Sq, probando el único reporte para lulo hasta fecha y ensayando diferentes medios, basados en reportes de otras solanáceas, aunque cada genotipo requiere condiciones específicas, la metodología puede establecerse con base a especie relacionadas.

Después de 30 días de cultivo en medio de regeneración, no se observaron brotes regenerados en ninguno de los tratamientos. A los 8 días los explantes aumentaron su tamaño, posteriormente, al rededor de los 15 días se observó ensanchamiento en las nervaduras centrales y en la base de la hoja, a los 25 días algunos explantes generaron raíces, pero hubo ausencia total de brotes apicales regenerados. Treinta días después de iniciar los ensayos, se presentó oxidación y muerte de los explantes de los dos genotipos (Figura 12). Estas observaciones sugerían que el tejido no estaba recibiendo el estímulo hormonal necesario, pues no se notaba ningún tipo de actividad celular en las láminas foliares, aparte de la eventual formación de raíz.

Teniendo en cuenta numerosos reportes de organogénesis en diferentes especies de solanáceas; como tabaco (*Nicotiana tabacum*, Cassells *et al.*, 1982), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*, Atkinson y Gardner, 1993), tomate (*Lycopersicum esculentum*, Ulzen *et al.*, 1993), papa (*Solanum tuberosum*, Lentini *et al.*, 1990), berenjena (*Solanum melógena*, Fari *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1991), *S. muricatum* (Joo *et al.*, 1986), entre otras, se consideró que en esta familia había una tendencia favorable a la respuesta organogénica, por lo que se trató mejorar las condiciones del explante de lulo para promover la organogénesis.

Por lo tanto, adicionalmente a la lámina foliar se ensayó el pecíolo como explante (por su alto potencial organogénico reportado en otras especies) y se diseñó un pretratamiento que consiste en utilizar un sonicador para realizar pequeñas heridas a los explantes para favorecer el contacto con el medio de cultivo el medio. Como ensayo preliminar, se colocaron explantes de los dos genotipos en medio U1, después de ser sometidos al pretratamiento. Treinta días después se observó por primera vez respuesta organogénica.

En el primer día de ensayo, las láminas foliares se mostraron afectadas por el proceso de sonicación (Figura 13B), pero después de quince días se empezó a observar su recuperación, así como el ensanchamiento en las nervaduras y un aumento el tamaño del explante, llegando a duplicar su tamaño inicial (Figura 13 C). Veinte días después, se observó un aspecto rugoso en la lámina foliar y se presentaron abultamientos, que 18 días

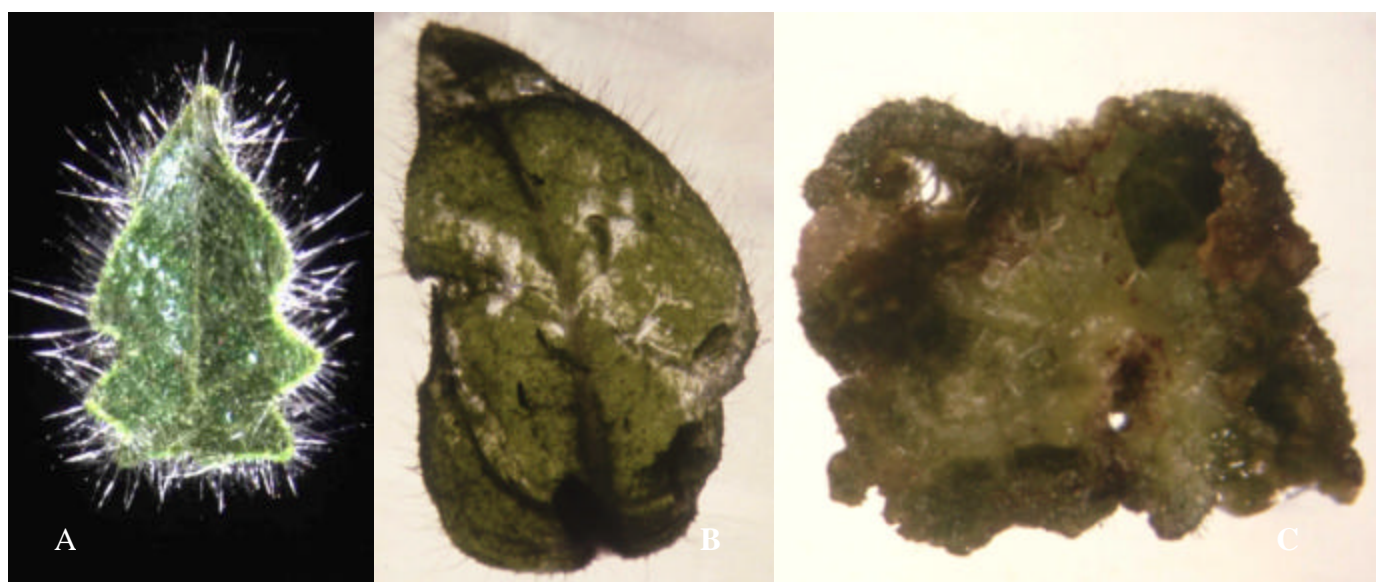


Figura 13. Hojas apicales en medio de regeneración: Antes de pretratamiento (A); Después del pretratamiento (B) y 15 días en medio de regeneración (C).

después dieron lugar a brotes organogénicos (Figura 14), los cuales fueron generados sin la formación previa de callo friable (organogénesis directa).

De la misma forma, se presentó respuesta en los peciolo, los cuales inicialmente reaccionaron en forma similar a las hojas, a los 15 días incrementaron su tamaño original (Figura 15 A), a los 20 días se observó un ensanchamiento en los extremos, a los 30 días se presentaban abultamientos que se extendían desde los extremos al centro del pecíolo, los cuales posteriormente originaron brotes a lo largo del pecíolo (Figura 15 B).

Estos resultados indicaron que el pretratamiento favorecía la respuesta organogénica, para comprobar su efectividad se comparó la respuesta organogénica de hojas y peciolo de los dos genotipos, sonicados y cultivados en los medios HM y U1 (Cuadro 2). Se utilizó como testigo el protocolo descrito por Hendrix donde los explantes no son sometidos al pretratamiento.

En estos ensayos se observó la misma tendencia presentada en los ensayos preliminares: No hubo respuesta de los explantes del tratamiento Hendrix (sin pretratamiento) pero si en los explantes sonicados y cultivados en los medios HM y U1.

La herida causada a los explantes con el sonicador favoreció la respuesta organogénica. Algunos autores sugieren que las heridas causan movimientos endógenos de sustancias que migran hacia el lugar de la herida, causando un incremento en los niveles hormonales que facilitan la morfogénesis. Park y Son (1998) realizaron estudios haciendo heridas localizadas en hojas de *Papulus nigra* x *P. maximowczii* y observaron que la morfogénesis se limitó a las parte heridas de la lámina foliar. La ventaja de usar el sonicador es que este realiza gran cantidad de microheridas que no dañan drásticamente el tejido y tienden a recuperarse rápidamente, además de que se favorece el contacto del explante con el medio de cultivo.

Considerando los medios de cultivo se observó que en el medio U1 la respuesta fue mayor a la obtenida en el HM, ya que ambos genotipos y explantes presentaron respuesta (Figura 16), a diferencia del medio HM en donde no hubo respuesta en hojas de SqE y en

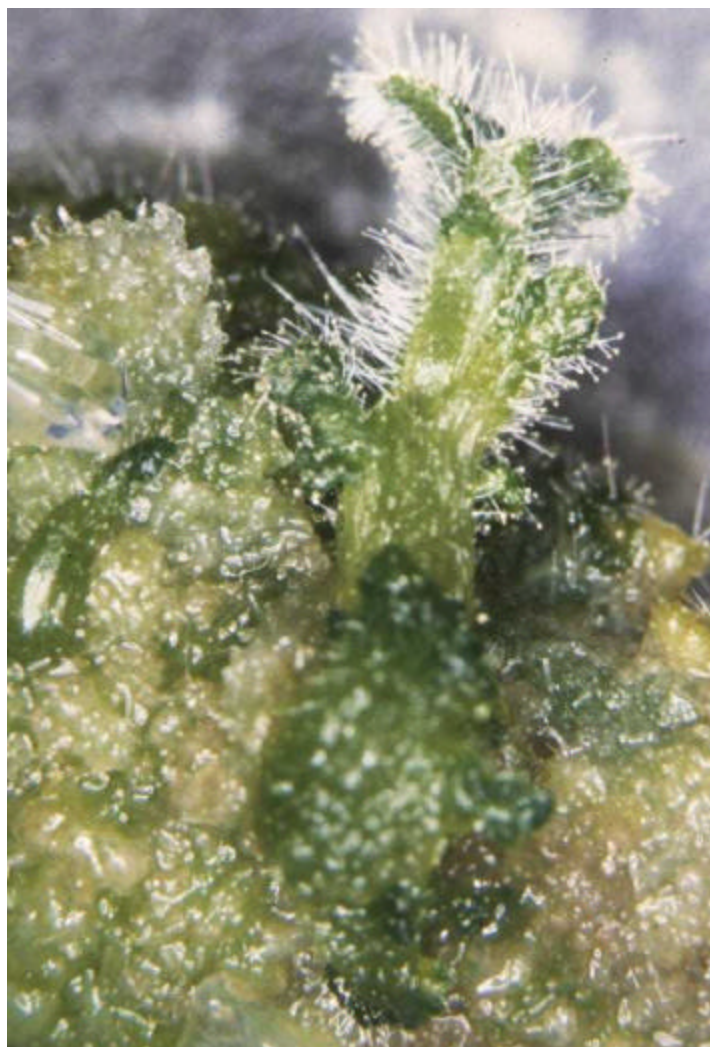


Figura 14. Brote regenerado a partir de lámina foliar a los 30 días de iniciar el ensayo.



Figura 15.(A) Evolución de pecíolos en el proceso de regeneración. (B) Pecíolo regenerando brotes múltiples a los 50 días en medio Ultzen.

pecíolos de Sq. La organogénesis es altamente dependiente de la interacción hormonal entre el contenido endógeno y su análogo sintético, el cual es suministrado por el medio de cultivo (Flick. *et al*, 1983). Al parecer el medio U1, que cuenta con la presencia de la zeatina y AIA en sus componentes , proporciona mejores condiciones que el medio HM (suplementado con BAP).

Analizando en forma global la respuesta de los dos genotipos, se encontró que el SqE presentó mayor respuesta (22 %, prueba X^2), que el genotipo Sq, el cual alcanzó un 12% de respuesta. Se ha reportado que la regeneración es muy influenciada por el genotipo, pues resultados obtenidos en una variedad, podrían no ser reproducibles en otra (George, 1993). Algunas respuestas genotipo-dependientes son causadas por la interacción entre la planta y el medio de cultivo o la hormona utilizada, por lo que se debe tener en cuenta que los genotipos requieren de condiciones específicas para cada uno. Esto podría estar relacionado directamente con la ausencia de respuesta en el tratamiento Hendrix, aunque sería interesante probar la respuesta de los genotipos al protocolo Hendrix con pretratamiento.

Entre los explantes ensayados, se mostró mayor respuesta en los pecíolos que en las hojas apicales (Figura 16). Se conoce que la respuesta morfogenética esta influenciada por el origen del explante, el cual reacciona distinto a los estímulos hormonales (Litz y Jarret, 1993). En los ensayos preliminares, aunque no se presentó respuesta organogénica se pudo observar un ensanchamiento de las nervaduras centrales y especialmente en la base de la hoja, a la cual está adherido el pecíolo. Algunos estudios han encontrado que las nervaduras centrales de las hojas poseen una alta concentración de auxinas (Matson *et al.*, 1999), lo cual puede explicar el ensanchamiento de las nervaduras. La respuesta de los pecíolos, además de estar condicionada por el nivel endógeno de hormonas, puede tener una mayor actividad celular, influenciada por su cercanía a las células meristemáticas de las yemas (George, 1993)

Los análisis estadísticos indicaron que estos resultados son reproducibles. A pesar de que en algunos tratamientos no se presentaron brotes, si se observó diferenciación en el

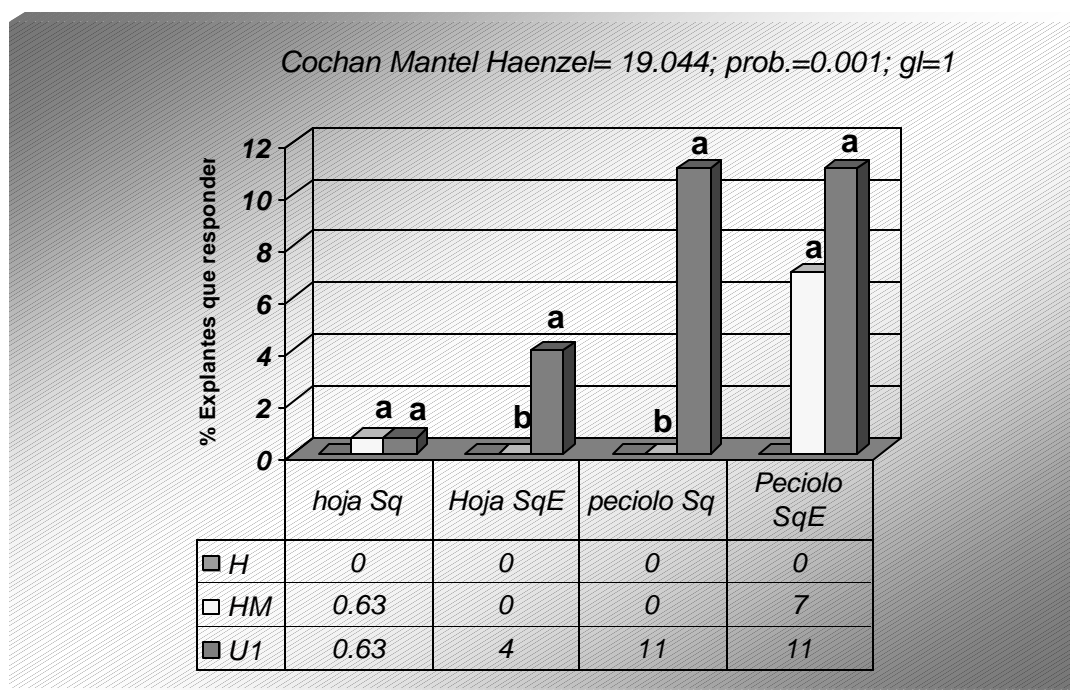


Figura 16. Regeneración de brotes a los 55 días en dos genotipos de lulo, en tres medios de cultivo, utilizando pecíolo y hoja como explante. Las plantas donantes de los explantes fueron micropropagadas en medio 1/2MS.

tejido y en algunos casos hubo formación de múltiples abultamientos que llegaron a desarrollarse en brotes en forma tardía al los 65 días en el medio U1. Contrario a lo ocurrido en el protocolo H, en donde no se observó ningún tipo diferenciación celular, ni respuesta del tejido, a parte de la hinchazón en las nervaduras centrales.

3.4.3 Efecto del medio de Micropropagación en la regeneración: Después recopilar experiencia y lograr destreza operativa (selección de las plantas madre, selección del explante y manipulación del pretratamiento) se utilizaron las mejores variables obtenidas en el numeral 3.4.2, cultivando peciolo del genotipo SqE en medio U1, para evaluar si el medio de propagación utilizado en el cultivo de las plántulas donantes de los explantes, afecta la respuesta organogénica.

El ensayo mostró que peciolo provenientes de plantas micropropagadas en medio A tienden a mostrar un mayor porcentaje de regeneración (aproximadamente un 60%) respecto a los provenientes de plantas micropropagadas en medio $\frac{1}{2}$ MS, los cuales alcanzaron un 40% de regeneración (Figura. 17), aunque los análisis estadísticos indicaron estas diferencias no fueron significativas ($X^2 = 3.846$; $gl = 1$; $prob. = 0.05$). Estos resultados sugieren la necesidad de incrementar el número de repeticiones y número de muestra por repetición para elucidar si estas diferencias pueden llegar a ser significativas.

En micropropagación, el contenido hormonal del medio $\frac{1}{2}$ MS logro causar deterioro en los explantes después de un uso prolongado, por lo que se cree que de igual manera, puede afectar la organogénesis. Se debe tener en cuenta que el contenido endógeno hormonal de plantas micropropagadas en este medio, proporcionan explantes que a largo plazo poden ver afectada su respuesta organogénica. Los resultados sugieren que el medio A no solamente favorece la micropropagación de lulo, al presentar plantas con mejor desarrollo y más vigorosas, si no también que incrementa la de respuesta en regeneración.

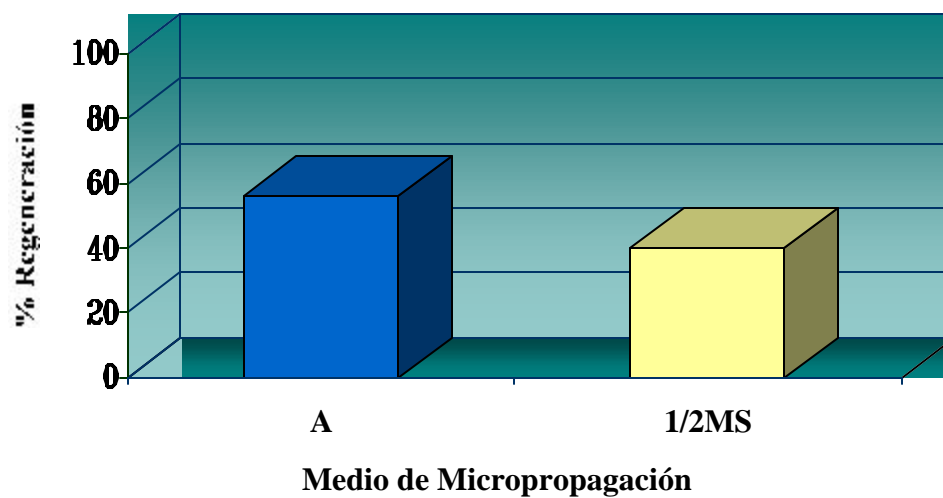


Figura 17. Regeneración en medio Ultzen de pecíolos provenientes de plantas micropropagadas en medios A o 1/2 MS.

3.5 Fase de Invernadero y campo

Después de permanecer 45 días en medio de micropropagación *in vitro*, se seleccionaron 20 plantas regeneradas obtenidas en los resultados descritos en el numeral 3.4.2, y 20 clones micropropagados *in vitro* (testigo). Estos fueron transplantados a suelo en invernadero donde permanecieron por 45 días antes de ser llevados a campo. En términos generales no se observaron diferencias significativas entre ellos en su desarrollo.

La etapa de endurecimiento en invernadero se llevó acabo sin inconvenientes, logrando un 100% de prendimiento. Las plantas se desarrollaron en forma normal y similar entre si, sin aparentes cambios en la morfología de los individuos (Figura 18). Después de 45 días se observó un promedio de 5 hojas por planta, tanto en clones como en regeneradas, cada hoja de borde lobulado y con una altura promedio de 21 y 22 cm, para clones y regeneradas respectivamente.

Ya en campo, las observaciones se realizaron durante 90 días después del transplante (Figura 19). De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas entre plantas regeneradas y testigos, respecto al tiempo de emisión de brote floral (*Clon*; gl= 38, prob.= 0.428 y *regenerada*; gl.=30, prob.= 0.43), la apertura de la flor (*Clon*; gl= 38, prob.= 0.884 y *regenerada*; gl= 38, prob.= 0.885) y el llenado de fruto (*Clon*; gl= 29, prob.= 0.515 y *regenerada*; gl= 34, prob.=0.527) como se demuestra en la Figura 20. La fructificación se ocurrió normalmente (Figura 21) con un número de frutos formados hasta los tres meses que no presentó variaciones entre clones y las plantas regeneradas (Figura 22). Con respecto a la altura, todas las plantas se desarrollaron en forma equivalente entre si (Figura 23), desde los 21 cm en el primer día hasta registrar 83 cm en el día 90.

Estos resultados indican que el proceso de regeneración no afecta el desarrollo de las plantas y permite obtener individuos completos con un desarrollo normal tanto en su fase vegetativa como en la sexual.



Figura 18. Plantas regeneradas desarrolladas en invernadero. Genotipo con espinas(A) y sin espinas(B)



Figura 19. Cultivo de plantas regeneradas y clones en campo a los 90 días después del transplante.

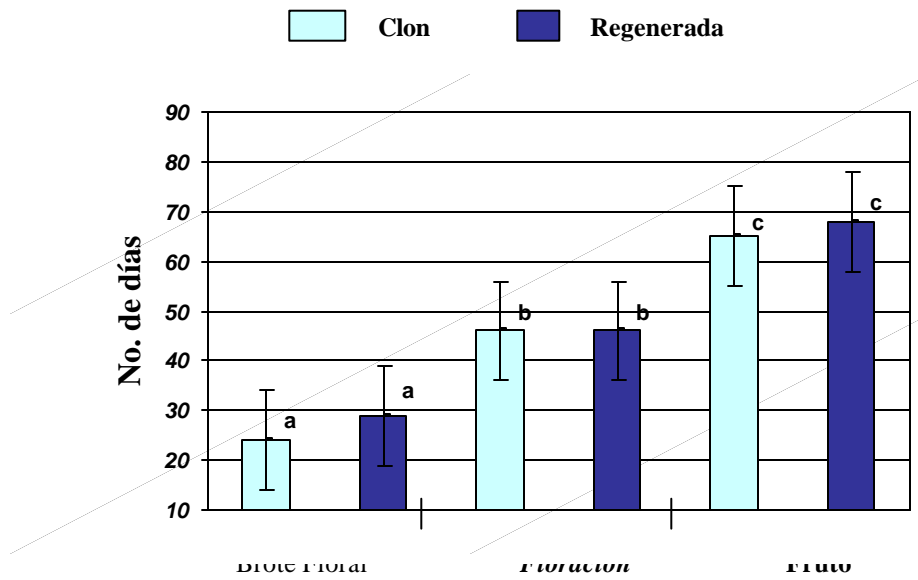


Figura 20. Desarrollo en campo de plantas regeneradas y clones mantenidos *in vitro* medidos por el tiempo de generación del botón floral, floración y fruto.



Figura 21. Llenado de fruto: (1) Flor abierta; (2) 15 días después de antesis; (3) 45 días después de fecundación.

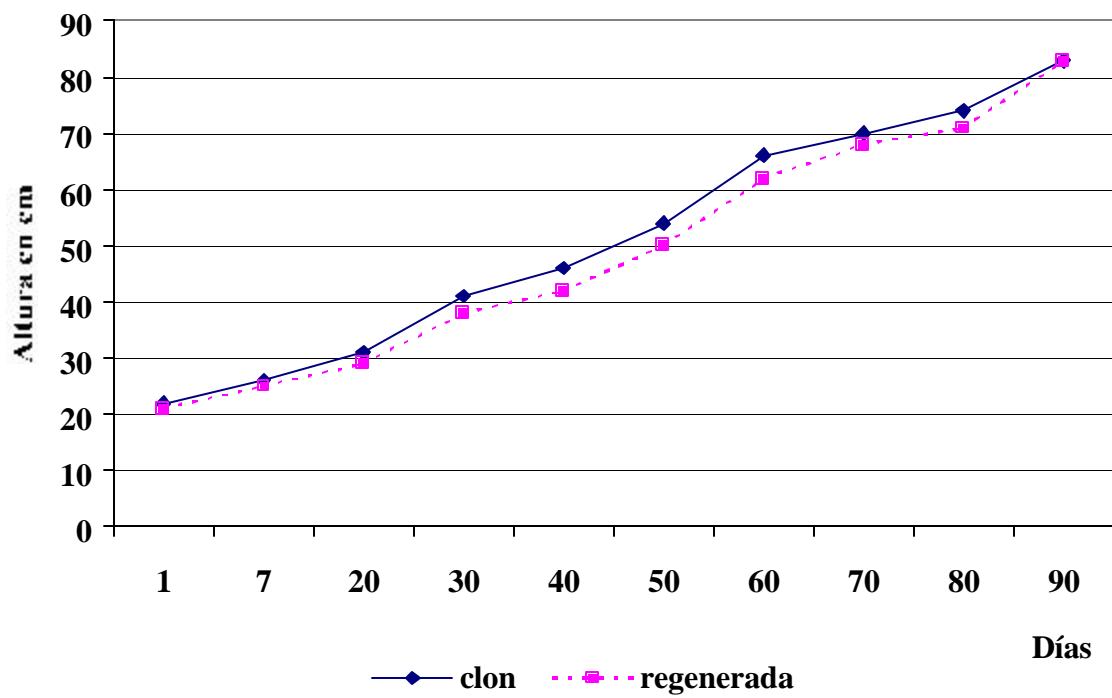


Figura 23. Altura en campo de regeneradas Vs. clones: Observaciones realizadas a 20 plantas regeneradas y 20 clones durante 90 días .

Al comparar el cultivo en campo de plantas mantenidas *in vitro* (sean regeneradas o clones) con reportes del cultivo tradicional de semilla sexual, se observó precocidad en la floración del material originado *in vitro*, los cuales comenzaron a florecer 45 días después del transplante a campo (90 días en suelo incluyendo fase de invernadero) y como consecuencia se obtuvo un adelanto en la fructificación, que comenzó entre los 65 y 70 días. Esto es considerado temprano si se compara con lo reportado para lulo proveniente de semilla sexual, en donde la floración comienza a los 150 días después del transplante (Reyes, 1987) y el llenado de fruto comienza al rededor de los 270 días después del transplante (Romero1961; Meneses,1992; Castañeda, 1992). Probablemente la condición *in vitro* favorezca esta precocidad, la cual podría representar una ventaja en el cultivo de lulo, pues permite comenzar a producir en menos tiempo.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

-Se desarrolló una metodología reproducible de regeneración por organogénesis para clones de lulo con espinas y sin espinas mantenidos *in vitro*, reporte que es muy importante en el desarrollo de un protocolo de transformación genética.

-Esta metodología involucra un pretratamiento a los explantes que requiere el uso de ultrasonido para ocasionar pequeñas heridas que favorecen la respuesta organogénica.

-Se propone uso del peciolo como explante, el cual fue más organogénico que la lámina foliar, reportada por Hendrix.

-El medio de regeneración que presentó mayor respuesta fue el medio Ultzen reportado para organogénesis de tomate (*Lycopersicum esculentum*).

-Los dos genotipos de lulo respondieron a los tratamientos de regeneración, pero se observó una leve mayor efectividad en el genotipo con espinas.

-Para regeneración es muy importante partir de un explante vigoroso, capaz de tolerar el pretratamiento sin afectar su viabilidad. Estos explantes se obtienen propagando las plántulas en medio A, utilizado en micropropagación de papa (*Solanum melógena*), y con espumilla en la tapa.

-Al parecer, el etileno afecta el desarrollo *in vitro* de plántulas de lulo, por lo cual el uso de espumilla en la tapa favorece su desarrollo, generando plantas de lámina foliar ancha, color verde intenso y gran cantidad de raíces, proporcionando explantes vigorosos que mantienen su viabilidad después de los ensayos de regeneración.

-Aunque los medios publicados por Hendrix y Atkinson no generaron individuos vigorosos, se recomienda probarlos con la espumilla en la tapa, para probar su efectividad en condiciones de aireación.

-Para micropropagación se recomienda el uso de las primeras yemas, que generan una población con crecimiento homogéneo, lo cual permite sincronizar la obtención de explantes y realizar ensayos en forma simultánea.

-El uso prolongado de un medio de micropropagación 1/2 MS, el cual contiene hormonas, propició un efecto de decoloración en las hojas, por lo que se recomienda usar un medio sin hormonas como el medio A.

-Se observó que el medio de micropropagación afecta la respuesta organogénica, ya que se obtuvo mejor respuesta en plantas micropropagadas en medio A que en plantas micropropagadas en medio 1/2 MS.

-El lulo se ve afectado por etapas de micropropagación prologadas, observándose un desarrollo retardado, por lo que se recomienda renovar constantemente la colección *in vitro* con material proveniente de invernadero o campo.

-En el cultivo en campo de plantas regeneradas y de clones mantenidos *in vitro*, no hay diferencias en su desarrollo en términos de altura, tiempo de emisión de brote floral,

apertura de la flor, inicio de llenado de fruto y número de frutos producidos, hasta los tres meses después del trasplante.

-Las plantas mantenidas *in vitro*, sean clones o regeneradas, presentaron una floración temprana comparada con los reportes del cultivo tradicional de lulo, el cual emplea semilla sexual. Al parecer el cultivo *in vitro* favorece la precocidad en los materiales, lo cual es ventajoso en lulo, pues se observa un adelanto en el periodo de producción.

-Con estos avances, actualmente se trabaja en ensayos preliminares para el establecimiento de una metodología de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

BIBLIOGRAFÍA

AGBIOS (On line) Disponible en: <http://www.agbios.com/default.asp>

ALIZADEH S AND MANTELL S.H. Early cellular events during direct somatic embryogenesis in cotyledon explants of *Solanum aviculare* Forst. Annals of Botany. 67 (3): 257-264

ATKINSON R. and GARDNER R. 1993. Regeneration of transgenic tamarillo plants. Plant Cell Reports. 12: 347-351

BERNAL E.J., M. LOBO A., and M. LONDOÑO B. 1998. Documento presentación del material "Lulo la selva." Corpoica, Rionegro, Colombia.

BEVAN, M.W., R.B. FLAVELL, AND M.D. CHILTON. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304:184-187.

CASSELLS A., LONG R.D., MOUSDALE D.M. 1982. Endogenous IAA and morphogenesis in tabaco petiole cultures. Physilogía-Plantarum (Denmark). v.56(4). p. 507-512.

CASTAÑEDA H. I.1992. El lulo o naranjilla. Su cultivo, su conservación. Ediciones tecnológicas. Pereira. pp. 150.

CCI.CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL (on line). Available: <http://www.cci.org.co/2000>

CEPRAP. (on line). Available in: <http://ceprap.ucdavis.edu/Transformation/transform1.htm>

CIAT, 2000. Genetic Transformation of lulo(*Solanum quitoense*) and tree tomato (*Cyphomandra betacea*). Annual Report 1999. Project SB-2. CIAT. Cali. Colombia. p. 109-111

COCHARN J., MANTEL N and HAENSZEL W. 1959. Statistical Aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. Journal of the national cancer institute. 22. 719-748.

COLBY S. M., JUNCOSA A. M., STAMP J. A., MEREDITH C. P. 1991. Developmental anatomy of direct shoot organogenesis from leaf petioles of *Vitis vinifera* (Vitacea). American Journal of Botany 78 (2): 260-269

DENIS F.G., HERNER R. C. and CAMACHO S. 1985. Naranjilla: a potential cash Crop for the Small farmer in Latin America. Acta Horticola. International Society for Holticultural Science. 475-481.

EINOT I and GABRIEL K.R. 1975. A estudy of the powers of several methods of multiple comparisons. Journal of the American Statistical Association. 70. 351

FABIJAN D., TAYLOR J. S y REID D.M. 1981. Adventious rooting in hypocotyls of sunflower (*Heliantus annus*) seedlings. II. Action of gibberellins, cytokinins, auxins and ethylene. Physiol. Plant. 53: 589-597.

FLICK C. E., EVANS D.A y SHARP W. R. 1983. Organogenesis. En: Evans D. A.: Sharp W. R.; Amirato P. V. y Yamada Y. (eds.). Handbook of plant cell cultures. Mac Millan Publishing, Nueva York. V. 1, p. 13-81.

- FARI M., NAGY I, CSANYI,-M., MITYKO,-J. and ANDRASFALVY,-A. 1995.
Agrobacterium mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L.). Plant Cell Report. 15 (2): 82-86
- FRALEY, R.T., S.G. ROGERS, R.B. HORSCH, P.R. SANDERS, J.S. FLICK, S.P. ADAMS, M.L. BITTNER, L.A. BRAND, C.L. FINK, J.S. FRY, G.R. GALLUPPI, S.B.GOLDBERG, N.L. HOFFMANN, AND S.C. WOO. 1983.
 Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 80:4803-4807.
- FRIZZEL L. A (1988) Biological effects of acoustic cavitation. In: Sus-lick K (ed) Ultrasound, its chemical, physical and biological effects. VCH Publ, Weinheim, pp 287–303
- GAMBORG O. L., MILLER R. A., OJIMA K. 1968. Exp. Cell Res. 50: 151-158
- GARCIA-E-DE; MARTINEZ-S; DE-GARCIA-E. 1995 . TI: Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from stem nodal sections. Journal-of-Plant-Physiology. 145 (4), 526-530.
- GAUTHERRT R. J. 1948. Sur la culture indefinie des tissus de Salix carpea. Compt. Rend. Soc. Biol. 142, 807.
- GEORGE E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2nd Edition. Exegetics Limited. Gran Britain. 555 p.
- GUIMARAES M. L., CRUZ G. and MONTEZUMA-CARVALO J. 1988. Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 15 (2): 161-167.

- HACCIUS B y LAKSHMANAN K. K. 1965. Adventive embriogenesis in callus culture of *Nicotiana* under high light intensity. *Planta* 65:102-104.
- HEISER C. 1993. The naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hibrid. Gene conservation and Exploitation. Edited by J.P. Gustafson et al., Plenum Press, New York. p. 29-34.
- HENDRIX R., LITZ R. and KIRCHOFF B. 1987. Invitro organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum*, *S. quitoense* (naranjilla) and *S. sessiliflorum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 11: 67-73.
- HERRERA-ESTRELLA, L., A. DEPICKER, M. VAN MONTAGU, AND J. SCHELL. 1983. Expression of chimaeric genes transfered into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209-213
- HORN W., SCHLEGEI G y JOHN K. 1988. In vitro stock plant culture of *Kalanchoe hybrids*. *Acta Hort*. 226:623-626.
- HUSSEY. G AND STACEY N. J., 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann.Bot.* 48: 787-796.
- JOERSBO M, BRUNSTEDT J .1990. Direct gene transfer to plant proto-plast by mild sonication. *Plant Cell Rep* 9:207–210
- JOERSBO M, BRUNSTEDT J .1992. Sonication: a new method for gene transfer to plants. *Physiol Plant* 85:230–234
- JOO M.K., KIM T.S., CHO C.Y. 1986. Plant regeneration from leaf explants of the tropical fruit vegetable pepino (*Solanum muricatum*). *Korean-Journal of plant tissue culture*. v 13 (2). p. 143-148.

- KLEVSKA-PLETIKAPIC,-B.; BUTUROVIC-DERIC,-Z. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. Plant-cell,-tissue-organ-cult. Dordrecht, TheNetherlands : Kluwer Academic Publishers. v. 41 (2) p. 189-192.
- LAI-CHUOCHUN; YU-TSONGANN; YEH-SHYIDONG; YANG-JIUSHERNG .1998. Enhancement of *in vitro* growth of papaya multishoots by aeration. Plant-Cell,-Tissue-and-Organ-Culture. 1998, 53: 3, 221-225; 11 ref.
- LENTINI Z ., EARLE E.D., PLAISTED R.L. 1990. Insect-resitant plants with improved horticultural traits from interspecific potato hybrids grown *in vitro*. Theoretical and Applied genetics 80(1): 95-104.
- LINEBERGER R. D. 2000. The Many Dimensions of Plant Tissue Culture Research. Available in: <http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/plttissue/plttissue.html>
- LINSMAEIR E. M. y SKOOG F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plnat. 18:100-127.
- LITZ R.E and GRAY D.J. 1995. Somatic embryogenesisfor agricultural improvement. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 416-425.
- LOBO A., M. 1991. Perspectivas de siembra del lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.). Boletín Técnico. Facultad de Ciencias Agropecuarias Palmira. Vol 2. N°. 2. P 125 - 130.
- LOBO A., M. 1995. Investigaciones con semilla de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). Mimeografiado. 14 p.
- LOBO, M.; GIRARD, E.; JARAMILLO, J.; JARAMILLO, G. 1983. El cultivo del lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.). ICA-Infoma 17(1):10-20.

- LOBO, M.; MEDINA, C.I. 1999. Lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam), frutal andino con potencial de desarrollo. CORPOICA, Documento de trabajo. Sp.
- LOPEZ A., S. 1980. Plagas y enfermedades de la naranjilla o lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y su control. Revista Esso agrícola. N° 2. P 5 - 11.
- LOZADA J.B. 1974. Cultivo de lulo. Secretaria de Agricultura de Antioquia. Cuadernillo No. 17
- MATTSSON J. Z. SUNG R AND BERLETH T. 1999. Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. Development 126, 2979-2991. Printed in Great Britain. The Company of Biologists Limited 1999
- MENESES M., H.A. y CORREA C., J. 1992. El Cultivo del lulo o naranjilla. Secretaria de Agricultura. No. 18. 40 p.
- MOON,-H.K.; KIM,-J.H.; PARK,-J.I. 1987. Position effect of axillary buds on shoot multiplication and rooting in bud culture of *Quercus acutissima*. Journal-of-Korean-Forestry-Society. v. 76(4) p. 370-375
- MOREL G. 1946. Action de l'acid pantothénique sur la croissance de tissus d'Aubépine cultivés *in vitro*. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris. 223: 166-168.
- MORTON J. 1987. In: Fruits of warm climates. [on line] available in:http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/naranjilla_ars.html
- MUKHERJEE S.K., RATHINASABAPATHI B., GUPTA N. 1991. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1991, 25: 1, 13-16; 8 ref.

MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15. p. 473-497

OHIO-STATE. (on line). Available in: <http://www.oardc.ohio-state.edu/plantranslab/sonicate>

PARK Y. G. y SON S. H. 1988. In vitro organogénesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plan Cell Tiss. Organ Cult.* 15: 95-105.

PETIARD V. and DESHAYES A. 1987. Plant Biotechnology as a tool for research and production. En: *Nestlé Research News 1986/1987*. Nestec. Ltd. Suiza. p 7-12

PURDUE. <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/articles/Naranjilla-cocona.html>

QUIROGA R. Y DOERING H. 1982. El cultivo del lulo C.V.C. Programa de ensayos agropecuarios. *Boletín Técnico*. 20 p.

REINERT J. 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71:15

REYES E. C. 1987. Descripción del a información existente sobre lulo y/o naranjilla (*Solanum quitoenese* Lam.) y las prácticas realizadas por los agricultores en diferentes zonas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. 100 p.

ROCA W. M. (1984). Cassava. In: *Handbook of plant Cell Culture*, ed W.R. Sharp; D.A. Evans; P.V. Amirato and Y. Yamada, 269-301

ROMERO C., R. 1961. El lulo: Una fruta de importancia económica. *Agricultura Tropical (Colombia)*. 17 (4). p 214 - 217.

- RYAN T. A. 1960. Significance Tests for multiple Comparisons of proportions variances and other statistics. *Psychological Bulletin*. 57. 318-328.
- SAS/SAT Users Guide, version 6, fourth edition. Vol 2. Cary NC:SAS Institute Inc. 1989. 846 p.
- SAITO T AND NISHIMURA S. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melogena*). *Plant Science*. 102 (2): 205-211.
- SCHERER P. A., MULLER E., LIPPERT H. y WOLFF G. 1988. Multielement analysis of agar and Gelrite impurities investigated by inductively coupled plassma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellan gum Gelrite. *Acta Hort*. 226: 107-114.
- SCHULTES H. AND CUATRECASAS. J. 1958. Notes on the cultivated lulo. Harvard University, Botanical Museum Leaflets. Vol. 16, No. 5 p.97-105
- STEWART F.C., MAPES M. O. and HEARS K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. *Am. J. Bot.* 45 : 705-708.
- STOLARZ A., MACEWICZ J., LOERZ H. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Physiology*. 137 (3): 347-357.
- TELLE J y GAUTHERED R. J. 1947. Sur la culture indefinie des tissus de la racine de jusquiame (*Hyascyamus niger*). *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*. 224: 1653-1654.
- THOMAS-P; MYTHILI-JB; SHIVASHANKARA-KS .2000. Explant, medium and

- vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon. *Journal-of-Horticultural-Science-and-Biotechnology*. 2000, 75: 1, 19-25; 24 ref.
- TORRE, R. and S. CAMACHO. 1981. Campesino fitomejorador de naranjilla. Carta de Frutales no. 14, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Quito, Ecuador
- TRICK HN, FINER JJ .1997. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*- mediated transformation. *Transgenic Res* 6:329–337
- TRICK HN, FINER JJ .1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*- mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17:482–488
- ULTZEN T., GIELEN J., VENEMA F., WESTERBROEK A., HAAN P., TAN M., SCHRAM A., GRINSVEN M and GOLDBACH R. 1995. Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. *Euphytica*. 85: 159-168.
- VON ARNOLD S., SABALA I., BOZHKO P., DYANCHOK J. and FILONOVA L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ Culture* 69: 233-249.
- WELSCH R. E. 1977. Stepwise Multiple Comparison Procedures. *Journal of the American Statistical Association*. 72. 359.
- YANG J. S., YU T. A., CHENG Y. H., YEH S. D. 1996. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of petioles of *in vitro* propagated multishoots. *Plant Cell Reports* 15 (7): 459-464.
- ZOBAYED J. ARMSTRONG W. ARMSTRONG. 2002. Multiple shoot induction and

leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69 (2): 155-165.

http://florawww.eeb.uconn.edu/acc_num/200000003.html

http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/naranjilla_ars.html