

RESPUESTA FENOTÍPICA DE PLÁNTULAS DE LULO (*Solanum quitoense septentrionale*)
A LA INDUCCIÓN DE MUTACIÓN GENÉTICA CON TRIFULARINA.

Miguel Ángel Molina Mendieta

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

BOGOTÁ

2018

RESPUESTA FENOTÍPICA DE PLÁNTULAS DE LULO (*Solanum quitoense septentrional*) A
LA INDUCCIÓN DE MUTACIÓN GENÉTICA CON TRIFULARINA.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO
AGRÓNOMO

AUTOR:

MIGUEL ÁNGEL MOLINA MENDIETA

DIRECTORA:

PHD GLADYS ROMERO PROF. TITULAR U.D.C.A

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

BOGOTÁ D.C.

2018

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi madre Martha Lucia Mendieta y a mi padre William Molina, por su sacrificio y esfuerzo de haberme dado una carrera para mi futuro, por todo el amor y apoyo incondicional que me han dado con cada actividad, proyecto y/o trabajo que hago.

A la doctora Gladys Romero, quien me ha ayudado a formar y me ha brindado todo su apoyo tanto en la vida académica como en la vida personal, quien me ha mostrado lo que es ser un profesional completo lleno de virtudes digno de seguir.

Al doctor Edgar Martínez Granja, por haberme aconsejado en varias ocasiones de mi vida personal, por haber estado pendiente de la evolución del trabajo de tesis y por haberme ayudado a corregir el documento más de una vez.

Al doctor Enrique Darghan, por haberme enseñado y ayudado en el área de estadística, y por enseñarme que la humildad es el valor que hace grande a los profesionales.

A mis amigos Carlos Andrés Gordillo y Oscar Rolando Diaz, por haberme acompañado en mis momentos de melancolía y ayudado de manera física y emocional en la realización del trabajo y por enseñarme lo bonito de ser una persona humilde y sencilla.

A mi novia Alejandra Herrera, quien con su amor, compañía y apoyo me han dado fuerzas para seguir adelante y trabajar de manera honesta respetuosa y humilde en la vida profesional.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCION	7
MARCO TEORICO	9
ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	9
TAXONOMÍA.....	10
MORFOLOGÍA.....	11
IMPORTANCIA Y PRODUCCIÓN MUNDIAL.....	13
PRODUCCIÓN NACIONAL	14
PROBLEMAS FITOSANITARIOS.....	16
MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	17
FUENTES DE VARIABILIDAD	19
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Morfología del lulo <i>Solanum</i> quítoense septentrional (Fuente: Autor, 2018)	12
Gráfica 2. Producción nacional de lulo para el año 2013 (Fuente: DANE, 2014).....	14
Grafica 3. Formación de plantas poliploides a través de infusión mediante el uso de agentes antimitóticos. (a) mitosis normal diploide. (b) inhibición de la mitosis causando tetraploidía. (c) Metafase mitótica ($2n = 2x = 18$). (d) Metafase mitótica poliploide ($2n = 4x = 36$) (Fuente: Roselaine et al, 2012).....	22
Grafica 4. Número de semillas por cada caja de Petri. (Fuente: Autor, 2018)	25
Gráfica 5. Cajas de Petri utilizadas en la investigación. (Fuente: Autor, 2018)	25
Gráfica 6. Plúmulas y radículas de semillas de lulo (Fuente: Autor, 2018).....	26
Grafica 7. Siembra de las semillas en bandejas de germinación de 128 alveolos (Fuente: Autor, 2018).....	27
Gráfica 8. Plántulas en estado de almacigo (Fuente: Autor, 2018).....	27
Gráfica 9. Porcentaje de germinación medidos a los 15 días de incubación.	29
Gráfica 10. Longitud de los cotiledones a los 42 días después de la germinación.	30
Gráfica 11. Datos de variables observadas a los 136 días después de la siembra.....	32
Grafica 12. Comparación de longitud de entrenudos de T0 (Der) y T9(Izq).....	33
Grafica 13. Prueba de comparación de medias (LSD) con ajuste de Bonferroni para cada variable respuesta.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de lulo de importancia agronómica (Medina et al, 2007).	10
Tabla 2. Principales enfermedades para el cultivo del lulo en Colombia (Fuente: Corpoica, 1999).	16
Tabla 3. Principales plagas del cultivo del lulo en Colombia (Fuente: Corpoica, 1999).....	17
Tabla 4. Tratamientos empleados en la investigación según los niveles de cada factor	24
Tabla 5. Análisis de varianza de las variables respuesta.....	33
Tabla 6. Tratamientos generados a partir de la interacción de tiempo con dosis.....	34

INTRODUCCIÓN

El lulo (*Solanum quítoense*) es una especie de la familia de las solanáceas cuyo centro de origen se encuentra a lo largo de la región de los andes tropicales ocupada por Colombia, Ecuador y Perú. Con argumentos genéticos y lingüísticos, se considera que el único centro de origen del lulo (*Solanum quítoense*) es Colombia (Lobo, 1991).

El lulo es una fruta que se siembra desde Perú hasta México debido a que posee una alta demanda en los mercados nacionales e internacionales por sus características y propiedades nutricionales, su potencial para el sector agroindustrial y por la cantidad de productos derivados que se pueden obtener de él como pulpas de frutas, entre otras (ICA, 2011).

Colombia al ser parte del centro de origen del lulo, posee una amplia oferta ambiental para el cultivo, lo que es una característica importante debido a que puede hacer del lulo un cultivo competitivo tanto en el mercado nacional como en el mercado internacional. Esta característica lo hizo tener en cuenta en el acuerdo de competitividad de productos hortofrutícolas promisorios exportables en Colombia (Pinzón, 2003).

En Colombia el lulo es un cultivo muy importante debido a que es el sustento de varias familias y generadora de empleo nacional, especialmente en los departamentos de Nariño, Huila, Antioquia y Boyacá, en donde de las aproximadas 8372 hectáreas cultivadas, el 74% pertenece a familias campesinas y el 26% a sectores empresariales, en donde se cultiva en mayor proporción el lulo de castilla (*Solanum quítoense quítoense*) que es una especie que no posee espinas, el lulo la selva (Híbrido *S.hirtum x S quítoense*) resistente al cáncer bacterial y al nematodo *Meloidogyne incognita* y el lulo nacional (*Solanum quítoense septentrional*) que es una especie que posee espinas (Angulo, 2006; DANE, 2014).

El promedio de producción en los países donde se siembra lulo (Ecuador, Costa Rica y Perú) es de 27 ton/ha, mientras que en Colombia es de 8.2 ton/ha debido a la diversidad de problemas fitosanitarios que presenta el cultivo, la escasa investigación y tecnología del cultivo, la siembra de semilla sexual con alta variabilidad genética y la falta de materiales cultivables con características óptimas (DANE, 2004). Estos problemas hacen que la planta no pueda explotar su máximo potencial genético y haciendo que el productor tenga la necesidad de adquirir más agroquímicos, lo que generará un aumento en sus costos disminuyendo su productividad.

La herramienta más económica y amigable con el medio ambiente que puede solucionar estos problemas de productividad que impiden que los productores colombianos de lulo sean competitivos en un mundo cada vez más globalizado, que exige que las regiones agrícolas sean más competitivas es el mejoramiento genético, rescatando características de interés agronómico en las especies comerciales y/o generando variabilidad genética para aumentar los recursos genéticos de la especie y así poder diseñar más planes de fitomejoramiento en el futuro (Angulo, 2008 ; Estrada, 1992).

Puesto que el lulo es una especie semileñosa posee un ciclo de vida largo (10 meses para obtener la primera cosecha), por lo que realizar mejoramiento genético con métodos convencionales requiere de mucho tiempo. Para generar recursos genéticos a corto plazo se puede utilizar la técnica de la mutación genética mediante el uso de la radiación o de agentes antimutagénicos como la triflutarina, que es una molécula que se usa en la elaboración de herbicidas, causando fuertes anomalías en las plantas, especialmente en zonas con alta actividad meristemática (Novak, 1992).

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de diferentes dosis de triflutarina y diferentes tiempos de reacción en plántulas de lulo (*Solanum quitoense septentrional*) con la intención de generar recursos genéticos para futuros trabajos de Fitomejoramiento.

MARCO TEORICO

ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El lulo (*Solanum quítense* Lam) es una perteneciente a la familia de las solanáceas, originaria de la zona tropical de la cordillera de los Andes cuyo territorio abarca 3 países que son Colombia, Ecuador y Perú, siendo el centro primario de diversificación (Lobo, 1991).

El lulo tiene entre 11 y 13 especies populares de las cuales 8 se encuentran en Colombia. Las especies más cultivadas son: el lulo de castilla (*Solanum quítoense quítoense*), que es una especie que no posee espinas y es originaria de Ecuador, el lulo colombiano (*Solanum quítoense septentrional*), que es una variedad que posee espinas en todos los órganos de la planta y el lulo la selva, que es un híbrido resultante del cruzamiento entre la especie lulo de perro *Solanum hirtum* y el lulo de castilla (*Solanum quítoense quítoense*) realizado en Colombia (Heiser y Anderson, 1999; Lobo, 2007). Las especies que presentan mayor número de características de plantas silvestres se encuentran en Colombia, haciendo pensar que Colombia es el principal centro de origen del lulo (Muñoz, 2010; Lobo, 2007).

TAXONOMÍA

El lulo (*Solanum quitoense* Lam) es una especie que pertenece a la familia de las solanáceas, del género *Solanum* y a la sección *Lasiocarpa*, en donde se puede encontrar entre 11 y 13 especies de importancia que se distribuyen en Colombia, Ecuador y Perú, que son el centro de diversificación de la especie (Whalen *et al*, 1981; Heiser y Anderson, 1999; Medina *et al*, 2007).

Se ha descubierto la presencia de un taxón en el continente asiático (*Solanum ferox*) y la presencia de algunos taxa en las Guayanas, en la amazonia brasilera y otras secciones de importancia para el mejoramiento genético como se ve en la [Tabla 1](#) (Medina *et al*, 2007).

Tabla 1. Especies de lulo de importancia agronómica (Medina *et al*, 2007).

Especie	Sección	ACCES. N°	País	Deptos. Colombia
<i>Solanum quitoense</i> var <i>septentrionale</i>	<i>Lasiocarpa</i>	48	Colombia	Antioquia, Boyacá, Caldas, Caquetá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Nariño, Norte Santander, Putumayo, Santander, Valle
<i>Solanum quitoense</i> var <i>septentrionale</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	Costa Rica	
<i>Solanum quitoense</i> var <i>septentrionale</i>	<i>Lasiocarpa</i>	4	Holanda JBN*	
<i>Solanum quitoense</i> var. <i>quitoense</i>	<i>Lasiocarpa</i>	4	Colombia	Antioquia, Cauca, Putumayo
<i>Solanum hirtum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	Colombia	Santander
<i>Solanum hirtum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	4	Venezuela	
<i>Solanum hirtum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	1	Holanda	
<i>Solanum pseudolulo</i>	<i>Lasiocarpa</i>	29	Colombia	Antioquia, Chocó, Nariño, Putumayo, Tolima, Valle
<i>Solanum pseudolulo</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	Costa Rica	
<i>Solanum pseudolulo</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	Holanda JBN*	
<i>Solanum vestissimum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	Colombia	Antioquia, Tolima
<i>Solanum pectinatum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	1	Colombia	Meta
<i>Solanum pectinatum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	1	Holanda JBN*	
<i>Solanum sessiliflorum</i>	<i>Lasiocarpa</i>	1	Colombia	Antioquia
<i>Solanum ferox</i>	<i>Lasiocarpa</i>	2	India JBN* CH**	
<i>Solanum capsicoides</i>	<i>Acanthophora</i>	4	Colombia	Antioquia, Caldas, Quindío, Valle
<i>Solanum gilo</i>	<i>Oliganthes</i>	1	Brasil	
<i>Solanum mammosum</i>	<i>Acantophora</i>	2	Colombia	Antioquia, Valle
<i>Solanum marginatum</i>	<i>Melongena</i>	2	Colombia	Boyacá, Cundinamarca
<i>Solanum atropurpureum</i>	<i>Acanthophora</i>	1	Colombia	Antioquia

* JBN: Jardín Botánico de Nijmegen ** CH: Charles Heiser

MORFOLOGÍA

- Raíz: La raíz del lulo es una raíz pivotante, lo que significa que posee una raíz principal gruesa que permite su anclaje al terreno donde se encuentre y de esta raíz principal crecen por los lados raíces secundarias que son las encargadas de absorber los nutrientes del suelo; Por lo general penetra hasta 50 cm de tierra y posee un gran desarrollo de raíces secundarias y/o laterales.
- Tallo: Es un tallo cilíndrico semileñoso con gran cantidad de tricomas, la presencia de espinas puede variar según la variedad siendo la (*Solanum quitoense quitoense*) la variedad que no posee espinas, mientras que la variedad (*Solanum quitoense septentrional*) posee gran cantidad de espinas a lo largo de su tallo (Heiser *et al*, 2005).

El tallo se encuentra ramificado desde el suelo y según el material puede tener de 3 a 4 ramificaciones laterales que ayudan a sostener toda la parte aérea de la planta.

Estas ramas se distribuyen de forma radial y cada una de ellas puede presentar diámetros de hasta 5cm. Cuando las ramas son jóvenes son de coloración verde y generalmente son suculentas, mientras que las ramas viejas presentan una coloración café y se vuelven completamente leñosas a través del tiempo (Lobo, 1991).

- Hojas: Presenta hojas alternas de forma oblongo-ovalada que por lo general son de color verde oscuro por el haz, verde claro por el envés y presenta gran contenido de tricomas.

La presencia o ausencia de espinas se evidencia según la variedad que se esté trabajando, al igual que pasa con el tallo.

La mayoría de las nervaduras presenta un color morado debido a la cantidad de antocianinas acumuladas en esta parte de la hoja como método de defensa contra ataques de plagas y enfermedades.

Las hojas se encuentran adheridas a las ramas mediante un peciolo largo que presenta altos contenidos de tricomas y suelen tener 15cm de largo, mientras que la hoja suele tener 50cm de largo y 35 cm de ancho (Heiser *et al*, 2005).

- Semilla: La semilla es lisa, redonda muy similar a una lenteja muy pequeña.

Un fruto puede llegar a tener 1000 semillas, en donde los frutos más pesados tendrán las semillas más pesadas y por ende las mejores plantas en caso de realizar la siembra de estas.

En la [gráfica 1](#) se puede observar la imagen de cada uno de los órganos de la planta de lulo (*Solanum quitoense*) (Gobernación del departamento del Huila, Colombia, 2006; CORPOICA, 1999; Lobo, 1991).



Grafica 1. Morfología del lulo *Solanum quitoense septentrional* (Fuente: Autor, 2018)

IMPORTANCIA Y PRODUCCIÓN MUNDIAL

El mercado mundial de las frutas tropicales y exóticas, dentro de las que encontramos al lulo, crece con el paso de los años debido al contenido y a la diversidad nutricional que presentan cada una de ellas, en un mundo en donde el cuidar los hábitos alimenticios y mejorar la salud está de moda (Muñoz, 2010).

Estos frutales son considerados una alternativa para mejorar la salud y para mejorar la calidad de vida de quienes la producen, puesto que como son frutales que en su mayoría se cultivan en la zona tropical de América latina, el precio de estos en el mercado europeo es elevado, lo que es una buena oportunidad de mercado para los productores de lulo.

El lulo se cultiva desde el norte de Perú hasta el sur de México, en donde Ecuador, Colombia y Perú son los países con más producción en su orden mencionado, siendo un cultivo importante en la economía familiar campesina que en Colombia es de aproximadamente de 12.000 familias y en Ecuador de 19.000 (Fontagro, 2006).

La demanda del producto es elevada, especialmente en los países productores, lo que permite encontrar mercados de interés y la oferta ambiental ideal para obtener buenos rendimientos e ingresar a mercados internacionales para mejorar la economía local. (Muñoz, 2010; Muñoz, 2011; Lobo, 2009).

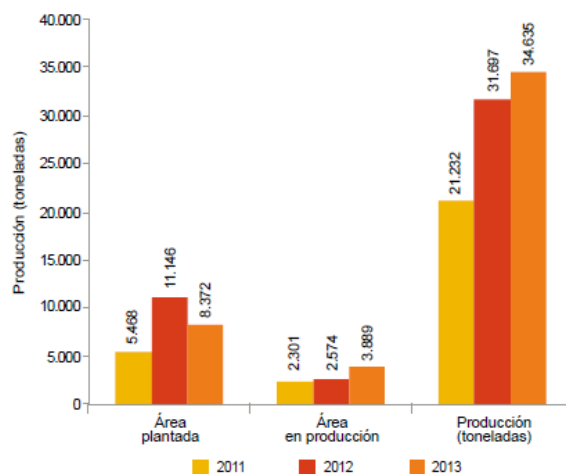
Las variedades más cultivadas son el lulo de castilla (*Solanum quitoense quitoense*), que es una variedad originaria de Ecuador y representa la mayor parte de la producción en Ecuador; el lulo la selva, que es un híbrido obtenido en Colombia mediante el cruzamiento de *Solanum hirtum* x *Solanum quitoense quitoense*, la variedad nacional colombiana (*Solanum quitoense septentrional*),

y algunos ecotipos de diferentes zonas que se siembran bajo el nombre de lulo de castilla (Lobo *et al*, 2007).

PRODUCCIÓN NACIONAL

En Colombia, el área total establecida de cultivo es de 8.372 Ha, en donde 3.889Ha se encuentran en etapa productiva con una producción promedio de 8.87 ton/Ha ([Grafica 2](#)), comparado con el promedio de producción internacional que es de 27 ton/Ha (Muñoz, 2011; DANE, 2014).

El departamento con mayor producción fue el Huila con 18.357 Ton, seguido de los departamentos de Boyacá, Magdalena y Santander, en donde se ha presentado una reducción del área plantada para el año 2014 (DANE, 2014).



Gráfica 2. Producción nacional de lulo para el año 2013 (Fuente: DANE, 2014).

Las variedades más cultivadas en Colombia son el lulo la selva, que es la única variedad trabajada en mejoramiento genético en el país, el cual presenta una resistencia al nematodo *Meloydogine* y a la bacteria *Calvibacter michiganense*; El lulo de castilla (*Solanum quítoense quítoense*), que es la variedad más conocida en el mercado, destacándose por la coloración marrón de la pulpa y de no poseer espinas y la variedad nacional (*Solanum quítoense septentrional*) que es la variedad que posee espinas y un jugo de mayor agrado para los consumidores de esta (Muñoz, 2011; Lobo, 2007).

En Colombia el lulo es generador de empleo cuya mano de obra que se distribuye en un 40% familiar, 30% contrato y 20% contrato-familiar, siendo sustento de 12.000 familias campesinas tradicionales que representan el 74% de los productores de lulo en el país, mientras que el 26% restante pertenece al sector empresarial (Angulo,2008; Franco, 2002).

La falta de investigación y la escasa tecnología amenazan su sostenibilidad, impidiendo que la planta exprese su máximo potencial genético y se puedan obtener mejores rendimientos que aumenten la productividad, ya que los mayores rendimientos del cultivo son directamente proporcionales a la cantidad de área de cada productor y no a la productividad y competitividad de cada uno (Angulo, 2008; DANE, 2014, Muñoz, 2011).

Colombia cuenta con una oferta ambiental amplia para el lulo, lo que puede hacer de él un cultivo competitivo en un mundo que cada vez es más globalizado que genera mayor competencia entre productores, exigiendo que las regiones agrícolas cada vez sean más competitivas (Angulo, 2008).

PROBLEMAS FITOSANITARIOS

La producción de lulo está muy limitada por un complejo de aproximadamente 18 enfermedades y 12 plagas (Tabla 2), destacando algunas enfermedades como *fusarium sp* y *phytophthora* que son las más limitantes en el país y en donde se ha llegado a encontrar lotes infestados con pérdidas de hasta el 100% del cultivo (CORPOICA, 1999).

Tabla 2. Principales enfermedades para el cultivo del lulo en Colombia (Fuente: Corpoica, 1999).

Enfermedad	Agente Causal
Tizón del Lulo	<i>Phytophthora infestans</i>
Pudrición Algodonosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Antracnosis	<i>Glomarella cingulata</i>
Fusariosis	<i>Fusarium oxysporum</i>
Amarillamiento por Verticillium	<i>Verticillium albo-atrum</i>
Pudrición de tallo	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Chancro del tallo	<i>Pythium sp.</i>
Clorosis por armillaria	<i>Armillaria</i>
Mancha negra de los tallos	<i>Phoma</i>
Mancha clorótica de la hoja	<i>Colletotrichum</i>
Mancha de alternaría	<i>Alternaria</i>

Marchitez bacterial	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Cáncer bacterial	<i>Clavibacter michiganense</i>
Pudrición del fruto	<i>Erwinia</i>
Pudrición medular	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Virus de la hoja pequeña	
Nemátodo del lulo	<i>Meloidogyne</i>

Tabla 3. Principales plagas del cultivo del lulo en Colombia (Fuente: Corpoica, 1999).

Nombre Común	Nombre científico
Barrenador del tallo	<i>Faustinus Sp</i>
Picudo de la flor	<i>Anthonomus sp</i>
Gusano perforador	<i>Neoleucinodes elegantalis</i>

MEJORAMIENTO GENÉTICO

El único material mejorado a disposición para los productores colombianos es el cultivar “La Selva”, que fue el resultado de un cruzamiento entre el lulo de perro *Solanum hirtum* y el lulo de castilla *Solanum quitoense quitoense*, el cual presenta una buena adaptación a directa luz solar, periodos de cosecha prolongados, alta productividad y resistencia a *Meloidogyne incognita* raza 2 y *Fusarium oxysporum* (Lobo, 2009; Tamayo et al, 2002).

El CIAT llevo a cabo un proceso de mejoramiento genético participativo con los agricultores del norte del Cauca debido a las diversas variedades de lulo que se siembran en esa región, se recolectaron y se clonaron los materiales para su evaluación (Lobo, 2004).

Se han realizado estudios relacionados con domesticación y ampliación de la base genética del taxón del lulo, como es el caso del híbrido obtenido por Heiser y Lobo llamado “La Selva”, puesto que diversos estudios han mencionado y recomendado la siembra de varias especies sin tener en cuenta una adecuada selección de los materiales y sin haber analizado el ambiente óptimo en el que se desarrolló cada variedad (Calvo, 1972; Chacón *et al*, 1996; Comunagro, 2003).

Se realizaron 3 procesos de colecta de lulo y taxas en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Huila, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Tolima y Valle del cauca, en donde gran parte del material genético adquirido se almacena en bancos de germoplasma, en donde luego se realizaron diversos estudios en caracterización y evaluación de cada una de las variedades obtenidas (García, 1985; Torres, 1992; Giraldo y Gil, 2004; lobo, 2007).

El mejoramiento genético de lulo tiene como objetivo buscar resistencia a enfermedades, calidad de fruta y otras características de importancia agronómica que ayuden a mejorar la productividad de las familias campesinas que dependen de la producción de lulo y para mejorar la productividad de los cultivos con lulo ya establecidos, generando un impulso nuevo en las personas para abrir la oportunidad a nuevos mercados internacionales y mejorar la calidad de vida de los productores (Muñoz, 2011).

Es necesario, para poder cumplir con los objetivos del mejoramiento genético en lulo, explorar que nuevos taxones o especies pueden ser tenidas en cuenta para mejoramiento genético, evaluar y

caracterizar la totalidad de las variedades de interés agronómico y generar más variabilidad genética (Angulo, 2008; Muñoz, 2011; Lobo, 2007).

FUENTES DE VARIABILIDAD

Como fuentes tradicionales de variabilidad tenemos la hibridación sexual y la mutagénesis. Para la mutagénesis es necesario el uso de agentes físicos y/o químicos, como la triflutarina y/o la radiación, que provoquen cambios genéticos en la estructura cromosómica, aumentando la probabilidad de duplicar el contenido cromosómico logrando causar una mutación genética que pueda generar una especie con características de interés agronómico.

Las mutaciones genéticas, que en la mayoría de los casos se debe a una duplicación del número de cromosomas que posee se pueden dar de dos maneras: La primera se da de forma natural, en donde en la mayoría de los casos puede tardar varios años, incluso hasta siglos; Por otra parte, está la artificial y/o espontánea, que se da mediante la aplicación de diferentes agentes antimetabólicos como por ejemplo la colchicina, triflutarina, pronamida, amíprofos metil, entre otros (Kostoff, D, 1939), que pueden aplicarse en medio *in vitro* o *ex vitro* en semillas o plántulas haploides de una especie vegetal que se desee trabajar.

La variación genética y la diversidad de las plantas está basada principalmente en las mutaciones genéticas, las variedades de cada especie e híbridos obtenidos en la actualidad provienen del uso de algún material de importancia agronómica que mutó de forma natural en algún momento a través del tiempo, adquiriendo características diferentes a su población de la que provino (Cubero, 2013).

Las tasas de mutación natural son bajas y requieren de bastante tiempo para que ocurran, mientras que con la mutagénesis artificial se puede obtener una tasa tan alta como se desee teniendo en

cuenta la relación clásica de dosis con tiempo de reacción para evitar generar tantas mutaciones en el individuo que cause su muerte (Heiser *et al*, 2005; Casimiro *et al*, 2009).

Los agentes antimitóticos son moléculas que impiden el correcto funcionamiento de la mitosis en plantas, con el fin de duplicar los cromosomas de una determinada especie vegetal obtenida por embriogénesis gamética y/o hibridación, para restaurar el nivel de ploidía original (doble haploides), volviéndola una especie fértil que puede ser usadas en futuros planes de mejoramiento.

La función de la mayoría de los agentes antimitóticos es la misma, que es impedir que se dividan los cromosomas mediante la mitosis. No obstante, no todas las plantas reaccionan de la misma manera a los diferentes agentes antimitóticos, por lo que el agente ideal deberá ser simple y rápido de aplicar, eficiente y no deberá producir problemas fisiológicos ni otro tipo de alteraciones genéticas que afecten de manera negativa la investigación.

Existen diferentes metodologías para aplicar los agentes antimitóticos; sin embargo, lo que garantiza el éxito de la investigación depende del medio de cultivo empleado (en caso de ser *in vitro*) o del sustrato, del tipo de explantes que se desee utilizar (Semillas, plántulas, brotes, callos, embriones cigóticos y somáticos, segmentos nodales), el tipo de agente antimitótico, el tiempo de exposición de los explantes en el agente y la concentración del mismo (Pintos *et al*, 2014; Cubero, 2013; Novak y Brunner, 1992).

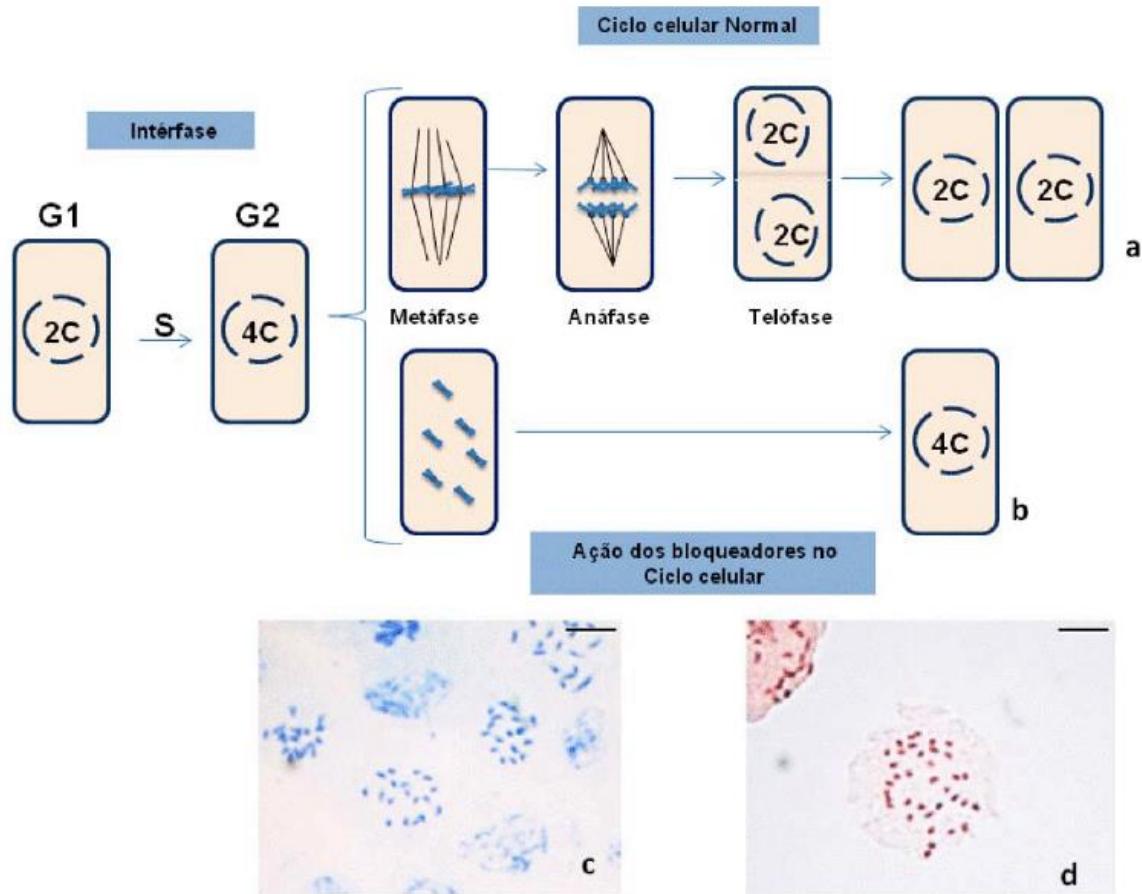
La concentración de cada agente antimitótico es diferente, puesto que hay algunos agentes que son más fuertes que otros, como por ejemplo la colchicina, en donde deben usarse dosis muy bajas para la inducción a mutagénesis. Esta mutación ocurrirá totalmente al azar y no se sabrá cual será el resultado ni la respuesta que expresaran las plantas sometidas al tratamiento (Cubero, 2013).

Luego de la correcta aplicación de los agentes antimitóticos, se obtendrá como resultado plantas completamente homocigotas diploides (si la inhibición de la mitosis ocurre en una especie haploide) y/o poliploides con el doble de material genético que se podrán usar en futuros plantas de mejoramiento genético (Gráfica 3), puesto que la poliploidía es una fuerza evolutiva que ha causado la aparición de cientos de especies de importancia agronómica y que por lo general, son plantas que son más eficientes fisiológicamente debido a que al tener mayor contenido de ADN generan una mayor cantidad de proteínas y un mayor tamaño de la célula que reduce los espacios intercelulares generando una resistencia natural a los problemas fitosanitarios (Pintos, *et al.* 2014).

A la fecha se han lanzado mas de 2700 variedades mutantes de plantas al mercado, las mas representativas de ellas son los cereales, los tubérculos y las plantas ornamentales; un ejemplo de estas es la variedad mutante de cebada desarrollada en Perú que crece por encima de los 5.000 m.s.n.m representando el 52% del aumento del rendimiento total entre 1978 y 2002; las variedades de arroz mutantes que se siembran a lo largo del rio Mekong en Vietnam resistentes a la salinidad, con una producción de 3 cosechas por año y alta calidad de grano, representando en cifras el ingreso adicional de 300 millones de dólares por año para los agricultores de Vietnam y por ultimo la variedad mutante de pera nijisseiki que posee mejores características organolépticas que las peras tradicionales (FAO *et al.*, 2008).

En lulo *Solanum quítoense*, Heiser *et al* (2005) obtuvieron una variedad mutante tetraploide a partir de 2 híbridos diploides casi estériles (*Solanum quítense lamark* x *Solanum sessiflorum* Dunal y *Solanum quítense* x *Solanum sessiliflorum* geogicum) sometidos a diferentes dosis de colchicina en la universidad de Indiana en Estados Unidos. Esta variedad mutante presenta características como mayor altura de la planta, diámetro del tallo, mayor área foliar, mayor número de semillas y mayor viabilidad de polen que las variedades híbridas diploides, aportando de esta manera a los

recursos genéticos de la especie para futuros planes de mejoramiento genético en *Solanum quitoense*.



Grafica 3. Formación de plantas poliploides a través de infusión mediante el uso de agentes antimitóticos. (a) mitosis normal diploide. (b) inhibición de la mitosis causando tetraploidía. (c) Metáfase mitótica ($2n = 2x = 18$). (d) Metáfase mitótica poliploide ($2n = 4x = 36$) (Fuente: Roselaine *et al*, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de ciencias de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A bajo condiciones semicontroladas de Fitotron, ubicada en la ciudad de Bogotá, localidad de Suba, con coordenadas de 4°47' latitud norte y 74°02' oeste a una altura de 2600 m.s.n.m.

La especie que se trabajó en la investigación correspondió al lulo nacional "*Solanum quitoense septentrionale*" y como agente mutagénico se utilizó la triflutarina en diferentes concentraciones.

El diseño estadístico empleado fue un diseño factorial completo de efectos fijos completamente al azar desbalanceado, en donde se aplicó diferentes concentraciones de triflutarina (100, 250 y 500 ppm) a tres diferentes tiempos de exposición (24, 28 y 44 horas) para un total de nueve tratamientos más un testigo con 200 repeticiones, para un total de 2000 unidades experimentales iniciales (Tabla 4). Se utilizó un intervalo de confianza del 98% con corrección de Bonferroni, usando como software estadístico la versión 3.4.4 del programa R.

Las semillas de *Solanum quitoense septentrionale* se depositaron en cajas de Petri estériles de 60mm X 15mm en grupos de 50 semillas (Grafica 4), de modo que cada tratamiento quedo con 4 cajas de Petri (teniendo en cuenta las 200 repeticiones por cada tratamiento); las cajas de Petri contenían un papel filtro del tamaño de la caja para ayudar a retener la humedad y favorecer la germinación; a cada caja de Petri se le agregó 4ml de agua destilada, se dejaron germinando a una temperatura de 21°C.

Se preparó una solución madre de trifularina a 500ppm, usando etanol al 5% como solvente y a partir de esta concentración se hicieron las concentraciones de trabajo de 100 y 250 ppm.

Tabla 4. Tratamientos empleados en la investigación según los niveles de cada factor

		Factor 1 "Tiempos de reacción"		
		24 horas	28 horas	44 horas
Factor 2 "Dosis de trifularina"	100 ppm	R1	R1	R1
		R2	R2	R2
	
		R200	R200	R200
	250 ppm	R1	R1	R1
		R2	R2	R2
	
		R200	R200	R200
	500 ppm	R1	R1	R1
R2		R2	R2	
...		
	R200	R200	R200	

La inducción a mutación genética se obtuvo a partir de las semillas pregerminadas (con emisión de radícula) de lulo nacional *Solanum quitoense septentrional* en infusión a tres concentraciones de trifularina (100, 200 y 500 ppm) y a tres tiempos de exposición (24, 28 y 44 horas), se aplicó la solución de trifularina dependiendo de cada tratamiento y se retiró según cada tiempo de exposición (Gráfica 5).



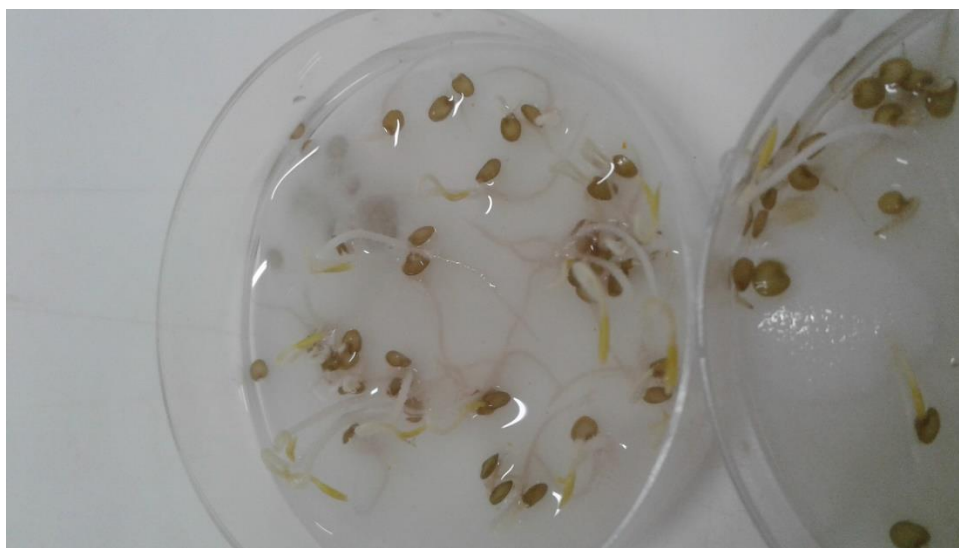
Gráfica 4. Número de semillas por cada caja de Petri. (Fuente: Autor, 2018)



Gráfica 5. Cajas de Petri utilizadas en la investigación. (Fuente: Autor, 2018)

Luego de retirar la solución se lavaron las semillas con agua destilada durante 5 minutos y se cambiaron los papeles filtro para asegurar que la trifularina se haya retirado completamente, una vez realizado el lavado las semillas se dejaron en incubación nuevamente hasta que se observara plúmulas y radículas bien definidas para luego ser llevadas a bandejas de germinación.

Se espero a que las semillas de lulo presentaron plúmula y radícula bien definidas (15 días calendario) ([Gráfica 6](#)), se sembraron las semillas en bandejas de germinación de 128 alveolos con un sustrato compuesto de turba y vermiculita a una relación de 2:1. En esta fase se midió el porcentaje de supervivencia, la longitud de los cotiledones, la altura de las plántulas y el número de hojas, las longitudes se midieron con un calibrador pie de rey.



Gráfica 6. Plúmulas y radículas de semillas de lulo (Fuente: Autor, 2018).



Grafica 7. Siembra de las semillas en bandejas de germinación de 128 alveolos (Fuente: Autor, 2018).

A los 65 días después de la siembra en semillero, las plántulas se trasladaron a bolsas de polietileno (9cm x 18cm) con un sustrato compuesto de tierra negra proveniente de un andisol, compost y cascarilla de arroz a una relación 3:1:1, en donde se mantuvieron bajo condiciones de vivero con una poli sombra (50%). En esta etapa se midió longitud de entre nudos, longitud y ancho de las hojas, altura de la plántula y número de hojas ([Gráfica 8](#)).



Grafica 8. Plántulas en estado de almacigo (Fuente: Autor, 2018).

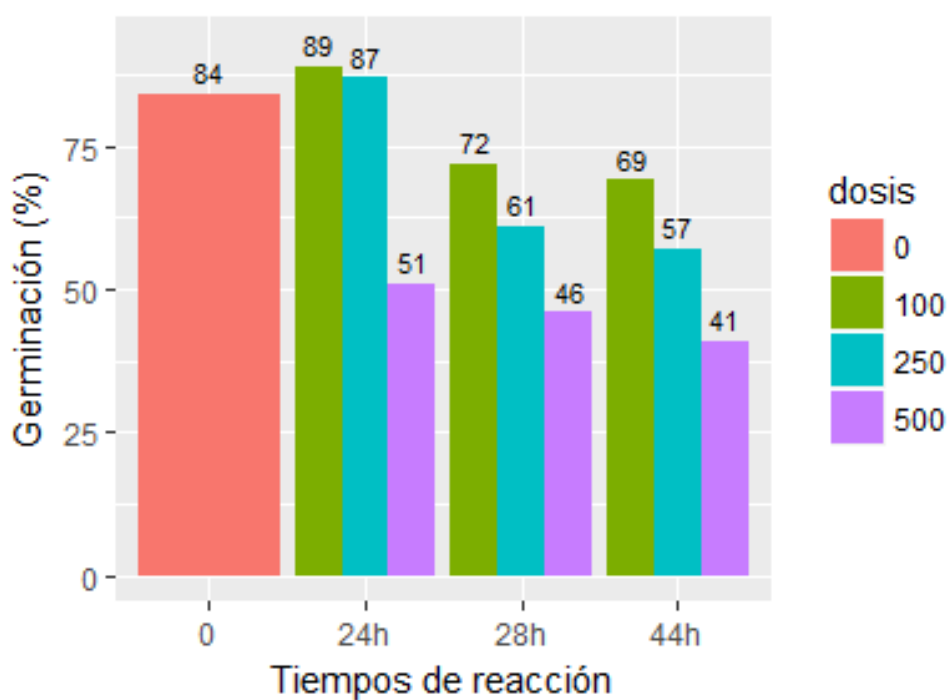
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la [gráfica 9](#) se puede observar que, para el porcentaje de germinación, las semillas de lulo respondieron mejor a las concentraciones de 100 y 250ppm de trifularina en todos los tiempos de reacción, siendo superiores al tratamiento testigo, mientras que la concentración de 500ppm en los 3 tiempos de reacción causó un daño severo en las semillas, inhibiendo la germinación considerablemente.

Esto puede ser explicado debido a que la trifularina es un herbicida inhibidor de la mitosis que actúa en meristemos de crecimiento, específicamente en órganos subterráneos y semillas, en donde altas concentraciones de este herbicida pueden inhibir completamente la mitosis de las células pudiendo llegar a causar la muerte (Cubero, 2013; Imery, 2001; Deuber, 1992).

Los resultados positivos de las dosis de 100 y 250 ppm para 24 horas de reacción se pueden comparar con los resultados encontrados por Goufeng Liu *et al* (2007), quienes obtuvieron plantas tetraploides de *Platanus acerifolia* luego de someter las semillas a dosis de colchicina (la cual tiene un efecto similar al de la trifularina, inhibiendo el huso acromático de las células en metafase), las dosis más bajas fueron las que generaron mayores anomalías en el genoma de las plantas, en donde al inhibir la mitosis, las nuevas células con el doble de material genético causaron que las plantas de *Platanus acerifolia* fenotípicamente presentaran ventajas fisiológicas, como mayor área foliar y crecimiento más compacto.

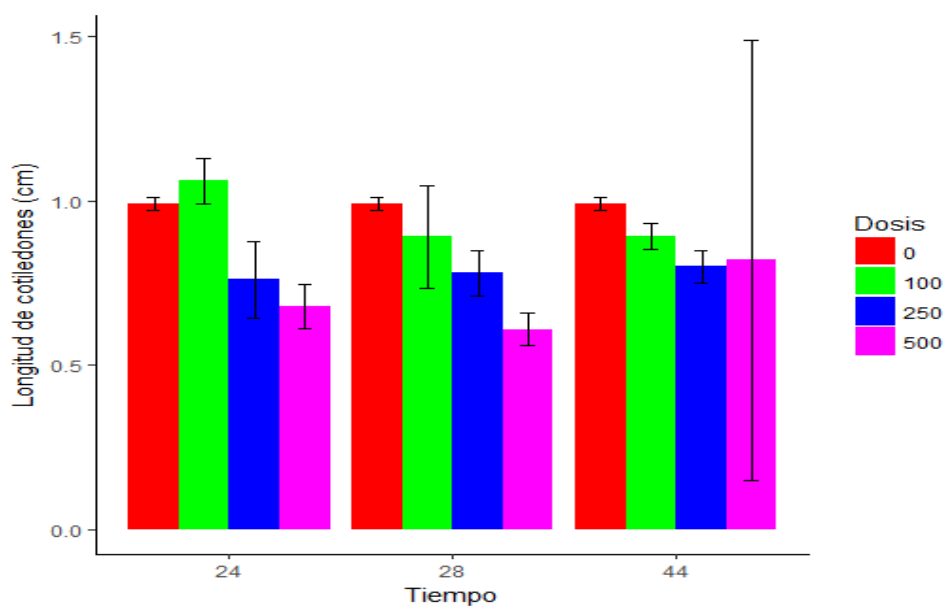
Dado que para todas las dosis de trifluralina y para todos los tiempos de reacción de las semillas de lulo con las dosis, el porcentaje de germinación fue menor al 90%, siendo más significativo para las concentraciones de 500ppm quienes presentaron un porcentaje de germinación menor al 40%, esta diferencia del porcentaje de germinación en cada una de las dosis y en cada uno de los tiempos de reacción fueron las que causaron que el diseño experimental se volviera un diseño desbalanceado.



Gráfica 9. Porcentaje de germinación medidos a los 15 días de incubación.

Para la longitud de los cotiledones medidos a los 42 días después de la siembra en bandeja, la interacción de la dosis con el tiempo de reacción no fue significativa, por lo que se concluirá cada factor por separado.

El factor tiempo de reacción no presentó diferencias significativas, mientras que el factor dosis presentó un P-valor $> 2.2e-16$, en donde se puede observar que a medida que aumenta la concentración de triflurarina, el tamaño de los cotiledones disminuye, teniendo una relación inversamente proporcional, concordando de esta manera con lo mencionado por Novak y Brunner (1992), en donde afirman un posible estrés en la planta mediante el uso de elevadas concentraciones de agentes antimetabólicos como la triflurarina (gráfica 10).



Gráfica 10. Longitud de los cotiledones a los 42 días después de la germinación.

Los mayores valores de longitudes de cotiledones correspondieron al tratamiento testigo con un promedio de 0.99cm, a excepción del tratamiento 1 compuesto de 100 ppm de trifluralina a 24 horas de exposición con un promedio de 1.05 cm siendo superior al testigo, al tener esta ventaja fisiológica de tener mayores reservas nutricionales para iniciar su etapa de plántula se puede esperar que este tratamiento sea el que presente mayores medidas fenotípicas, siendo un tratamiento importante a tener en cuenta.

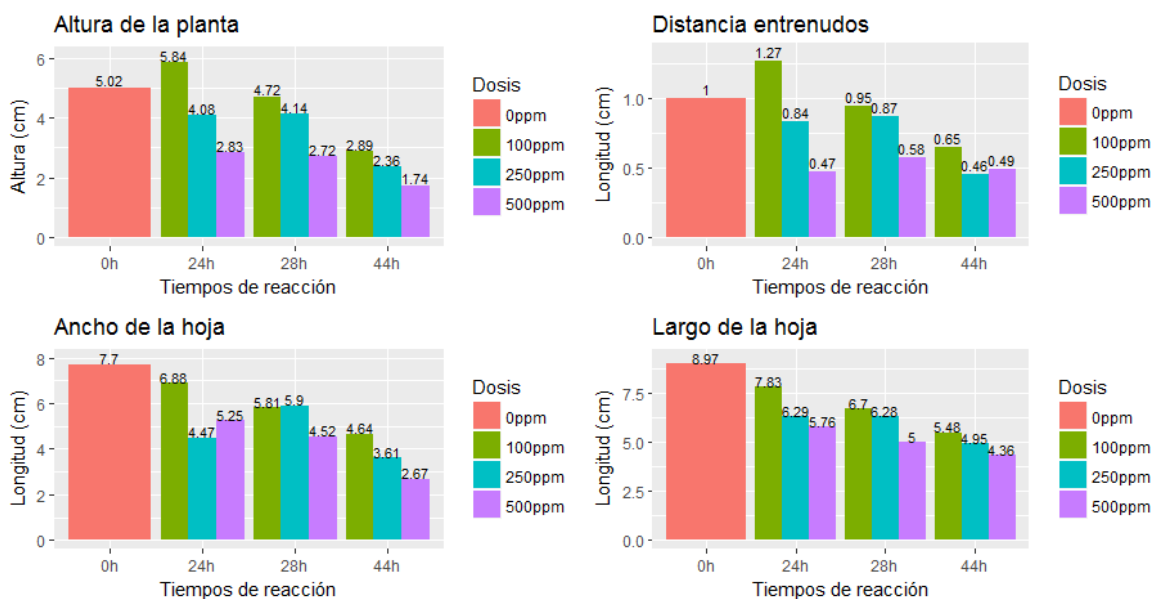
En la [gráfica 11](#) se muestran las medias en centímetros de cada una de las variables respuesta (Altura de la planta, Distancia de entrenudos, Ancho y Largo de la hoja) medidas a los 136 días después del trasplante a almacigo, en donde se observa que el valor de las medias de cada variable respuesta difieren, evidenciando una relación inversamente proporcional del tiempo de reacción y las dosis de trifluralina con las variables respuesta.

Para la altura de la plántula, las plantas sometidas a una dosis de 100 ppm durante 24 horas fueron las más representativas con una media de 5.84 cm, siendo superior al tratamiento testigo que presento una media de 5.02 cm, mientras que las plantas sometidas a una dosis de 500 ppm durante 44 horas fueron las menos representativas con una media de 1.74 cm.

Para la longitud de entrenudos, al igual que la altura de la plántula, las plantas sometidas a una dosis de 100 ppm durante 24 horas fueron las más representativas con una media de 1.27 cm, siendo superior al testigo que presento una media de 1cm, mientras que las plantas expuestas a una dosis de 250 ppm durante 44 horas fueron las menos representativas con una media de 0.46 cm, la diferencia de esta variable respuesta se puede observar en la [Gráfica 12](#).

Los resultados concuerdan con las descripciones realizadas para *Solanum quitoense* por Heiser *et al* (2005), quienes compararon una variedad tetraploide *Solanum indianense* resultante de una

inducción de mutación genética con colchicina contra el lulo común; a nivel de fenotipo, el *Solanum quitoense* posee gran cantidad de espinas, tallos y hojas jóvenes con pigmentaciones moradas, de 6 a 8 nervaduras principales por hoja y gran cantidad de tricomas. Estas características son muy similares a la mayoría de las plántulas de la presente investigación. No obstante, los híbridos tetraploides obtenidos presentaron mayor área foliar, mayor diámetro de tallo y mayor altura, muy similar a lo que ocurre con las plántulas sometidas a una dosis de 100 ppm durante 24 horas las cuales presentan mayor altura y mayor distancia de entrenudos, lo que podría ser un índice de una mutación genética.



Gráfica 11. Datos de variables observadas a los 136 días después de la siembra



Grafica 12. Comparación de longitud de entrenudos de T0 (Der) y T9(Izq).

Tabla 5. Análisis de varianza de las variables respuesta

	<i>Factor</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad (>F)</i>
Altura de la planta	Tiempo	2	207	103.49	108.40	2.20E-16
	Dosis	2	330.3	165.16	172.99	2.20E-16
	Tiempo:Dosis	4	41.3	10.34	10.83	2.23E-08
	Residuales	437	417.2	0.95		
Longitud de entrenudos	Tiempo	2	6.35	3.17	78.12	2.20E-16
	Dosis	2	16.63	8.31	204.54	2.20E-16
	Tiempo:Dosis	4	3.29	0.82	20.23	2.65E-15
	Residuales	437	17.77	0.04		
Ancho de la hoja	Tiempo	2	170.2	85.11	93.77	2.20E-16
	Dosis	2	179.8	89.89	99.03	2.20E-16
	Tiempo:Dosis	4	118.8	29.7	32.72	2.20E-16
	Residuales	437	386.7	0.91		
Largo de la hoja	Tiempo	2	160.0	79.99	68.62	2.20E-16
	Dosis	2	223.8	111.91	96.004	2.20E-16
	Tiempo:Dosis	4	25.9	6.48	5.56	0.00025
	Residuales	437	509.4	1.17		

En la [tabla 5](#) se observa que hay un efecto significativo de la interacción Tiempo de reacción y dosis de trifluralina para altura de la planta distancia de entrenudos Ancho de la hoja y Largo de la hoja Al haber interacción significa que el efecto de un factor depende del nivel de otro factor por lo que no es posible evaluar los 2 factores (Tiempo de reacción y Dosis) por separado.

Una alternativa para poder realizar las pruebas de comparación de medias y poder obtener que combinación de tiempo de reacción con dosis, fue necesario crear tratamientos que contengan todas las combinaciones de los factores, suprimiendo el efecto por separado de cada factor y agrupándolos en tratamientos. Los tratamientos obtenidos a partir de las combinaciones de los tiempos de reacción con las dosis se pueden ver en la [tabla 6](#).

Tabla 6. Tratamientos generados a partir de la interacción de tiempo con dosis.

Horas	Concentración(ppm)	Interacción
24	100	Tratamiento 1
	250	Tratamiento 2
	500	Tratamiento 3
28	100	Tratamiento 4
	250	Tratamiento 5
	500	Tratamiento 6
44	100	Tratamiento 7
	250	Tratamiento 8
	500	Tratamiento 9

Los resultados concuerdan con lo mencionado por Cubero (2013), quien menciona la importancia de analizar conjuntamente los tiempos de exposición de cualquier planta a cierta concentración de

cualquier agente mutagénico, puesto que a mayor tiempo de reacción se espera que el agente mutagénico cause mayor número de alteraciones genéticas sin importar su concentración.

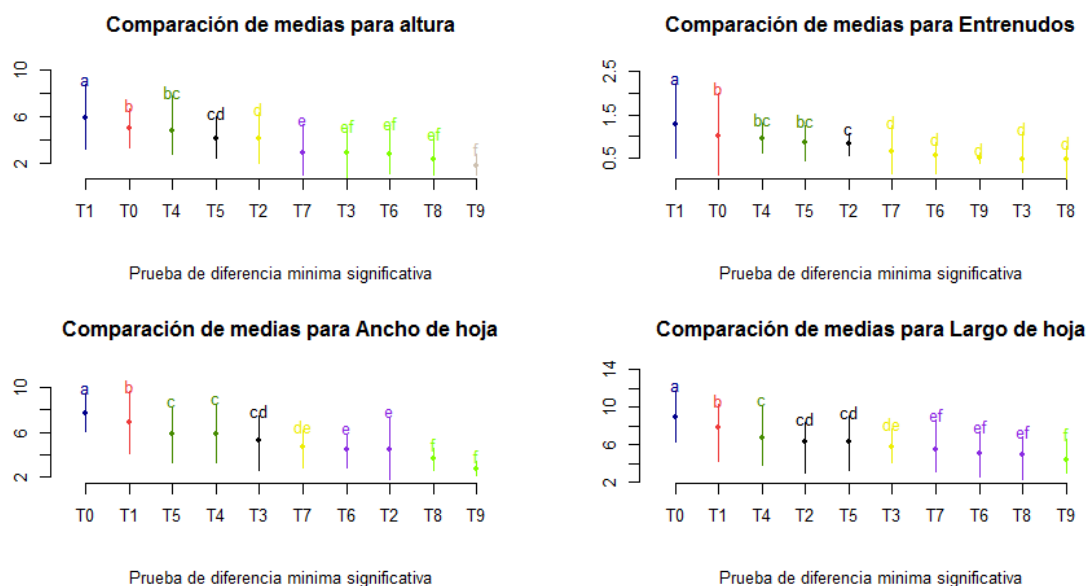
Se realizó una prueba de comparación de medias para cada variable respuesta en función de los tratamientos que contienen la interacción entre tiempo y dosis con un intervalo de confianza inicial del 97% y con un ajuste de Bonferroni, puesto que la probabilidad de cometer el error tipo 1 aumenta con mayor número de tratamientos.

En la [gráfica 13](#) se puede observar el grafico de comparación de medias, en donde para la altura de la planta y la longitud de los entrenudos el tratamiento más significativo fue el T1 (100ppm durante 24 horas) presentando una media de 5.84cm para altura de la plántula y de 1.27cm para longitud de entrenudos siendo superior al tratamiento testigo, esto puede ser explicado debido a que como la trifularina es un agente antimetabólico, pudo haber generado una mutación en el genoma de la planta, duplicando su material genético y permitiendo a la planta una mayor cantidad de proteínas, haciendo que tengan una ventaja fisiológica frente a las plántulas que no tuvieron ninguna exposición (Cubero, 2013; Pintos *etal*, 2012).

Por otra parte, la media más baja para la altura de la plántula correspondió al tratamiento T9 (500 ppm durante 44 horas) siendo estadísticamente diferente (P -valor <0.001) a los demás tratamientos, mientras que para la longitud de entrenudos las medias más bajas correspondieron a los tratamientos T7 (100ppm durante 44 horas), T6(500ppm durante 28 horas), T9(500ppm durante 44horas), T3(500ppm durante 24 horas) y T8 (250ppm durante 44 horas) el cual ninguna de ellas presenta diferencias significativas.

Si bien, la mayoría de las medias poseen la dosis de 500ppm y un tiempo de reacción elevado en interacción con una dosis más baja de trifularina (para el caso del T7 y del T8), esto puede ser

explicado debido a que como la trifluralina es un herbicida que inhibe la mitosis en regiones de alta actividad meristemática (Pintos *et al*, 2012), a medida que aumenta la concentración y el tiempo de reacción aumenta el deterioro de la planta, disminuyendo la frecuencia de mutaciones económicamente útiles y generando plantas con problemas fisiológicos (Novak y Brunner,1992) , mientras que si se usan dosis adecuadas que no superen los umbrales de daño establecidos por Levan (1938) la probabilidad de obtener mutaciones económicamente útiles aumenta, lo que puede explicar que el tratamiento T1(100ppm durante 24 horas) pueda presentar una mutación genética dado que su media es más alta para la longitud de entrenudos y la altura de la plántula que el tratamiento testigo.



Grafica 13. Prueba de comparación de medias (LSD) con ajuste de Bonferroni para cada variable respuesta.

Para las variables ancho y largo de la hoja, el tratamiento más significativo fue el tratamiento testigo, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos con unas medias de 7.7cm para ancho de hoja y 8.97 cm para largo de hoja, mientras que las medias más bajas correspondieron a los tratamientos que fueron sometidos a altas dosis (500ppm) durante prolongados tiempos de reacción (44 horas), como el caso del tratamiento T8 (250ppm durante 44 horas) y T9 (500ppm durante 44 horas).

El ancho y el largo de la hoja son dos variables que presentan una correlación positiva, de modo que mediante regresiones lineales y/o no lineales se puede determinar el área foliar de la hoja (Cabezas *et al*, 2009). Según los resultados, las plántulas que no fueron sometidas a ninguna dosis (por ende, a ningún tiempo de reacción) presentaron mayor área foliar, lo que hace que estas plántulas tengan una ventaja fisiológica que las demás (Azcón, 2012).

Los resultados se pueden comparar con los encontrados por Casimiro *et al* (2009), quienes encontraron que las dosis más bajas de trifluralina, que en este caso fueron de 0.42 y 0.84ppm, presentaban los niveles más significativos de alteraciones cromosómicas, teniendo la mayor cantidad de células polinucleadas en cebolla, mientras que la dosis más alta que fue de 3.34 ppm presentó un índice mitótico bajo debido a que causó en la mayoría de las células un bloqueo total de la mitosis. Esto generó como conclusión que las alteraciones cromosómicas están correlacionadas con las dosis más bajas de trifluralina, estableciendo las concentraciones de 0.42 y 0.84ppm como concentraciones diagnósticas y concordando con casas químicas productoras de trifluralina que dosis mayores a 3.34ppm puede causar la muerte de la planta.

Los resultados en lulo muestran que para la altura de la planta y la longitud de entrenudos son similares a los encontrados por Casimiro *et al* (2009), el cual puede ser explicado puesto que al haber inhibido la formación del huso acromático pudo haber generado metafases poliploides que

hayan fomentado la formación de plantas más eficientes fisiológicamente en la concentración de 100ppm durante 24 horas, que fue la concentración más baja de la investigación en lulo; Por otra parte, todas las dosis de trifularina utilizadas en lulo superaron el umbral de daño de 3.34ppm sin encontrar tasas de mortalidad del 100% y evidenciando diferencias significativas a nivel fenotípico.

CONCLUSIONES

Las dosis y los tiempos de reacción son dos factores que trabajan conjuntamente dada su interacción significativa en el análisis de varianza, por lo que fue necesario crear nuevos tratamientos que contengan la interacción de los diferentes niveles de cada factor.

Se evidenció un efecto negativo de las dosis de trifularina y los tiempos de reacción, en donde a medida que aumentan, los valores de todas las variables respuesta disminuyen, siendo los tratamientos sometidos a dosis de 500ppm y/o a altos tiempos de reacción (44 horas) los menos representativos y los que presentaron mayor tasa de mortalidad.

Para las variables de área foliar (ancho y largo de hoja), el tratamiento con los mayores valores de medias fue el tratamiento testigo, mientras que para la altura de la planta y la longitud de entrenudos el tratamiento más representativo fue el T1 (100ppm durante 24 horas).

Hay suficientes diferencias fenotípicas significativas que justifiquen un estudio citogenético, especialmente en el tratamiento T1 (100ppm durante 24 horas) dado que fue superior al tratamiento

testigo en 2 de las 4 variables respuesta analizadas, que demuestren a nivel cromosómico si hay o no una alteración a nivel de genoma que sea de interés agronómico y económico.

Se recomienda evaluar agronómicamente los tratamientos que presentaron diferencias con el testigo y que posiblemente pueden tener mutaciones, con el fin de identificar características de interés que puedan ser utilizados en un programa de mejoramiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANGULO R.2001. El cultivo del lulo. Colciencias. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 100 págs.
2. AZCÓN J. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Ed Mc Graw Hill (España). 651 págs.
3. BAG. 2012. Genética y mejoramiento vegetal. Rev. Journal of Basic & Applied Genetics. Buenos Aires Argentina. Vol. 23(1). Págs. 228 – 283.
4. BLAKESLEE, A. 1937. Dédoublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. Rev acad Sciences.Paris La France. Ed 205. págs 476 – 479.
5. CABEZAS *et al.* 2009. Un modelo para la estimación del área foliar en tres especies forestales de forma no destructiva. Rev. Actualidad & Divulgación científica. Vol.12 (1). Págs. 121-130.
6. CASIMIRO *et al*, Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of fan aneugenic trifularin. Rev.Ecotoxicology, Vol.72, Págs 1680-1686.
7. CHARANJIT K & HARISH C.K., 2008. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health, International Journal of Food Science & Technology, Vol.36, no. 7, Pags. 703-725.
8. CORPOICA. 1999. Lulo la selva, primer material de lulo mejorado para Colombia.
9. CORPOICA. 2001. Enfermedades del cultivo del lulo en Colombia: Guía de diagnóstico y control. Rionegro. Antioquia. Colombia. Ed. LITOAS. 48 págs.

10. CUBERO J. 2013. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Ed Mundi Prensa (Madrid). 569 págs.
11. DANE. 2004. Documento Maíz tecnificado en Colombia. 13 págs.
12. DANE. 2004. Fondo Nacional de Fomento hortofrutícola y SISAC. Cencos Nacional de 10 frutas agroindustriales y promisorias. Págs. 85-111.
13. DANE. 2014. El cultivo del lulo (*Solanum quítoense*), una fruta agradable y de gran valor nutritivo. Huila (Colombia).
14. ESTRADA I. 1992. Potencial genético del lulo (*Solanum quítoense* Lam) y factores que limitan su expresión. Acta de horticultura. Ed. 310. Págs. 171-182.
15. FAO, *et al.* 2009. Induced Plant Mutations in the Genomics era. Ed. Q Y shu. Italia. 441 págs.
16. FAO. 2009. Tropical fruits review of recent world market situation for bananas and tropical fruits.
17. FISHER, R. 1918. The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. Rev. Transaction of the Royal Society of Edinburgh. Vol. (52). Págs. 399 – 433.
18. FONTAGRO. 2006. Productores de lulo y mora competitivos mediante selección participativa de clones élite. Quito Ecuador. Ed LITOCENTRAL. 34 págs.
19. GOBERNACIÓN DEL HUILA. 2006. Manual técnico del cultivo del lulo (*Solanum quítense* L) en el departamento del Huila. Neiva Colombia.
20. GOUFENG LIU *et al.* 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Rev.Euphytica, Vol. 157, págs. 145:154.
21. HALDANE J. 1932. The causes of Evolution. Rev. Longman Green. London united kingdom.

22. HEISER, C. 1979. Origins of Some Cultivated New World Plants. *Annu. Rev Ecol.* Vol.10. Págs. 309-326.
23. HEISER, C *et al.* 2005. A New Synthetic Allopolyploid Naranjilla *Solanum indianense*. *Rev.Novon*, Vol.15, Págs 290-292.
24. HESS, D Y BAYER, D. 1974. The effect of trifularin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton. *Rev. Cell science.* Vol.15. Págs 429-441.
25. HAIR, F. 1999. Análisis multivariante. Ed. Mc Graw Hill. España. 799págs.
26. ICA. 2011. Manejo fitosanitario del cultivo del lulo. Bogotá Colombia. 21 págs.
27. IFPRI. 2009. CAMBIO CLIMÁTICO “El impacto en la agricultura y los costos de adaptación. Washington U.S.A. 30 págs.
28. IMERI J & CEQUEA H. 2001. Evaluación citogenética de la generación M₁V₂ de tetraploides experimentales en sábila (*Aloe vera* L). Universidad de oriente. Cumaná Venezuela. *Rev UDO Agrícola.* Vol 1(1). Págs. 29 – 33.
29. LEVAN, A. 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium hereditas*. Vol.24 . págs. 471 – 486.
30. LEVITUS *et al.* 2006. Biotecnología y Mejoramiento vegeta II. Buenos Aires Argentina. Ed. INTA. 286 págs.
31. LINDMAN, H. 1992. Analysis of Variance in Experimental Design. Ed.Fienberg. USA.
32. LOBO, M. 1991. Perspectivas de la siembra del lulo o naranjilla (*Solanum quítoense*). Boletín técnico universitario de la Universidad Nacional de Colombia. Vol.2(2). Págs. 125-130.
33. LOBO M, *et al.* 2002. Recursos genéticos de recursos andinos en el sistema de bancos de germoplasma del estado colombiano. IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frio Moderado. Págs. 43-48.

34. LOBO M, MEDINA, C. 2007. Variabilidad morfológica de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y especies relacionadas de la sección *Lasiocarpa*. Revista de la universidad nacional de Medellín. Vol.60(2). Págs. 3939-3964.
35. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. 2015. Manual del exportador de frutas, hortalizas y tubérculos en Colombia.
36. MEDINA C. 2003. Estudio de algunos aspectos fisiológicos del lulo (*Solanum quitoense* Lam) en el bosque húmedo montano bajo del oriente antioqueño. Medellín. Colombia. Tesis Magister en ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 249 págs.
37. MEDINA C & LOBO M. 2009. Revisión del estado del conocimiento sobre la función productiva del lulo (*Solanum quitoense*) en Colombia. Rev. CORPOICA Ciencia y Tecnología agropecuaria. Vol.10(2) Págs. 167-179.
38. MONTGOMERY D. 2013. Diseño y análisis de experimentos. Ed Limusa Wiley (México). 686 págs.
39. NOVAK F & BRUNNER H. 1992. Sélection des plantes: Mutations induits por de meilleures récoltes. Rev.AIEA bulletin 4. Págs. 25-33.
40. ONU. 2014. La situación demográfica en el mundo. Nueva York. Estados Unidos. 38 págs.
41. PAREJA N *et al.* 2010. Comportamiento meiótico de diferentes especies de lulo (*Solanum sp*). Universidad de Nariño. Pasto. Colombia. Rev. Acta agronómica. Vol.59(4). Págs. 394-400.
42. PINTOS, B *et al.* 2014. Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haploides. Rev. Reduca serie botánica. Madrid España. Vol. 7(2). Págs. 12-18.
43. QUADER, H Y FILNE, R. 1980. The action of antimitotic herbicides on flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*: A comparison with action of colchicine. Rev. *Cell biol.* Vol. 21. Págs 301-304.

44. RAMIREZ, V Y DUQUE, N. 2010. Respuesta del lulo la selva (*Solanum quioense* x *Solanum hirtum*) a la aplicación de fermentados aeróbicos tipo bocashi y fertilizante químico. Rev. Acta agronómica. Vol. 59(2). Págs. 155-161.
45. ROSELINE, C *et al.* 2012. Chromosome doubling of grasses: an alternative to plant breeding. Rev. Ciencia Rural. Brasil. Vol. 42. Ed. 7
46. TRIOLA M. 2013. Estadística. Ed Pearson (México).856 págs.
47. UNALM. 2014. Mejoramiento Genético y biotecnológico de plantas. Ed Promotora Lima Perú. 286 págs.
48. VALLEJO A & ESTRADA E. 2002. Mejoramiento Genético de plantas. Ed.1. Págs. 404.
49. WAN Y, *et al*, 1989. Efficient production of boubled-haploid plants through colchicine treatment of anther derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol.77. págs. 889-892.