



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a través de la embriogénesis somática

Hernando Artemio Criollo Escobar

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Doctorado en Ciencias Agrarias
Fisiología de Cultivos
Bogotá, Colombia
2013

Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a través de la embriogénesis somática

Hernando Artemio Criollo Escobar
Código: 07797058

Tesis de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Agrarias con énfasis en Fisiología de Cultivos

Directora:
Ph.D. Margarita Perea Dallos
Profesora Emérita Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Escuela de Postgrados
Bogotá, Colombia
2013

A Dios, mi fuerza interior, motor de todos mis esfuerzos, éxitos y fracasos, por no dejarme vencer aún en las peores dificultades.

A Rosita y Gerardo (q.e.p.d), por enseñarme el sentido de la responsabilidad y mostrarme que el mañana solo es una nueva oportunidad para vencer las dificultades y mirar el éxito como siempre alcanzable.

A mis hijos, por hacerme sentir orgulloso de ellos.

A mi compañera Johanna Muñoz, quien estuvo siempre presente en los aciertos y en las dificultades del trabajo investigativo, colaborándome en todas las actividades necesarias para sacar adelante este proyecto.

Agradecimientos

A la Universidad de Nariño por haberme dado la oportunidad de coronar mis sueños de superación.

A la Dra. Margarita Perea Dallos por todo lo que me enseñó y aprendí a su lado, sobre todo su vocación científica y la entrega total, día a día, a sus estudiantes; gracias por ser un ejemplo de maestra en toda su dimensión

A la Dra. Esperanza Torres, Dra. Ingrid Schuler, Dr. Mario Velásquez, por sus consejos y sus valiosas recomendaciones para mejorar este proyecto.

A mi tutor, Dr. Gerhard Fischer por sus continua orientación y consejos, que hicieron posible el cumplimiento de mis objetivos académicos.

Al IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) por concederme la oportunidad de confrontar y ampliar los resultados obtenidos durante mi trabajo investigativo en la Universidad Nacional de Colombia.

A mis amigos del IMIDRA que me arroparon con su amistad y colaboración permanente; a los Dres. Mariano Toribio, Jesús Alegre, Cristina Celestino, Mar Ruiz, Azahara Barra, a Celina, Noelia y Alfredo, mis sinceros agradecimientos.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño, por el gran interés que han mostrado a lo largo de la realización de este trabajo, por el ánimo y cariño que siempre recibo de ellos, por hacerme sentir acompañado, incluso durante mi pasantía en el extranjero.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial al Programa de Biología, que me facilitó toda la infraestructura de laboratorio y equipos, para la realización de este trabajo; al Dr. Xavier Marquínez, y a Jimmy por su decidida y permanente colaboración.

Por último, quiero agradecer de forma muy especial a mi familia todo el apoyo, ánimo y cariño mostrados. A mis hijos, a Rosita y a mis hermanos que siempre me apoyaron incondicionalmente y que me han enseñado el sentido de la superación continua.

Resumen

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.) es una especie frutal de origen andino con amplias posibilidades en los mercados internacionales debido a su carácter exótico y a su gran valor nutracéutico. Los grandes problemas de origen fitosanitario, así como la desuniformidad en la productividad y calidad de fruta han provocado grandes pérdidas económicas a los productores y reducción de las áreas sembradas en Colombia. Por estas razones, es necesario robustecer la investigación en temas relacionados con la producción masiva de plantas con uniformidad genética y tolerancia a las principales enfermedades y plagas del cultivo. Este trabajo es el resultado de investigaciones realizadas sobre la regeneración de plantas de dos variedades de lulo (*Solanum quitoense* var. *septentrionale* Schult. y Cuatrec., y *Solanum quitoense* var. *quitoense*) por medio de la embriogénesis somática, con el fin de garantizar un sistema de multiplicación masiva, que conserve las características de plantas seleccionadas o mejoradas por los programas de mejoramiento. Se incluyen dos artículos relacionados con la inducción de embriones somáticos, y el efecto del número de subcultivos sobre la variabilidad genética de dos variedades de lulo, con espinas y sin espinas. Se confirmó el carácter recalcitrante de lulo por la germinación precoz de los embriones en el medio con hormonas y ausencia de recurrencia en el proceso, así como la relación directa entre número de subcultivos y la variabilidad genética. Se confirmó además, que esta variación es genotipo-dependiente

Palabras clave: clonación vegetal, embriones somáticos, recurrencia, recalcitrancia, variación genética.

Abstract

Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) is a fruit of Andean origin with great opportunities in international markets due to its exotic nature and their high nutraceutical value. The phytosanitary problems and the variations in productivity and fruit quality have resulted in heavy economic losses for producers and reduced planted areas in Colombia. For these reasons, it is necessary to strengthen research on issues related to the massive production of plants with genetic uniformity and tolerance to the main diseases and pests of the crop. This paper is the result of research on plant regeneration of two varieties of lulo (*Solanum quitoense* var. *septentrionale* Schult., and Cuatrec., and *Solanum quitoense* var. *quitoense*) through somatic embryogenesis, in order to ensure a system of massive multiplication of lulo, which retains the characteristics of plants selected or improved by breeding programs. Includes two chapters related to the induction of somatic embryos, and the effect of number of subcultures on genetic variability of two varieties of lulo, with spines and spineless. We confirmed the recalcitrant nature of lulo by sprouting of embryos in medium with hormones and no recurrence in the process, and the direct relationship between the number of subcultures and the genetic variation. Variability was shown to be genotype dependent.

Keywords: plant cloning, somatic embryos, recurrence, recalcitrance, genetic variation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
1. Marco Teórico	7
1.1 El lulo (<i>Solanum quitoense</i> Lam.). Generalidades	7
1.2 Características de la planta de lulo	10
1.3 El cultivo de tejidos in vitro como método de regeneración de plantas	11
1.4 Embriogénesis somática	13
1.5 Factores que afectan la embriogénesis somática	15
1.6 Fases de la embriogénesis somática	21
1.6.1 Fase de inducción	21
1.6.2 Fase de proliferación	23
1.6.3 Fase de inhibición de la fase proliferativa	24
1.6.4 Fase de maduración de los embriones somáticos	24
1.6.5 Germinación y regeneración de plantas	25
1.7 Expresión genética durante la embriogénesis somática	26
1.8 La embriogénesis somática en Solánaceas	29
2. Regeneración de plantas de lulo (<i>Solanum quitoense</i> Lam.) mediante embriogénesis somática	37
Resumen	37
Abstract	38
Introducción	39

Materiales y métodos	41
Resultados y discusión	45
Efecto de la adición de ANA y BAP sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas	45
Efecto de ANA y BAP sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo sin espinas	48
Efecto de ANA y BAP sobre hipocotilos de lulo con espinas	50
Efecto de ANA y BAP sobre hipocotilos de lulo sin espinas	53
Efecto de concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa en el crecimiento de explantes de lulo con espinas (CE)	55
Efecto de las concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa en el crecimiento de explantes de lulo sin espinas (SE)	66
Conclusiones	74
.	
3. Efecto del número de subcultivos sobre la variabilidad somática de plántulas obtenidas por embriogénesis somática de lulo (<i>Solanum quitoense</i> Lam.)	77
Resumen	77
Abstract	78
Introducción	79
Materiales y métodos	82
Resultados y discusión	84
Conclusiones	89
4 Conclusiones Generales y Discusión	91
4.1 Conclusiones	91
4.2 Recomendaciones	94
Bibliografía	97

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Efecto de la adición de ANA y BAP en explantes foliares e hipocotilos de lulo; a) formación de raíces en bajas concentraciones de ANA en hojas cotiledonares de lulo con espinas; b) inhibición de formación de raíces con dosis altas de ANA en hojas cotiledonares de lulo sin espinas; c) y d) presencia de embriones aberrantes en hipocotilos de lulo con espinas y sin espinas, respectivamente.	47
Figura 2. Efecto de la interacción ANAxBAP sobre el tamaño relativo de los callos formados en hipocotilos de lulo con espinas, cultivados en medio MS	53
Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y sacarosa en medio de cultivo MS, sobre el porcentaje de hojas cotiledonares enraizadas; 1) Interacción ANA*Cinetina; 2) Interacción ANA*Sacarosa.	58
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y sacarosa en medio de cultivo MS, sobre el porcentaje de hojas cotiledonares con inducción de callo; a) Interacción ANA*Cinetina; b) Interacción Cinetina*Sacarosa.	59
Figura 5. Efecto de la adición de cinetina sobre la acción de diferentes concentraciones de ANA (en medio MS), en la aparición de estructuras embrionarias sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas.	60
Figura 6. Estructuras embrionarias desarrolladas sobre explantes foliares de lulo con espinas (CE) obtenidas en medio MS con adición de diferentes concentraciones de sacarosa, ANA y Cinetina; a) obsérvese el aspecto granular y gelatinoso de los callos con ANA (31,9 μ M) + sacarosa (58,4 μ M); b) embriones aberrantes con sistema radicular con ANA(31,9 μ M)	

+Cinetina(13,9 μ M) + sacarosa (263,1 μ M); c) embrión en medio con ANA(50 μ M) + sacarosa (58,4 μ M); d) tejido embrionario subcultivado en el medio básico (MS), suplementado con niveles bajos de fitoreguladores. 61

Figura 7. Inducción de raíces en hipocotilos de lulo con espinas, con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) Interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción Cinetina*Sacarosa. 63

Figura 8. Formación de embriones con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) Interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción ANA*Sacarosa 64

Figura 9. Desarrollo de las estructuras embrionarias observadas en hipocotilos de lulo con espinas (CE) en medio MS suplementado con ANA y sacarosa; a) aspecto de callos obtenidos con ANA(31,9 μ M) + sacarosa (50 μ M); b) embriones observados con ANA(31,9 μ M) + sacarosa (10 μ M); c) embrión desarrollado en medio con ANA(31,9 μ M) + sacarosa (10 μ M); d) embrión inducido con ANA(31,9 μ M) + sacarosa(260 μ M). 65

Figura 10. Enraizamiento de hojas cotiledonares de lulo sin espinas con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) Interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción ANA*Sacarosa 68

Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa sobre la frecuencia de inducción de estructuras embriogénicas, en hojas cotiledonares de lulo sin espinas. 69

Figura 12. Efecto de la interacción Cinetina*Sacarosa sobre el enraizamiento de hipocotilos de lulo sin espinas. 71

Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa, sobre la frecuencia de hipocotilos de lulo sin espinas (%) que mostraron inducción de embriones somáticos 72

Figura 14. Observación del desarrollo de callos y embriones somáticos inducidos en hipocotilos de lulo sin espinas (SE) en medio MS con adición de diferentes concentraciones ANA y sacarosa. A) Callo y raíces; B y C) callos con estructura embrionaria. D) Embrión tipo torpedo y embrión

germinado, separados del callo de formación. 73

Capítulo 3

Figura 1. Patrones de bandas generadas con los primer RAMS CCA y CT en plántulas de lulo con espinas (C) (*Solanum. quitoense* Lam.) y de lulo sin espinas (S), regeneradas a partir de embriones somáticos y diferente número de subcultivos 84

Figura 2. Dendrograma obtenido bajo el criterio de agrupamiento UPGMA, de los tratamientos correspondientes a diferente número de subcultivos in vitro de plántulas de lulo con espinas, con base en datos aportados por siete cebadores RAMs. 85

Figura 3. Dendrograma bajo el criterio de agrupamiento UPGMA de los tratamientos correspondientes a diferente número de subcultivos in vitro de plántulas de lulo sin espinas, con base en datos aportados por siete cebadores RAMs. 87

Lista de tablas

	Pág.
Capítulo 2	
Tabla 1. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP.	46
Tabla 2. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hojas cotiledonares de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP	50
Tabla 3. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hipocotilos de lulo con espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP	51
Tabla 4. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hipocotilos de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP	54
Tabla 5. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa.	57
Tabla 6. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hipocotilos de lulo con espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa	62

Tabla 7. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hojas cotiledonares de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa. 63

Tabla 8. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%), en hipocotilos de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa. 64

Capítulo 3

Tabla 1. Cebadores y secuencias utilizadas en la técnica RAMs para determinar la estabilidad genética de plántulas de lulo sometidas a subcultivos periódicos. 83

Tabla 2. Condiciones de hibridación y amplificación para RAMs de los cebadores seleccionados 83

Tabla 3. Matriz de distancia genética (encima de la diagonal principal) y similitud insesgadas (debajo de la diagonal principal) (Nei, 1978), obtenidas en plántulas de lulo con espinas provenientes de embriones somáticos con diferente número de subcultivos. 85

Tabla 4
Matriz de distancia genética (encima de la diagonal) de Nei (1978) y similitud (debajo de la diagonal) obtenidas en plántulas de lulo sin espinas provenientes de embriones somáticos con diferente número de subcultivos. 86

Introducción

El sector frutícola colombiano es el llamado a convertirse en uno de los principales ejes de las exportaciones colombianas, si se tiene en cuenta la gran diversidad, calidad y ventajas competitivas que le dan, su posición geográfica y la aceptación por parte de los productores de certificaciones como Globalgap, FairTrade y Productos Orgánicos.

Las importaciones de frutas y hortalizas, realizadas por Estados Unidos en el año 2011, alcanzaron los US\$ 13,7 mil millones; México, Chile, Canadá y Costa Rica fueron los principales proveedores, mientras que Colombia, ocupó el décimo lugar y solo participó con un 1,8%, equivalentes a US\$252 (Asohofrucol, 2012). Además, el Tratado de Libre Comercio, firmado con EEUU en el año 2012, amplía las posibilidades exportadoras del país, ya que se desgravaron las importaciones de frutas y hortalizas colombianas, que antes del tratado, tenían un gravamen del 29,8%.

El lulo (*Solanum quitoense*), es una de las especies colombianas con mayor potencial para la implementación de proyectos productivos con fines de exportación como frutal exótico; los incrementos acelerados de la población mundial así como la necesidad de mejoramiento del nivel de vida y cambios en los hábitos alimenticios, abren un panorama favorable para la explotación de frutales, que como el lulo, contienen un alto valor nutracéutico, debido al alto contenido en antioxidantes. Estudios recientes han confirmado los beneficios de consumir este tipo de frutas principalmente en la reducción de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipercolesterolemia, resistencia a la insulina, prevención del cáncer, artritis, arteroesclerosis, disfunción cerebral y disminución de procesos de aceleración del envejecimiento (Cerón *et al.*, 2010).

El lulo es una especie que se encuentra en estado de domesticación, que no ha sufrido un proceso continuo de selección o de mejoramiento genético, con una escasa oferta de genotipos mejorados (Lobo, 2006). El origen andino de este frutal (Colombia, Ecuador y Perú) permite ubicar en estos países la mayor diversidad y variabilidad genética, con la mejor oferta ambiental; esta situación representa enormes ventajas para el cultivo, las cuales no se han aprovechado en términos de generación de tecnología, enfrentando a los agricultores a múltiples problemas, entre ellos los fitosanitarios, que no permiten explotar el potencial genético de la especie y que pueden causar la pérdida total de los cultivos.

En Colombia, el lulo se cultiva en regiones de economía campesina tradicional en un 74% y el 26% restante, en regiones de economía empresarial. La mano de obra utilizada es 32% de tipo familiar, 24% contratada y en la modalidad de familiar-contratada 44% (Franco *et al.*, 2002). Los cultivos se ubican en zonas de ladera, entre los 1200 hasta los 2800 msnm, siendo una alternativa potencial para diversificar los sistemas de producción de los agricultores ubicados en la zona cafetera y en aquellas zonas donde se siembran cultivos ilícitos, ya que la rentabilidad del cultivo está muy asociada al uso de mano de obra familiar. Esta especie tiene una presencia importante en los mercados nacionales, y recientemente ha despertado el interés de los mercados internacionales; de hecho en el año de 2003, los Estados Unidos comenzaron a abrir sus puertas para el mercado de frutas exóticas como el lulo (Asohofrucol, 2012).

El lulo en Colombia, es un factor estabilizador de la economía familiar campesina de cerca de 9000 familias, genera empleo directo en el campo e indirecto a través de la comercialización, y es una especie importante en el desarrollo de la industria de jugos y pulpas en el país (Asohofrucol, Corpoica, Fondo nacional de fomento hortofrutícola, 2002; Franco *et al.*, 2002). Las empresas procesadoras de jugos ofrecen contratos de compra anticipada a los campesinos, pero se evidencia una deficiencia en la oferta del producto para satisfacer las necesidades locales. Esta deficiencia se ve parcialmente suplida con la

importación de frutas de naranjilla o lulo provenientes de Ecuador; este producto es de menor calidad que el lulo de Castilla de Colombia (Corporación Colombia Internacional, 2007).

Actualmente, la gran atención del sector procesador de frutas está enfocado hacia el único genotipo mejorado en el país, el lulo “la Selva”, un híbrido interéspecífico desarrollado por Corpoica La Selva (Bernal *et al.*, 2001). No obstante, el mayor porcentaje de la producción nacional está dominado por el lulo de Castilla, destinado para el consumo en fresco. Este lulo tiene características organolépticas muy apetecidas pero altamente variable en calidad, principalmente debido a la falta de un paquete tecnológico que involucre variedades y/o híbridos mejorados, y prácticas de propagación vegetativa que contribuyan a un manejo fitosanitario aceptable y sostenible.

Por su condición de especie en proceso de domesticación, la producción de lulo es un desafío científico, debido a los innumerables problemas de tipo sanitario que presenta. Para que esta especie alcance su potencial productivo, es necesario resolver primero, aquellos problemas inherentes a su sanidad (Lobo, 2000). La mayoría de los cultivares han mostrado ser susceptibles a problemas limitantes de la producción, como las enfermedades radiculares causadas por *Fusarium* spp. y *Meloidogyne* spp, los cuales causan la muerte de la planta, en el primer caso y debilitan la planta, reduciendo la vida útil del cultivo y disminuyendo su capacidad productiva, en el segundo (Betancourth *et al.*, 2007; Angulo, 2006, Corrales *et al.*, 1999).

La amplia variabilidad y el carácter alógamo de la especie, hacen difícil la implementación de los métodos de fitomejoramiento tradicionales y su sostenibilidad en el tiempo, si no se cuenta con herramientas que permitan garantizar la multiplicación de las plantas mejoradas, manteniendo alta fidelidad genética. Estas herramientas son imprescindibles para que la clonación, el saneamiento de plantas, la crioconservación de material vegetal o la transformación genética, se conviertan en biotecnologías de aplicación (Celestino

et al., 2005).

La embriogénesis somática es considerada la mejor herramienta para la regeneración de plantas de alto potencial, ya que contribuye con la producción de plantas transgénicas, con la multiplicación clonal de cultivos de alta productividad, calidad y con menor impacto de enfermedades; permite la conservación de genotipos élite y de la diversidad genética de una especie durante periodos prolongados de tiempo (Celestino *et al.*, 2005; Toribio *et al.*, 2004; Merkle *et al.*, 1995; Litz y Gray, 1995; Preil, 1991).

Además, la embriogénesis somática permite desarrollar un sistema celular apto para la transformación genética o para inducir variaciones genéticas *in vitro*, que pueden dar origen a nuevos cultivares o genotipos, con caracteres agronómicos deseables, como la resistencia a patógenos (Bhattacharya *et al.*, 2010; Quainoo *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2006).

Lo más importante de esta situación, es el conocimiento y la comprensión de los mecanismos involucrados en la variación somaclonal, para evitarla, en casos que requieren fidelidad genética, como en la propagación de plantas, conservación de germoplasma y transformación genética, o para inducirla, en aquellos casos en los que se la requiere (Cardone *et al.*, 2010).

La investigación sobre la aplicabilidad de técnicas biotecnológicas como la embriogénesis somática, en el mejoramiento y sostenibilidad de cultivos colombianos no tradicionales y de amplia proyección, como el lulo, es de gran importancia desde el punto de vista científico, social y económico; científico, por el conocimiento generado en una especie andina poco estudiada, social, por el gran número de familias campesinas de agricultura tradicional dedicadas a este cultivo y económico por la proyección que puede dar al cultivo, al permitir una mayor uniformidad de plantas con alto potencial productivo, o la posible obtención de materiales resistentes o tolerantes a los problemas limitantes del cultivo, con variación somaclonal inducida.

Según el Plan Frutícola Nacional, en Colombia existían en el año 2006, 6637 has

sembradas en lulo y se estima un requerimiento de 10000 has adicionales para el año 2025. Si se tiene en cuenta que la productividad promedia nacional está entre 6,0 y 8,0 t.ha⁻¹ y que el potencial productivo de la especie es de 27 t. ha⁻¹ de fruta fresca, la brecha tecnológica, estimada como la diferencia entre el rendimiento potencial y el rendimiento obtenido actualmente por los agricultores, estaría alrededor de 20 t. ha⁻¹; es decir, el agricultor deja de recibir en su finca, más de 20 millones de pesos por hectárea (Tafur, 2006).

Esta situación se puede atribuir a las grandes variaciones en calidad y productividad del lulo Castilla, originadas en gran medida, por la alta variabilidad en las regiones geográficas donde se siembra el cultivo, variabilidad genética de las poblaciones usadas por los agricultores, presencia de problemas fitosanitarios limitantes de la producción y por diferencias en los niveles tecnológicos aplicados en el proceso productivo; las diferencias en productividad y calidad de los lulos entre regiones productoras, no se pueden adjudicar a un factor determinado, pues cada región cultiva lulos de diferente composición genética (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2007).

Como se describió anteriormente, la gran problemática del cultivo de lulo se basa en la ausencia de genotipos mejorados para cubrir los requerimientos del mercado y de las condiciones edafoclimáticas, así como la carencia de oferta de material de propagación genéticamente uniforme, con propiedades que garanticen la productividad y calidad del producto y que presenten características de resistencia o tolerancia a los problemas sanitarios más limitantes, relacionados principalmente con hongos, bacterias y nemátodos, cuyo control es costoso y basado en el uso de fumigantes de alta residualidad en el suelo; solamente la interacción *Fusarium sp.* y *Meloidogyne spp.*, puede causar pérdidas que van desde 30% hasta la pérdida total del cultivo (Betancourth *et al.*, 2007).

En consecuencia, para satisfacer la demanda nacional y posicionar la fruta en el contexto internacional, no es suficiente con el incremento de áreas de siembra; se requiere además, utilizar nuevas tecnologías y generar conocimientos para la obtención de genotipos de alto desempeño, que cumplan con las condiciones de

calidad y sanidad, bajo los conceptos de sostenibilidad. El nivel de interés y la demanda nacional e internacional de esta fruta, en fresco y procesada, ameritan un esfuerzo de investigación sostenido, orientado al desarrollo de variedades y/o híbridos, que permitan incrementar los promedios nacionales, aplicando sistemas de producción amigables con el ambiente y con sistemas de propagación masiva que garanticen la disponibilidad de plantas de los materiales mejoradas con alta calidad sanitaria y vigor.

Este estudio se propuso como objetivo general, estudiar la regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) mediante la inducción y análisis de la embriogénesis somática, para obtener una metodología apropiada y orientada a la propagación clonal de genotipos superiores. Los objetivos específicos propuestos fueron:

- 1.- Evaluar el efecto de diferentes combinaciones hormonales, explantes y condiciones de incubación sobre la inducción de embriogénesis somática en lulo *S. quitoense* var. *septentrionale* (con espinas) y *S. quitoense* var. *quitoense* (sin espinas).
- 2.- Determinar la magnitud de la variabilidad somaclonal inducida por efectos del proceso de embriogénesis somática y del número de subcultivos o grado de recurrencia.

1. Marco teórico

1.1 El lulo (*Solanum quitoense* Lam.). Generalidades

El lulo o naranjilla pertenece a la familia *Solanaceae*, la cual comprende aproximadamente 3000 especies, la mayoría americanas, caracterizadas por sus altos contenidos de alcaloides; representan una familia de gran importancia económica, ya que especies como la papa (*Solanum tuberosum*.), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el tomate (*Lycopersicon esculentum*) son importantes cultivos a nivel mundial, mientras que otras especies son utilizadas en la industria farmacéutica por sus altos contenidos de metabolitos, principalmente alcaloides, como el borrachero (*Datura stramonium*), la belladona (*Atropa belladonna*), la mandrágora (*Mandragora autumnalis*) y el beleño negro (*Hyoscyamus níger*) (Salinas, 2001).

A nivel nacional, especies originarias de los andes como el lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt.) y uchuva (*Physalis peruviana* L.), representan un gran potencial por la aceptación que han tenido en los mercados internacionales y por ser alternativas viables en zonas de conversión de cultivos ilícitos. En el Plan Frutícola Nacional, Colombia resalta la importancia de impulsar estos nuevos cultivos y propone ampliar el área de siembra y la productividad, mediante su tecnificación (Tafur, 2006).

El conocimiento del lulo es relativamente escaso, por tratarse básicamente de plantaciones de economía campesina tradicional (74%), ubicados en zonas de ladera, con pocas posibilidades de tecnificación y mano de obra familiar (Franco *et al.*, 2002); El bajo nivel técnico de los productores y los sistemas de cultivo empleados, han ocasionado problemas de deforestación y bajos ingresos, lo cual hace necesario replantear las tecnologías existentes en el país, para evitar los

problemas ambientales que se están generando en las regiones productoras, además de maximizar los ingresos de los cultivadores.

En general, se puede afirmar que el lulo es una especie semisilvestre no domesticada, ya que presenta algunas características propias, como una gran cantidad de semillas en el fruto, presencia de espinas en tallos, ramas y hojas, semillas con dormancia y latencia, presencia de antocianinas y de tricomas en los frutos, así como la arquitectura dispuesta para una mayor captación de radiación (Angulo, 2006; Gomez *et al.*, 1999).

El lulo es originario de los bosques húmedos subtropicales de Perú, Ecuador y Colombia, localizados en las vertientes andinas entre los 1200 y los 2500 msnm. No produce polen fértil en zonas templadas y esta es una gran ventaja para el cultivo del lulo en el trópico (Angulo, 2006). *S. quitoense* es una especie diploide que presenta un número cromosómico somático de $2n=2x=24$ y un normal apareamiento cromosómico en meiosis (Vivar y Pinchinat, 1970).

Colombia cuenta con ofertas ambientales óptimas para el desarrollo del cultivo pero no se ha hecho uso de su variabilidad y biodiversidad genética (Angulo, 2006). A pesar de esto, la especie ha tomado gran importancia como un cultivo potencial y promisorio, debido a su valor nutritivo y a sus propiedades diuréticas y tonificantes, características que le confieren grandes posibilidades agroindustriales (Asohofrucol, Corpoica y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. 2002.); también se ha convertido en una fruta de exportación, apetecida en los mercados nacionales e internacionales (Lobo y Medina, 2000).

En el año 2003, los Estados Unidos comienzan a abrir sus puertas para el mercado de frutas exóticas como el lulo (Tafur, 2006), lo cual lo convierte en un producto rentable en expansión. A pesar de esto ha recibido poco apoyo del sector público con relación a otros productos agrícolas (Heiser y Anderson 1999), por lo que los agricultores se ven enfrentados a sistemas productivos artesanales, con mal manejo de problemas fitosanitarios, bajos rendimientos, uso desmedido

de agroquímicos y falta de variedades resistentes (Corporación Colombiana Internacional, 2007).

En general, el cultivo de lulo se encuentra en zonas cafeteras, es de carácter minifundista y el promedio de plantas por agricultor no sobrepasa las 1000 plantas. Los niveles tecnológicos son limitados, no se realizan análisis de suelos y las fertilizaciones se hacen en forma empírica, según criterios individuales; el riego se realiza generalmente con sistemas rudimentarios por aspersión (Muñoz, 2011).

Los departamentos de Huila, Valle del Cauca, Santander, Cauca, Boyacá, Tolima y Nariño, son los principales productores; el área nacional sembrada para el año 2011 fue de 5.469 has., con una producción de 50.342 toneladas y un rendimiento de 9.2 ton/ha, comparado con el año 2008 que presentó un área cultivada de 5.772 has con una producción de 46.296 ton y un rendimiento de 8.0 ton/ha (Agronet 2011).

En cuanto a la industria, hay una oportunidad en la elaboración de productos más especializados como jugos y conservas, lo que le da un valor agregado y por ende, una mayor remuneración por ser productos que pueden ser comercializados en los mercados de Estados Unidos, Unión Europea, Canadá, entre otros (Universidad de Antioquia, 2007).

Autores como Muñoz (2011), Tafur (2006), Lobo y Medina, (2000), han visto la urgente necesidad de tecnificar el cultivo con miras a lograr la calidad y los volúmenes requeridos para emprender la apropiación de mercados importantes en EEUU y en la CE principalmente; esta tecnificación de los cultivos debe ir de la mano de programas de mejoramiento genético, orientados a buscar tolerancia a los principales problemas sanitarios que tornan incierta su rentabilidad, como *Fusarium sp.*, *Phytophthora sp.*, *Meloidogyne sp.*, conservando o mejorando la calidad de la fruta y la productividad (Corrales *et al.*, 1999; Angulo, 2006; Betancourth *et al.*, 2007).

1.2 Características de la planta de lulo

Según Muñoz (2011) el lulo es una planta que, bajo las actuales condiciones de cultivo, es altamente susceptible a múltiples problemas de índole sanitario que afectan su calidad y que, en algunos casos, producen la pérdida total de la producción; por esta razón, los cultivadores hacen uso de todas las medidas posibles para limitar su presencia, medidas de tipo cultural, físico y químico, generalmente orientados por técnicos, cuyo objetivo principal es la venta de productos, no siempre efectivos.

La planta de lulo posee una raíz pivotante, con un alto porcentaje de raíces fibrosas superficiales. Su raíz principal presenta una profundidad de 40 a 50 cm. El tallo es semileñoso, cilíndrico y succulento que en su juventud es verde y tierno y que se transforma en un tallo leñoso de color café en su fase adulta. Algunos genotipos poseen gran cantidad de espinas (*S. quitoense* var. *septentrionale*) mientras que otros son lisos o con vellocidades suaves (*S. quitoense* var. *quitoense*); el lulo del Ecuador es sin espinas, mientras que el de Colombia presenta espinas (Denis *et al.*, 1985). Tiene una fuerte tendencia a emitir tallos basales. Las hojas son palmeadas, elípticas, alternas, con un ángulo de inserción hacia abajo que le permite una mayor exposición luminosa y según el genotipo, con gran número de espinas, con un pecíolo carnoso que mide por lo menos 10 cm., sus nervaduras son prominentes, de color morado o violáceo (Angulo, 2006; Franco *et al.*, 2002; Sahaza y Henao, 2001; Gomez *et al.*, 1999).

El fruto de lulo conserva un cáliz persistente, redondo o aovado, con un diámetro de 4 a 8 cm., con dos lóbulos separados por membranas y llenos con pulpa de exquisito aroma, de color verde o amarillenta, muy jugosa, desde ácida a suavemente ácida (pH desde 3,5 a 5,0), con cierto parecido a la piña o al limón. El exocarpio está cubierto de tricomas de color amarillo o rojizo, fáciles de eliminar en la cosecha, corteza susceptible a los golpes, amarilla en la madurez. Posee abundante número de pequeñas semillas (400 a 1000 semillas/fruto), de

forma lenticular y de color crema (Denis *et al.*, 1985; Franco *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 1999; Lobo *et al.*, 1983; Sahaza y Henao, 2001).

El tiempo de cosecha puede variar entre los 10 meses y 12 meses, dependiendo de la temperatura media de la zona de cultivo (Gobernación del Huila y Secretaría de Agricultura y Minería, 2006); esta actividad se realiza a mano cuando la fruta está en estado pintón a maduro (Categoría 3-5 Norma NTC 5093) y es el comprador quien fija el precio basado en una clasificación por integridad física y tamaño, que él mismo realiza en el sitio de compra.

Considerando que el lulo es una planta totalmente alógama (Angulo, 2006), la definición de técnicas orientadas a la multiplicación masiva de genotipos élite logrados en los procesos de mejoramiento es determinante; estas técnicas, igualmente pueden facilitar y acelerar los procesos mismos de mejora de plantas. Básicamente, las técnicas de multiplicación del lulo deben tener características de fidelidad genética y alta capacidad multiplicativa para reducir los costos.

1.3 El cultivo de tejidos *in vitro* como método de regeneración de plantas.

La producción de plantas de lulo, hoy en día se hace casi que exclusivamente por vía sexual, con semillas extraídas de frutos seleccionados por los mismos agricultores; algunos pocos productores, recurren a la propagación asexual por medio de estacas, con los problemas de baja eficiencia y de transmisión de enfermedades que ello implica; además, la utilización de plantas producidas *in vitro*, es una práctica que se impone en la instalación de cultivos comerciales a nivel empresarial (Muñoz, 2011).

Con el sistema de propagación asexual se genera, a partir de una planta madre, otra planta con idénticas características genéticas, fijando en un solo paso, todo el potencial genético de las plantas propagadas. Este proceso es de gran utilidad en el mejoramiento de plantas por la disminución en los tiempos de producción y por la uniformidad entre los individuos producidos (Park, 2002).

El rápido desarrollo de técnicas de propagación asexual de plantas *in vitro*, ha permitido su aplicación en la multiplicación clonal y regeneración vegetal, a partir de diferentes tipos de explante, diferentes órganos, de genotipos distintos y con una eficiencia altamente superior a las metodologías tradicionales. Las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, consisten en cultivar porciones de tejido de una planta llamados explantes, en recipientes cerrados que contienen medios nutritivos estériles, bajo condiciones controladas de luz y temperatura (Bonga y Park, 2003).

Estas técnicas de tejidos han permitido desarrollar varias tecnologías con la finalidad de regenerar plantas, con fines de mejoramiento (Toribio *et al.*, 2004); este es el caso de la micropropagación, que presenta grandes ventajas con relación a los métodos tradicionales, como la rapidez de multiplicación *in vitro*, regeneración de plantas en un medio libre de plagas y enfermedades, menores requerimientos de energía y áreas de propagación, posibilidad de producción durante todo el año y alta calidad de las plantas producidas. Sin embargo, también presenta serios problemas relacionados con la dificultad multiplicativa que pueden presentar algunas especies, posibles variaciones genéticas por el uso de hormonas o por los sucesivos subcultivos del material vegetal, además de los costos de producción (Hernández, 2007).

Según Celestino *et al.*, (2005) la regeneración de plantas a partir de células o tejidos, se puede considerar como el elemento central de la biotecnología vegetal, es lo que da sentido agronómico a otras facetas de la biología celular o molecular. Poseer una técnica apropiada de regeneración de plantas, es de gran importancia, para que los procesos de clonación, limpieza sanitaria de plantas, conservación de germoplasma o transformación genética puedan ser aplicables (Engelmann *et al.*, 1997).

La multiplicación de plantas por medio del cultivo de tejidos, es posible gracias a la totipotencialidad de las células, enunciada por primera vez por Haberland en el año 1883, lo cual las hace capaces de generar nuevos individuos, sin necesidad

de una fusión de células sexuales, con la característica de que los hijos poseen la misma información genética de la madre (clones) (Arnold, 2008; Hernández, 2007).

Aunque la condición de totipotencialidad es característica de las células meristemáticas, las células diferenciadas también tienen la capacidad de producir nuevos individuos, mediante procesos inducidos de desdiferenciación. Durante este proceso, las células pierden sus características de especialización adquiridas y se convierten en células de tipo meristemático, las cuales deben rediferenciarse para la regeneración de plantas (Celestino *et al.*, 2005; Vasil, 1983).

Los procesos de desdiferenciación se dan al colocar células diferenciadas en medios de cultivo enriquecidos con fitoreguladores y bajo condiciones ambientales propias de cada especie en particular, dando lugar a la formación de grupos amorfos de células indiferenciadas (callos), capaces de originar órganos o embriones somáticos, según sea la composición del medio y las relaciones entre diferentes reguladores (organogénesis y embriogénesis indirecta); igualmente, la formación de órganos (organogénesis) o de embriones somáticos (embriogénesis somática) puede darse sin la formación previa del callo (organogénesis y embriogénesis directas) (Feher *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2000).

La totipotencialidad celular es clave en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas o transgénicas. Una vez realizada la transformación, ya sea por *Agrobacterium* o por el método de biobalística, el paso siguiente es el cultivo *in vitro*, con el fin de obtener, a partir del explanto inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células (Magioli y Mansur, 2005).

1.4 Embriogenesis somatica

La embriogénesis somática puede considerarse como la formación de un embrión a partir de una célula individual o de un agregado celular sin fusión de gametos (Merkle *et al.*, 1995). Según Arnold (2008), la embriogénesis somática es un proceso mediante el cual las células somáticas se diferencian en embriones

somáticos, que son bipolares y morfológicamente semejantes a los embriones cigóticos; este fenómeno puede ocurrir en la naturaleza como una forma de apomixis o embrionía adventicia.

A pesar de que los procedimientos para obtener embriogénesis somática se han descrito para un gran número de especies (Tisserat *et al.*, 1979; Krishnaraj y Vasil, 1995), la inducción y la regeneración de plantas, no alcanzan aún la eficiencia requerida para la mayoría de estas especies, a pesar de que se considera como el método potencialmente más eficiente para la clonación masiva de plantas *in vitro*, por la naturaleza bipolar del embrión, facilidad de automatización del proceso, los altos índices multiplicativos en cortos periodos de tiempo y por la posibilidad de encapsular las estructuras, para producir las denominadas semillas artificiales que pueden ser crioconservadas más fácilmente que las estructuras organogénicas (Redenbaugh, 1986; Skirvin *et al.*, 1993; Bonga y Park, 2003).

La investigación en embriogénesis somática posee múltiples aplicaciones. Según Ji *et al* (2011) puede tener aplicaciones en ingeniería genética, conservación de germoplasma, producción rápida de plantas mejoradas, semillas artificiales, rescate de embriones cigóticos híbridos, inducción de cultivos de células somáticas híbridas, producción de haploides, triploides, selección individual de células con mutaciones inducidas y en fitomejoramiento mediante la selección de nuevos genotipos obtenidos mediante procesos de transformación genética (Campbell *et al.*, 2003), clonación y conservación de genotipos singulares, aspectos que pueden dar una idea de la importancia económica de la investigación en embriogénesis somática sobre la producción.

La principal desventaja de la embriogénesis somática es el desconocimiento de los condicionantes del proceso en cada una de las especies de interés (Arnold, 2008), que impide la obtención de protocolos eficientes para la obtención de embriones somáticos y regeneración de plantas.

1.5 Factores que afectan la embriogénesis somática

La gran dificultad para lograr la estandarización de los procesos embriogénicos radica en la cantidad de factores que pueden incidir en el comportamiento de un explante. Factores como el genotipo, características del explante, grado de diferenciación, el método de cultivo, composición del medio de cultivo, densidad de inóculo, luminosidad y fotoperiodo, temperatura, volumen de aire del contenedor, pueden generar respuestas diferentes aún dentro del mismo genotipo, lo cual dificulta enormemente alcanzar altos niveles de eficiencia en este proceso (Arnold, 2008; Bodhipadma y Leung, 2002).

El genotipo es tal vez el factor más importante en la definición de un proceso embriogénico junto con las interacciones con el tipo de explante, igual que en el caso de la organogénesis (Kantharaj y Golegaonkar, 2004); además, la frecuencia de la embriogénesis somática puede ser muy diversa por causa de la variación genotípica, aún dentro de un mismo género y especie (Ji *et al.*, 2011). Estas diferentes respuestas son heredables y están controladas por genes localizados en mitocondrias y cloroplastos y por genes nucleares, como lo demostraron Ohki *et al.*, (1978) con híbridos recíprocos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y se deben a los diferentes requerimientos de reguladores y al tipo de explante. Estas afirmaciones fueron comprobadas por Davis *et al.*, (1994) cuando demostraron que el cultivar Better boy puede regenerarse solamente a partir de hipocotilos, mientras que el cultivar Spring Giant lo hace con explantes de hipocotilo y de cotiledones.

Bodhipadma y Leung (2002) demostraron la respuesta diferencial de cuatro cultivares de *Capsicum annuum* a tratamientos de inducción embriogénica utilizando como explantes embriones cigóticos y con adición de 2,4-D al medio de cultivo; la respuesta genotipo dependiente del pimentón, fue confirmada por Koleva-Gudeva *et al.*, (2007) en la producción de plantas mediante embriogénesis somática, utilizando anteras como explantes.

En berenjena, Rao (1992) demostró respuestas varietales diferentes para obtener los óptimos de embriogénesis somática inducida con ANA, igual lo hicieron Ali *et al* (1991) utilizando un medio suplementado con 2,4-D; estos autores observaron que *S. melongena* var. *Insanum* y sus híbridos F1 presentaban buena capacidad embriogénica pero *S. gilo*, *S. interfolium* y sus híbridos F1 con *S. melongena* no producían callos embriogénicos.

En un ensayo realizado por Gill *et al.*, (1995) con siete genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), para inducir la embriogénesis somática directa mediante la germinación de semillas en un medio enriquecido con BAP, se observaron diferencias en las frecuencias de embriogénesis de los genotipos entre 50% y 96%.

El estado fisiológico y las características del explante son otro factor importante en la frecuencia embriogénica de un explante; puede afirmarse, que como regla general, los tejidos con mayor metabolismo y menor grado de diferenciación, son más inducibles para embriogénesis somática (Ji *et al*, 2011); así, las capas epidermales de hipocotilos y los embriones inmaduros son los más propensos a producir embriones somáticos en girasol (Huang *et al*, 2007; Jeannin y Hahne, 1991). Cuando se utilizaron explantes de partes florales de feijoa (*Feijoa sellowiana*), solamente aquellas zonas embriogénicas provenientes de estambres, tuvieron la capacidad de originar plántulas (Stefanello *et al.*, 2005).

En *Hibiscus safdariffa*, Sié *et al.*, (2010) demostraron que los explantes de hipocotilo y cotiledones fueron más eficientes para la inducción de embriogénesis somática que aquellos provenientes de raíces. En *Capsicum annuum*, Kintzios *et al.* (2000), encontraron que las hojas del tercero, segundo y primer nivel de la plántula se inducen por igual, aunque se observan diferencias en la producción de embriones globulares, siendo superiores las del primer nivel (distales del ápice).

Igualmente, cuando los explantes son hojas, es importante tener en cuenta la posición de la hoja con respecto al medio de cultivo. En algunas plantas como la fresa, *Malus domestica* y *Malus pumila*, se presenta una mejor respuesta

organogénica si el explante foliar se coloca de manera adaxial en contacto con el medio (Arnold, 2008); en *Solanum aviculare* la respuesta embriogénica fue mejor cuando se puso la superficie adaxial en contacto con el medio (Gahan *et al.*, 1994), aunque respuestas contrarias se observaron en *Populus*, el cual presentó mayor actividad embriogénica cuando los explantes foliares se colocaron abaxialmente sobre el medio (Park y Son, 1988), tal como sucedió en estudios de embriogénesis somática con explantes foliares de soya. Según lo manifiestan Hopher *et al.*, (1988) y Gahan *et al.* (1994), esta respuesta dependerá de la capacidad de transferencia nutricional y hormonal del tejido expuesto hacia los tejidos internos del explante.

En cuanto al medio de cultivo y su composición, existen diferentes medios cuya eficiencia en la frecuencia embriogénica depende del genotipo, el tipo de explante y la especie vegetal (Ji *et al.*, 2011). Hay muchos factores relacionados con el medio de cultivo que pueden interactuar con la embriogénesis somática. Un estudio realizado por Triqui *et al.* (2008), encontró diferencias en cuanto al agente gelificante del medio, siendo superior el agar comparado con el gelrite en la frecuencia embriogénica de *Ipomoea batatas*; esta respuesta se atribuyó a la mayor disponibilidad de agua en el gelrite y a sus altos contenidos de Ca, Fe, K y Mg.

El factor más importante en cuanto a los agentes solidificantes parece ser, según Owens y Wosniak (1991), su disponibilidad hídrica, determinada por el potencial mátrico del gel; estos autores encontraron grandes diferencias en el número de embriones somáticos y de tallos de remolacha utilizando diferentes geles, pero cuando ajustaron las concentraciones de éstos para obtener un potencial mátrico similar, el número de embriones somáticos y de tallos obtenidos fue similar con bactoagar (0.7%), HGT agarosa (0.46%), phytagar (0.62%) y gelrite (0.12%).

Los medios líquidos, sin agente solidificante, son otro sistema importante de cultivos *in vitro* que presenta algunas ventajas respecto al medio semisólido, como la dispersión de metabolitos tóxicos y la prevención de la pérdida de

nutrientes alrededor del explante. Sin embargo, estas ventajas dependen del tipo de explante y sobre todo del objetivo del cultivo; estos medios se utilizan para cultivo de protoplastos, células o raíces, para la producción de metabolitos, en las fases proliferativa y de maduración de embriones somáticos, en la producción de microtubérculos y de proliferación de tallos (Arnold, 2008).

El pH es otro factor relacionado con el medio y que tiene gran influencia en el cultivo de tejidos, ya que determina la accequibilidad y absorción de nutrientes y reguladores, afecta las reacciones químicas y la gelificación del agar. En la embriogénesis somática se presume que una función del nitrógeno amoniacal es reducir el pH para facilitar la absorción de nitratos, determinantes para el proceso embriogénico (Arnold, 2008). La embriogénesis somática de *Ostericum koreanum* depende fuertemente del pH; cuando Chen y Chang (2000) cultivaron continuamente explantes foliares con ANA, observaron fenómenos relacionados con la toma diferencial del fitorregulador, sugiriendo que la baja velocidad de desarrollo de embriones se da por pH bajos que se originan por la alta concentración interna de ANA.

Otros cultivos son afectados positivamente cuando se los inicia con pH bajos, indicando que los explantes inicialmente presentan requerimientos de NO_3^- ; la embriogénesis de *Pelargonium* fue inducida más eficientemente con MS u otro medio de cultivo, cuando se ajustaron sus pH entre 4.5 y 5.0 antes de la autoclavada (Marsolais *et al.*, 1991).

Igualmente se han encontrado efectos diversos de la fuente de azúcar contenida en el medio de cultivo, sobre el comportamiento de una especie (Daigny *et al.*, 1996). En *Morus alba*, Agarwal *et al.* (2004), encontraron que la sacarosa al 6% fue más efectiva que la glucosa, maltosa y fructosa, al producir mayores porcentajes de embriogénesis somática (80,45%), debido a que las altas concentraciones de azúcar producen estrés osmótico, mejorando así los procesos embriogénicos. Wetherell (1984) considera que los efectos producidos

por el azúcar 0.1M o el sorbitol, se deben a la plasmólisis de las células del callo que hace que se rompan los plasmodesmos y se separen.

Las condiciones de estrés pueden inducir de igual manera un incremento en la síntesis de poliaminas que mejoran la sincronía y eficiencia de los procesos embriogénicos (Litz, 1986; Bardley *et al.*, 1984); además de su carácter osmótico, los azúcares proveen de energía y son fuente de carbono en el proceso de la embriogénesis somática.

Bodhipadma y Leung (2002) evaluaron el efecto de los azúcares sacarosa, maltosa, fructosa y glucosa, sobre la embriogénesis somática del pimentón (*Capsicum annuum*) y comprobaron que solamente se formaron estructuras embrionarias con sacarosa y maltosa, utilizando embriones zigóticos inmaduros como explantes.

La presencia y combinación adecuada de fitorreguladores, es otro factor determinante en un proceso de embriogénesis somática, lo cual se ha observado en todas las especies estudiadas hasta hoy; en la mayoría de los casos, una relación adecuada de auxinas y citoquininas es requerida para el éxito del porceso embriogénico. El 2,4-D es, según Jimenez (2005), el más importante fitorregulador inductor de embriogénesis somática con un 49% de frecuencia de uso; se utiliza ampliamente en la generación de plantas hortícolas como el zapallo (*Cucurbita pepo*) (Leljak-Levanic, 2004), especies de *Dianthus* (Karami *et al.*, 2006; Pareek y Kothari, 2003), Melón (*Cucumis melo* L. var *cantalupensis*) (Guis *et al.*, 1997, Filipecki *et al.*, 1997), *Cucumis sativus* (Lou y Kako, 1995), *Psidium guajava* (Rai *et al.*, 2007; Vilches *et al.*, 2002), *Vitis vinífera* (Olah *et al.*, 2009), *Cyclamen persicum* (Jalali *et al.*, 2010), *Plantago major* y *Plantago hirtella* (Gonzalez *et al.*, 2006), *Ipomoea batatas* (Triqui *et al.*, 2008), *Oncidium* (Jheng *et al.*, 2006), *Feijoa sellowiana* (Stefanello *et al.*, 2005), *Zea mays* (Hernandez-García *et al.*, 2007), *Panax ginseng* (Choi *et al.*, 1998), *Coriandrum sativum* (Murthy *et al.*, 2008), entre muchos otros.

Otra auxina de amplios resultados en la generación de embriogénesis somática y que se aplica en un 29% (Jimenez, 2005) es el ANA, como lo confirman los trabajos realizados por Mir *et al.* (2008), Magioli y Mansur (2005), Hitomi *et al.*, (1998), en berenjena, Livadariu (2009) en remolacha roja, Seo *et al.*, (2007) en clavel y en general en plantas dicotiledóneas de carácter leñoso, como lo confirman Toribio *et al.*, (2004), Hernández *et al.*, (2003), Pinto *et al.*, (2002) y Cuenca *et al.*, (1999). Sin embargo, además del 2,4-D y ANA, utilizados para inducir embriogénesis somática en muchas especies, otros fitoreguladores pueden ser eficientes en la inducción de la embriogénesis somática, como sucede con el AIA en cítricos, en gladiolo (Stefaniak, 1994) y en papa (Seabrook y Douglas, 2001), el Picloram en banano (Ji *et al.*, 2011), en aguacate (Márquez-Martín, 2003) y en garbanzo (Dineshkumar *et al.*, 1995), el TDZ en rosa (Li *et al.*, 2002), en guandul (Singh *et al.*, 2003) y muchos más reguladores, cuya eficiencia depende principalmente del genotipo.

La intensidad de iluminación, así como su duración son también importantes factores que inciden en el proceso de embriogénesis somática; la inducción y crecimiento de callos de algunas especies, puede iniciarse en la oscuridad para ser trasladados a condiciones de luz cuando se requieren procesos de morfogénesis. Seibert *et al.*, (1995) comprobaron que la combinación de longitud de onda y duración de la iluminación, son muy importantes para la iniciación de callos y procesos de morfogénesis, como sucede en tabaco, en donde se estimuló el crecimiento calloso en la oscuridad y la formación de brotes en zonas cercanas al UV (371 nm) con muy baja intensidad (90 lux).

Según Nato *et al.*, (2000), durante su crecimiento y desarrollo, las plantas responden a estímulos; ejemplos claros son los estímulos luminosos y los hormonales que son canalizados a través de la traducción de señales realizada por receptores transmembranales, señales externas que se traducen en cambios metabólicos internos. Estos procesos son de carácter altamente conservado en la evolución vegetal. Durante la embriogénesis somática del trigo, los autores

identificaron un posible modelo de traducción que involucra la movilización de proteínas de la familia de las arrestinas, proteínas G y NDPK (Nato *et al.*, 2000).

1.6 Fases de la embriogénesis somática

Arnold (2008) propone cinco fases que ocurren dentro del proceso de la embriogénesis somática: 1.- Inducción de células embriogénicas mediante el cultivo del explante primario en un medio con reguladores (generalmente auxinas) y en algunos casos con requerimiento de citoquininas; 2.- fase de proliferación del cultivo embriogénico en el mismo medio de la fase de inducción; 3.- Inhibición de la fase proliferativa para dar lugar al inicio del desarrollo de los embriones, mediante una reducción drástica o eliminación del regulador en el medio de cultivo; 4.- Fase de maduración de los embriones mediante la incorporación de ABA o de un regulador del potencial osmótico y 5.- Regeneración de plantas (Arnold, 2008).

1.6.1 Fase de inducción

Todas las células somáticas contienen toda la información genética necesaria para dar origen a una planta completa. En la embriogénesis somática, debe presentarse un cambio en el patrón de expresión genética actual, por un programa de expresión genética que origine la embriogénesis somática, lo cual se conoce como desdiferenciación; un mecanismo probable de esta regulación genética es la metilación del ADN que es influenciada por la acción de auxinas o promotores de crecimiento (Arnold, 2008; Lo Schiavo *et al.*, 1989). Chakrabarty *et al.*, (2003) determinaron los cambios ocurridos en la metilación del ADN durante la inducción de embriogénesis somática de *Eleuterococcus senticosus* y demostraron una menor tasa de metilación en callos embriogénicos comparada con la metilación sufrida en callos no embriogénicos. Consideran los autores, que la metilación del ADN es un mecanismo regulador de la expresión genética durante el proceso de embriogénesis somática.

En términos fisiológicos, las auxinas parecen ser las responsables de la inducción embriogénica, aunque los mecanismos específicos son todavía poco conocidos. En principio, se puede afirmar que la auxina, inhibe algunos supresores de embriogénesis somática (Choi *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 1993), aunque autores como Raghavan (2004), afirman que su primera función es la formación de callo. En la regulación de los procesos embriogénicos están involucrados los factores de transcripción LEC (Leafy Cotyledon TFs), que actualmente se utilizan en la definición de los mecanismos moleculares relacionados con las fases de inducción y maduración de la embriogénesis somática.

En la fase de inducción se presenta la acumulación de células que forman masas proembriogénicas (PEMs); según Duditis *et al.*, (1995), solo unas pocas células del explanto inicial, son competentes para la inducción embriogénica, debido posiblemente a diferentes niveles de sensibilidad celular a la auxina o a la presencia de receptores de auxinas responsables de la división celular y del crecimiento asimétrico, que dan origen a estructuras embriogénicas (Lo Schiavo, 1994).

Según Raghavan (2004), las auxinas parecen ser la llave universal de inducción de la embriogénesis somática, aunque los mecanismos moleculares no están bien definidos; en el inicio de la embriogénesis cigótica, la polaridad del embrión se da por diferencias en los contenidos celulares de auxinas, lo cual posiblemente ocurre en la embriogénesis somática. Igualmente, la presencia de inhibidores auxínicos suprime la embriogénesis somática (Cooke *et al.*, 1993), aunque algunos autores han sugerido que el papel principal de la auxina en la embriogénesis somática de *Arabidopsis* a partir de embriones cigóticos es estimular la formación de callo.

Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la inducción de la embriogénesis somática y la expresión del gen LEC (Leaf cotyledon); la expresión externa de los genes LEC1 y LEC2 induce embriogénesis somática en ausencia de tratamientos exógenos de auxina o de inductores de estrés y su expresión es

observada en todos los tejidos que están sometidos a procesos de embriogénesis somática (Lotan *et al.*, 1998), lo cual demuestra que los factores de transcripción de los genes LEC (LEC TFs) son necesarios y suficientes para crear un ambiente celular que permita el desarrollo embriogénico (Braybrook y Harada, 2008).

Krassimira *et al.*, (2002) identificaron dos genes responsables de procesos embriogénicos somáticos en *Dactylis glomerata* y los denominaron como DGE1 y DGE2, genes que no se presentan en cultivares no embriogénicos y que posiblemente presentan acciones de regulación funcional a nivel de núcleo.

Las bases moleculares de las respuestas diferenciales de cultivares de *Solanum melongena* en la inducción embriogénica, fueron estudiadas por Afele *et al.*, (1996). Los autores encontraron que el cultivar “Wase Shinkuro” produjo callo embriogénico capaz de producir embriones somáticos mientras que el “Kumamoto Naga” tratado en igualdad de condiciones no produjo embriones somáticos; el estudio de este comportamiento diferente mostró variaciones en los productos de la PCR de cada genotipo durante el proceso de inducción embriogénica, indicando que este proceso puede estar determinado por diferencias en la expresión del mRNA

1.6.2. Fase de proliferación

Una vez formadas las células embriogénicas, continua su proliferación, formándose masas celulares conocidas como PEMs (Proembryogenic masses); la proliferación de las PEMs requiere de la auxina, pero ésta es inhibitoria de su transformación en embriones somáticos (Filonova *et al.*, 2000; De Vries *et al.*, 1988; Nomura y Komamine 1985).

El potencial de un cultivo embriogénico para multiplicarse indefinidamente es un aspecto de gran importancia en especies que requieren una multiplicación masiva o transferencia de genes (Merkle *et al.*, 1995). La fase proliferativa está influenciada por muchos factores, algunos de los cuales son desconocidos, pero la presencia de auxinas o de otro regulador de crecimiento, es el factor que más se asocia con la proliferación de células embriogénicas; Halperin (1967) y Gleddie

et al., (1983), afirman que el factor hormonal, no puede desligarse de otros factores importantes como la concentración de nitrógeno, con el cual hay interdependencia.

1.6.3. Fase de Inhibición de la fase proliferativa

Comprende una etapa de transición entre el cultivo en proliferación y el desarrollo del embrión; la suspensión de la proliferación es el primer paso y permite que los embriones alcancen un adecuado desarrollo antes de iniciar su maduración, lo cual se logra transfiriendo el cultivo embriogénico a un medio sin el promotor hormonal, con el objeto de inhibir los genes que bloquean el paso de un embrión globular a la forma corazón (Zimmerman, 1993).

1.6.4. Fase de maduración de los embriones somáticos

Durante la fase de maduración, los embriones incrementan sus reservas y adquieren forma propia, además de adquirir tolerancia a la desecación; sus características son muy similares a las del embrión cigótico, aunque las cantidades de reservas y el tiempo de acumulación pueden ser diferentes (Merkle *et al.*, 1995 y Thomas, 1993). La presencia de anomalías en los embriones somáticos y su baja conversión en plántulas, así como su baja calidad, normalmente son atribuibles a deficiencias en la síntesis y acumulación de reservas, debido a problemas durante la fase de la maduración (Langhansova *et al.*, 2004; Ammirato, 1987); la germinación prematura es otro problema relacionado con el proceso (Choi y Jeong, 2002).

En *Arabidopsis thaliana*, los procesos de maduración del embrión están asociados a los LEC TFs, síntesis y almacenamiento de macromoléculas; estudios con mutantes que carecen de LEC TFs, demuestran que éstos tienen problemas de almacenamiento de proteínas y de lípidos, demostrándose que los LEC TFs son necesarios y suficientes para inducir la fase de maduración de los embriones (Braybook y Harada, 2008; Harada, 2001).

En esta fase, los procesos de síntesis y almacenamiento, así como las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), son regulados por el ABA o por estrés hídrico (Dodeman *et al.*, 1997); factores como el pH, presencia de etileno, gradiente osmótico y fotoperiodo, pueden afectar igualmente la maduración del embrión. Holme *et al.*, (1997) y Walker y Parrot (2001), afirman que la adición de agentes osmóticos como la L-prolina o el PEG al medio de cultivo, produce condiciones de estrés y mejora la maduración de los embriones somáticos, como lo demostraron Rai *et al.*, (2007) trabajando con embriogénesis somática de *Psidium guajava* L.

La presencia de nitrógeno en el medio es fundamental para que el embrión alcance una completa maduración y se evite la germinación precoz, por lo que hay que hacer adiciones de nitrato, amonios, aminoácidos y caseína hidrolizada (Merkle, 1995). En algunas especies, se ha demostrado la necesidad de cultivar los callos embriogénicos en medios que contienen ABA, en concentraciones que pueden oscilar entre los 10 μM y 50 μM , para estimular la maduración o para evitar la embriogénesis secundaria o inhibir la germinación precoz (Arnold, 2008; Fernando y Gamage, 2000; Samosir *et al.*, 1997).

1.6.5. Germinación y regeneración de plantas

Igual que en la semilla cigótica, la calidad de la embriogénesis somática se traduce en la sobrevivencia y el vigor de crecimiento de las plantas generadas; es una consecuencia de las condiciones que se den al embrión durante todas las fases de su desarrollo. Los procesos de acumulación de reservas en los embriones y de tolerancia a la sequía, son factores críticos en la regeneración de plántulas. Un embrión de *Morus alba* bien desarrollado, permite la regeneración de plántulas simplemente en medio MS con un 6% de sacarosa (Agarwal *et al.*, 2004).

Rai *et al.*, (2007) trabajando con *Psidium guajava*, encontraron que los embriones alargados tipo torpedo presentan una mayor frecuencia de conversión en plántulas que aquellos tipo torpedo cortos; tanto el medio 1/2MS como el MS

completo, ambos con azúcar al 3%, mostraron resultados similares en cuanto a la eficiencia en la regeneración de plantas de guayaba, ya que la supervivencia de los embriones germinados después de aclimatados y llevados a sustrato, estuvo entre el 90% y 100%.

En *Lilium grandiflorum*, los embriones somáticos germinaron en un medio con bajas concentraciones hormonales o en la ausencia de ellas, manteniendo los embriones en la oscuridad; las plántulas obtenidas mostraron bulbillos y raíces (Nhut *et al.*, 2006).

Ascencio-Cabral *et al.*, (2008) evaluaron el efecto de la calidad de luz, del tipo de gelificante y del phloridzin sobre la regeneración de plantas de *Carica papaya* L. a partir de embriones somáticos obtenidos en medio MS suplementado con 2,4-D, ABA y Cinetina; los tres factores estudiados mostraron efectos significativos en la formación de plántulas, siendo el más importante el medio gelificante. Los tratamientos con bacto agar, presentaron una mayor germinación y se redujeron los porcentajes de hiperhidricidad observados con phytigel. En cuanto a la calidad de luz, la incubación de los embriones bajo un fotoperiodo de 8h/16h con luz de tipo gro-lux ($68 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$), presentó los más altos porcentajes de germinación y formación de plántulas, particularmente aquellos con phlorizidin y bacto agar.

Igualmente, Dineshkumar *et al.* (1995), produjeron la germinación de embriones de garbanzo inducidos con picloram, en un medio B5 suplementado con 0,25 mg/L de BAP; Karami *et al.* (2006), indujeron un 95% de germinación de embriones somáticos de clavel, colocándolos en un medio MS a la mitad de su concentración, sin reguladores y con un 3% de sacarosa.

1.7 Expresión genética durante la embriogénesis somática

Durante el proceso de la embriogénesis somática, las células somáticas son inducidas a transformarse en células totipotentes, capaces de dar origen a un

individuo genéticamente idéntico (Chugh and Khurana, 2002). La respuesta embriogénica durante este proceso es el resultado de cambios en la expresión de genes específicos y su análisis, puede clarificar muchos aspectos del proceso, que aún permanecen oscuros (Feher *et al.*, 2003).

Las investigaciones sobre los mecanismos de la embriogénesis somática, se han centrado principalmente en la regulación hormonal del proceso y se han desarrollado numerosos protocolos basados en la combinación hormonal, para regenerar especies a través de estas metodologías. Sin embargo, los genes que regulan la inducción y el desarrollo de embriones somáticos, aún no están claramente identificados (Rose y Nolan, 2006).

Desde el inicio de los estudios orientados a clarificar la expresión genética durante la embriogénesis, se ha tratado de caracterizar los genes relacionados con la embriogénesis somática de las especies estudiadas (Yang y Shang (2010), como es el caso de la zanahoria (Aleith and Richter, 1991), la vid (Gianazza *et al.*, 1992), alfalfa (Domoki *et al.*, 2006), maní (Rani *et al.*, 2005), algodón (Zeng *et al.*, 2006), coníferas (Cairney y Pullman, 2007), café (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002) y papa (Sharma *et al.*, 2008). Estos trabajos han permitido identificar genes que son activados o presentan una expresión diferente durante la embriogénesis somática, como los genes SERK, LEAFY COTYLEDON (LEC, Braybrook y Harada, 2008; Gaj *et al.*, 2005), BABY BOOM (BBM) (Boutilier *et al.*, 2002) y *WUSCHEL* (*WUS*) (Zuo *et al.*, 2002).

Los complejos productos de la transcripción durante la embriogénesis somática, permiten suponer que las moléculas producidas son numerosas, y su conocimiento permitirá entender mejor y optimizar el proceso (Magioli *et al.*, 2001); los estímulos externos o mensajeros secundarios como el Ca, pueden desencadenar cascadas de transducción, como es el caso de varias kinasas y calmodulinas-proteínas, que juegan un rol importante en la división y crecimiento celulares de las fanerógamas (Zeng, *et al.*, 2007).

Thomas *et al.* (2004), estudiando los procesos embriogénicos del girasol, encontraron que las expresiones morfogénicas y embriogénicas ocurren en el mismo grupo de células con características semejantes y que los receptores de tipo kinasa asociados a la embriogénesis somática (SERK), se acumulan al poco tiempo de iniciarse el cultivo (2 días) en las zonas organogénicas del explante, cualquiera sea el medio de inducción, morfogénica, embriogénica o altamente embriogénica, sin encontrar una correlación entre los niveles de SERK y la inducción de embriogénesis somática; sin embargo, a los 4 días, el nivel de SERK en el medio morfogénico se redujo ostensiblemente, mientras que en los medios embriogénico y altamente embriogénico, continuó acumulándose.

Domoki *et al.*, (2006) identificaron y caracterizaron genes asociados con la inducción de competencia embriogénica en células de alfalfa provenientes de protoplastos foliares; los patrones de expresión genética valorados, demostraron la eficiencia inductiva de embriogénesis del 2,4-D para todos menos uno de los genes investigados, así como el control positivo del gen MsLEC1 (Leafy cotyledon1). Los genes identificados mostraron diferentes patrones de expresión, durante las fases de inducción temprana y diferenciación.

En *Dactylis glomerata*, Krassimira *et al.*, (2002) identificaron dos genes relacionados con la embriogénesis somática, que denominaron como DGEs, que estaban presentes solo en cultivos embriogénicos foliares; transcriptos del DG1 se manifestaron en cultivos foliares con embriogénesis directa e indirecta, mientras que transcriptos de DGE2, solamente se expresaron en cultivos con embriogénesis directa. Un segmento de DGE1 de 90 amino ácidos, mostró un 81% de homología con la proteína fijadora al DNA de *Arabidopsis thaliana* conocida como WRKY.

Shimada *et al.*, (2005) aislaron un gen asociado a la embriogénesis somática de *Citrus unshiu* Marc., que nombraron como CitSERK1, homólogo de los genes SERK, aislados de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Daucus carota*. Los transcriptos de CitSERK1, presentaron niveles no perceptibles en callos no

embriogénicos, mientras que incrementaron su presencia en callos, después de iniciarse la embriogénesis.

Santos *et al.*, (2005) caracterizaron al gen TcSERK que se expresa durante la embriogénesis somática del cacao y demostraron su funcionalidad; al persistir las condiciones de inducción embriogénica, los niveles de TcSERK se mantienen, lo cual permitió afirmar que por lo menos en parte, es posible mantener un proceso recurrente en estado globular manteniendo la expresión de niveles apropiados de SERK, como ocurre en *Arabidopsis* sp. (Hecht *et al.*, 2001).

Según Magioli *et al.* (2001), la embriogénesis somática en *Arabidopsis* y en berenjena puede asociarse con la expresión del gen denominado Atgrp-5 en una proteína rica en glicina. La actividad transcripcional de este gen fue muy alta en los cluster proembriogénicos celulares (PEMs) y en las fases desde embrión globular hasta embrión torpedo; en el paso de embrión torpedo a cotiledonar, esta actividad se redujo gradualmente hasta desaparecer en el estado de embrión maduro. La actividad de este gen promotor sigue el mismo patrón que observaron en plántulas jóvenes de *Arabidopsis* provenientes de embriones zigóticos

1.8 La embriogenesis somatica en solanaceas

En general, las solanáceas son consideradas como recalcitrantes en su potencial de embriogénesis somática, aunque recientemente se conocen reportes de embriogénesis somática en varias de estas especies (Litz y Gray, 1995; JayaSree *et al.*, 2001; Sharma y Millam, 2004).

Estudios relacionados con la inducción de embriogénesis somática en solanáceas, parecen determinar que el ácido naftalen-acético (ANA), es la auxina que ofrece los mejores resultados de inducción embriogénica. Mir *et al.* (2008), demostraron que la inducción embriogénica dependía del tipo de explante utilizado; en berenjena, las dosis óptimas de ANA suplementadas con 0,5 mg/L de BAP variaron según el tipo de explante, 1,5 mg/L para cotiledones, 1,0 mg/L para hipocotilos y 2,0 mg/L para raíces. Estas concentraciones para los diferentes explantes también se han reportado por Yamada *et al.* (1967), Fobert y Webb

(1988) y Gleddie *et al.* (1986). Cuando se utilizó el 2,4-D como hormona iniciadora, con o sin BAP, se presentaron callos vigorosos pero acuosos y poco embriogénicos.

En ensayos para comparar el efecto de las auxinas en la embriogénesis somática de berenjena, Hitomi *et al.*, (1998) observaron una mayor eficiencia del ANA que el 2,4-D; la obtención de embriones somáticos se puede dar en un amplio rango de concentraciones de ANA, que van desde 4 mg/L a 20 mg/L, con óptimos que están entre 7,0 mg/L y 9,0 mg/L (Kantharajah *et al.*, 2004).

Según Tarré *et al.*, (2004) los embriones somáticos inducidos con la adición de ANA se originan en el parénquima perivascular dando origen a masas meristemáticas que pueden convertirse en raíces adventicias o en masas proembriogénicas.

El tipo de regulador y su concentración, en interacción con el genotipo, pueden originar grandes diferencias en las respuestas morfogénicas de la berenjena. Kamat y Rao (1978) encontraron que en presencia de ANA y utilizando hipocotilos como explantes, solamente se indujeron callos rizogénicos; sin embargo, Matzuoka y Hinata (1979), utilizando diferentes concentraciones de ANA, observaron organogénesis y embriogénesis, con el mismo tipo de explante. Mariani (1992) produjo embriones somáticos a partir de plántulas germinadas en la oscuridad, en respuesta a la adición de 54 μM de ANA, mientras que Fobert y Webb (1988) observaron rizogénesis con bajas concentraciones de ANA (0,5 μM – 2,7 μM), embriogénesis somática con niveles intermedios (5,4 μM – 27,0 μM) y callogénesis con las mayores concentraciones (54,0 μM –270,0 μM).

Con la adición de 50 μM de 2,4-D al medio MS y utilizando cotiledones de berenjena como explantes, Saito y Nishimura (1994), obtuvieron tasas de embriogénesis muy superiores al compararlas con los resultados obtenidos con la adición de 54 μM de ANA; sin embargo, Ali *et al.* (1991) obtuvieron embriogénesis utilizando hipocotilos de berenjena en presencia de bajas

concentraciones de 2,4-D (2,3 μM – 9,0 μM), contrario a los resultados observados por otros autores en estas mismas condiciones.

Utilizando hojas y cotiledones de berenjena de la variedad Brazilian, como explantes, Magioli y Mansur (2005) lograron altas frecuencias de inducción embriogénica con la adición de 54 μM de ANA, pero fracasaron al utilizar diferentes concentraciones de 2,4-D.

Los procesos de embriogénesis somática en berenjena a nivel de medio semisólido y en suspensión celular, fueron estudiados por Gleddie *et al.*, (1983); la mayor frecuencia de embriones somáticos se dió con la adición de 10 mg/L de ANA al medio semisólido MS, pero fue inhibida por la adición de citocininas como, cinetina, BAP, 2iP y zeatina, las cuales solamente incrementaron el volumen de callo no embriogénico. En este trabajo se destaca la importancia de la relación de $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$, proponiendo una relación óptima 2:1, igual que una concentración óptima de sacarosa de 0,06 M. Las suspensiones celulares tuvieron un similar comportamiento, tanto en la producción de embriones somáticos, como en su germinación y regeneración de plantas.

Sanchez *et al.* (2005), estudiaron la embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum* L.) cvs. Atlantic y Fritolay1867, utilizando explantes foliares y un medio de cultivo MS suplementado con TDZ; los mejores resultados de embriogénesis se obtuvieron cuando se adicionó al medio 1,0 mg/L de TDZ.

Vargas *et al.* (2005), realizaron el análisis histológico y evaluaron el patrón proteínico extracelular del proceso embriogénico de *Solanum tuberosum* L., obtenido a partir de suspensiones celulares de callos obtenidos en medio MS suplementado con 2,4-D y utilizando secciones nodales como explantes. Las suspensiones celulares en medio MS suplementado con extracto de levadura, cinetina y 2,4-D, presentaron predominantemente masas celulares y células individuales proembriogénicas; los embriones somáticos que germinaron en una suspensión de MS con zeatina y sin auxinas, fueron trasladados a un medio MS semisólido para la obtención de plántulas completas. En el mismo trabajo, se

encontró una alta asociación entre proteínas extracelulares de diferente peso molecular, con el estado de desarrollo embriogénico.

La obtención de callos nodulares embriogénicos, fue posible mediante el cultivo de segmentos de hoja de papa como explantes, en un medio MS con 2,4-D y BAP, mientras que con ANA y BAP los callos obtenidos fueron compactos y caulogénicos (JayaSree *et al.*, 2001). Cuando los callos embriogénicos se trasladaron a un medio MS, con zeatina y BAP, se indujo un alto número de embriones que germinaron en el mismo medio y que al pasarlos a un medio MS sin reguladores, originaron plántulas normales. La adición de BAP al medio de cultivo con 2,4-D mejoró el proceso embriogénico, seguramente porque se compensa el efecto deprimente de la auxina sobre el desarrollo meristemático (Merkle, *et al.*, 1995). Según Amirato (1987), el desarrollo normal de los embriones somáticos requieren de una sutil regulación del tiempo y del espacio de la división, elongación y diferenciación celulares; los fitoreguladores pueden ejercer múltiples acciones dependiendo de su concentración y del estado de desarrollo del embrión.

García y Martínez (1995), indujeron embriogénesis somática de *Solanum tuberosum* L. y realizaron un análisis histológico de las fases embrionarias en medio MS suplementado con 2,4-D (4 mg/L); la germinación de los embriones se alcanzó con alta frecuencia, 60 días después de su traslado a un medio sin 2,4-D y con 0,1 mg/L de AG₃. Un trabajo similar fue realizado por Sharma y Millam (2004) para determinar las características histológicas del proceso de embriogénesis somática; la inducción embriogénica se realizó en medio MS con adición de 2,4-D (5 µM) y la maduración y germinación de embriones en medio sin el regulador. El estudio histológico demostró la presencia de los estados globular, corazón y torpedo, asociados a un estado anterior de crecimiento celular aislado, con protodermo y conexiones vasculares relativamente independientes, que muestran que en papa, se dan las fases que determinan claramente la embriogénesis somática.

La estabilidad genética de las plantas de papa, regeneradas vía embriogénesis somática, comparada con plantas obtenidas de tallos axilares, microtubérculos y semillas verdaderas, fue evaluada por Sharma *et al.*(2007); las plantas obtenidas por vía clonal no mostraron variaciones fenotípicas, las cuales se observaron solamente en plantas producidas a partir de semillas verdaderas. La evaluación general del genoma, realizado por citometría de flujo, no mostró diferencias y el análisis con marcadores moleculares (AFLP), mostró un bajo nivel de variación, tres y dos bandas de 451 bandas, en plantas provenientes de embriogénesis somática y de microtubérculos, respectivamente. Solamente, aquellos marcadores AFLP, generados con enzimas de restricción sensibles a la metilación, mostraron polimorfismo; esta metilación fue originada posiblemente, por los efectos hormonales durante la fase de inducción de la embriogénesis somática (Bairu *et al.* 2006).

Un protocolo de dos pasos consistentes en la adición de TDZ o BAP en el primero y de zeatina, AIA y AG₃ en el segundo, fue utilizado con éxito por Seabrook y Douglas (2001), en la regeneración de cultivares de *Solanum tuberosum* L. a partir de embriogénesis somática primaria y secundaria; los explantes utilizados fueron segmentos internodales de tallo, hojas y rodajas de tubérculos producidos *in vitro*. Las diferencias en cuanto a la respuesta a la inducción y a la frecuencia de embriones somáticos, fueron evidentes a nivel de cultivares. A diferencia del tiempo requerido por García y Martínez (1995) para la formación de embriones (150 días), con este protocolo solo se requirieron 14-35 días, lo cual puede atribuirse a la adición de citoquininas, no utilizadas por los anteriores autores.

Igualmente, son varios los trabajos realizados en embriogénesis somática del pimentón (*Capsicum annuum* L.), como los realizados por Kintzios *et al.* (2000), para determinar el efecto de la posición de la hoja explante, de la luminosidad y de la composición del medio; se utilizó el medio MS suplementado con 9 µM de 2,4-D y 12,9 µM de BA. La inducción embriogénica dependió de la posición de la hoja y fue afectada significativamente por la composición del medio, con incubación de los explantes en luz o en oscuridad, pero embriones de formas

corazón y torpedo, solamente se observaron cuando los explantes se incubaron en la oscuridad, durante las tres semanas iniciales. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros investigadores, que han reportado que la incubación de tejidos bajo condiciones de poca luminosidad o de oscuridad, favorece la inducción de callos y de embriogénesis somática en especies como, pepino (Cade *et al.*, 1990), melón (Kintzios y Taravira, 1997) y rosa (Kintzios *et al.*, 1999).

Kaparakis y Alderson (2008), confirmaron que la embriogénesis somática del pimentón fue dependiente del genotipo; las citoquininas cinetina (0,01 mg/L y 0,1 mg/L) y N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine (0,01 mg/L y 0,1 mg/L) y el tratamiento con agua de coco (10%), no tuvieron un efecto significativo, mientras que zeatina (0,01 mg/L y 0,1 mg/L) y BAP (0,01 mg/L y 0,1 mg/L) la redujeron ostensiblemente.

En tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), se ha inducido embriogénesis somática a partir del cultivo de protoplastos (Chen y Adachi, 1994), de hipocotilos (Newman *et al.*, 1996) y de semillas colocadas a germinar en un medio con altas concentraciones de citoquinina (Gill *et al.*, 1995; Kaparakis y Alderson, 2002); sin embargo, todavía no ha sido posible generar un protocolo eficiente para la producción masiva de plantas de tomate a partir de embriogénesis somática, a pesar de su importancia en la producción de semillas sintéticas, para la producción de híbridos F1 (Gill *et al.*, 1995).

La embriogénesis somática se origina directamente y sin la formación de callo en la zona subepidermal de los tejidos nodulares, en la zona basal de plántulas germinadas; las citoquininas juegan un papel importante en el desarrollo de la embriogénesis somática del tomate (Newman *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1995). Estudios similares demuestran el efecto positivo de la zeatina en la embriogénesis somática de la zanahoria, asociada a la inducción de procesos de división celular. Gill *et al.*, (1995) indujeron embriogénesis somática directa, sembrando semillas de tomate en un medio MS + BAP (50 μ M - 80 μ M); los

embriones somáticos aparecen a los pocos días en la base del hipocotilo; el mismo protocolo ha sido aplicado en berenjena, pimentón y maní (Kaparakis y Alderson, 2002).

2. Regeneración de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) mediante embriogénesis somática

Resumen

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.) es una especie de gran importancia en la fruticultura colombiana, con grandes problemas fitosanitarios que requieren un agresivo programa de mejoramiento orientado a la producción de variedades tolerantes; estos programas necesitan establecer protocolos de regeneración masiva de plantas de alta eficiencia, como la embriogénesis somática. Nuestras investigaciones se orientaron al estudio de la embriogénesis somática de lulo, mediante la interacción de los fitorreguladores ANA, BAP, CINETINA y diferentes concentraciones de sacarosa en medio MS. Se utilizaron dos variedades de lulo (*S. quitoense* var. *septentrionale* y *S. quitoense* var. *quitoense*), dos tipos de explantes (hojas cotiledonares e hipocotilos), incubados en condiciones de oscuridad, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Concentraciones bajas de ANA y BAP con adición de altas concentraciones de sacarosa (260 μM), indujeron mayor enraizamiento de los explantes y mayor tamaño de los callos, con aparición esporádica de embriones, más frecuentes cuando se utilizaron hipocotilos; el mayor porcentaje de producción de embriones se obtuvo cuando se adicionaron al medio 31,9 μM y 50 μM de ácido naftalen acético (ANA) además de sacarosa (50 μM y 260 μM), para los dos tipos de explantes utilizados.

Palabras clave: embriones somáticos, recalcitrancia, hormonas de crecimiento, morfogénesis, cultivo in vitro, potencial embriogénico.

Regeneration of lulo plants (*Solanum quitoense* Lam.) by somatic embryogenesis

Abstract

Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) is a specie of great importance in the Colombian fruticulture, with big phytosanitary problems that require an aggressive plant breeding program, aimed at the production of tolerant varieties; these programs need to establish protocols with high efficiency to the massive plant regeneration, using somatic embryogenesis.

Our investigations were directed to the study of somatic embryogenesis of lulo, through the interaction of phytohormones NAA, BAP, kinetin and different concentrations of sucrose in MS medium. We used two varieties of lulo (*S. quitoense* var. *septentrionale* and *S. quitoense* var. *quitoense*), two types of explants (cotyledonary leaves and hypocotyls), incubated in darkness conditions, at 25 ± 2 ° C. Low concentrations of NAA and BAP with added sucrose (260 mM), induced higher rooting of explants and callus size, with sporadic occurrence of aberrant embryos, more frequently when were used hypocotyls; the highest percentage of embryo production was obtained when added 31.9 μ M and 50 μ M of naphthalene acetic acid (NAA) and sucrose (50 μ M and 260 μ M), for both types of explants used.

Keywords: aberrant embryos, recalcitrance, growth hormones, morphogenesis, in vitro culture, embryogenic potential.

Introducción

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.) es un frutal originario de los andes con amplias perspectivas en los mercados internacionales; su cultivo en Colombia se realiza en zonas cafeteras marginales, en áreas pequeñas con poca tecnología y con numerosos problemas de orden fitosanitario; la heterogeneidad de cultivos afecta la calidad de la producción. Es una especie muy susceptible a enfermedades y plagas que originan grandes pérdidas a los cultivadores, lo cual muestra la necesidad de orientar programas de mejoramiento con características de tolerancia, antes de iniciar un ambicioso programa de exportación.

En los programas de fitomejoramiento se requieren métodos eficientes de propagación de plantas que permitan conservar los alcances logrados y en este sentido, los sistemas de propagación masiva *in vitro* a partir de tejidos, tienen gran interés; a pesar de las dificultades que puede presentar la elaboración de un protocolo eficiente y replicable, muchos autores como Arnold (2008), Chandel y Katiyar (2000), Charriere y Hahne (1998) y Litz y Jarret (1993), consideran que el método más eficiente es la embriogénesis somática, especialmente cuando se requiere regenerar plantas a partir de células genéticamente modificadas, como lo expresan Nakagawa *et al.*, (2001).

La embriogénesis somática se define como la producción de embriones somáticos, asexuales o adventicios, que se inician a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos; estos embriones son estructuras bipolares, sin conexión vascular con el tejido maternal, capaces de crecer y de originar una nueva planta (Arnold, 2008; Rai *et al.*, 2007; Martin, 2003 y Litz y Jarret, 1993).

Rout *et al.*, (1999), enfatizan que la regeneración de plantas mediante embriogénesis somática presenta grandes ventajas como, las altas tasas de multiplicación que se alcanzan utilizando los biorreactores, posibilidades de encapsular los embriones y de crioconservarlos, fidelidad genética de la descendencia y selección *in vitro* de plantas tolerantes; así mismo, Campbell *et al.* (2003), consideran estos procesos como un valioso complemento en la

regeneración de plantas genéticamente transformadas. Sin embargo, la principal limitación se relaciona con la dependencia genotípica de la producción de embriones somáticos y su bajo poder germinativo (Wang *et al.*, 2006). El bajo poder germinativo de los embriones somáticos no suele ser una limitación generalizada de la embriogénesis somática. Otra limitación muy importante, además de la dependencia genotípica, es que en pocas especies hay protocolos suficientemente refinados para la multiplicación masiva de embriones somáticos.

La utilización de la embriogénesis somática y la regeneración de plantas, ha sido estudiada para muchas especies cultivadas y con diversos fines; se pueden citar como ejemplos los trabajos de Wang *et al.*, (2006) para regenerar de genotipos recalcitrantes de algodón, Nakagawa *et al.*, (2001) en melón a partir de tejidos cotiledonares, en cítricos (Carimi *et al.*, 1995) y en cacao (Tan y Furtek, 2003; Quainoo *et al.*, 2008); existen abundantes investigaciones en embriogénesis somática de cultivos hortícolas como el brócoli, zanahoria, tomate, repollo, pepino, arveja, garbanzo, batata, espárragos, frijol y espinaca (Choi *et al.*, 1998; Devi *et al.*, 2004; Kayim y Koc, 2006; Qin *et al.*, 2007; Sagare *et al.*, 1995; Komai *et al.*, 1996; Limanton-Grevet y Jullien, 2000; Loiseau *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006).

En la familia de las solanáceas, a pesar de ser consideradas especies recalcitrantes para la embriogénesis somática, se conocen protocolos exitosos como los de Takahiro *et al.*, (1995), Kantharajah y Golegaonkar, (2004), Mir *et al.*, (2008), Yadav y Rajam (1998), Kaparakis y Alderson (2002) en *Solanum melongena*, Sánchez *et al.*, (2005), Vargas *et al.*, (2005), JayaSree *et al.*, (2001) en *Solanum tuberosum*, Barany *et al.*, (2005), Kintzios *et al.*, (2000), Bodhipadma y Leung (2002), Koleva-Gudeva *et al.*, (2007), Kaparakis y Alderson (2008) en *Capsicum annuum*, Chandel y Katiyar (2000), Gill *et al.*, (1995) en *Lycopersicon esculentum*, Correia y Canoto (2009), Arahana *et al.*, (2010) en *Cyphomandra betacea*, Chakravarthi *et al.*, (2009) en *Solanum trilobatum*, Zapata-Castillo *et al.*, (2007) en *Capsicum chinense*. Sin embargo, no existen reportes de embriogénesis somática en lulo (*Solanum quitoense*) y los intentos realizados por

Segovia (2002) utilizando un medio de cultivo apropiado en *Cyphomandra betacea*, fueron fallidos.

Como se ha manifestado anteriormente, la embriogénesis somática en la mayoría de las especies estudiadas, es de carácter genotipo dependiente. Así lo han comprobado muchos autores como Velásquez *et al.*, (2006) con genotipos de cacao, Olah *et al.*, (2009) con genotipos de vid, Livadariu *et al.*, (2009) en remolacha, Triqui *et al.*, (2008) en batatas, Marcano *et al.*, (2002) en caña de azúcar, Mir *et al.*, (2008) en berenjena y Sánchez *et al.*, (2005) en papa.

Esta característica de los procesos de la embriogénesis somática, permitió determinar la necesidad de que en el estudio de los factores que inciden en la embriogénesis somática del lulo, se involucraran al menos dos genotipos, seleccionando así las dos variedades más cultivadas en Colombia, el genotipo de lulo con espinas (*S. quitoense* var. *septentrionale*) y lulo sin espinas (*S. quitoense* var. *quitoense*) (Muñoz, 2009; Medina *et al.*, 2008). El lulo con espinas posee mayor calidad industrial que el lulo sin espinas, pero este último, al carecer de espinas, facilita las labores agronómicas, requeridas por el cultivo. La eliminación de las espinas en el primer genotipo, significaría un aporte valioso del fitomejoramiento al manejo agronómico, ya que facilitaría la realización de todas las prácticas de manejo de cultivo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones hormonales, explantes y condiciones de incubación sobre la inducción de embriogénesis somática en lulo *S. quitoense* var. *septentrionale* (con espinas) y *S. quitoense* var. *quitoense* (sin espinas).

Materiales y métodos

Este trabajo de investigación experimental se realizó en el Laboratorio de Tejidos Vegetales del programa de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional-Sede Bogotá y en los laboratorios de Tejidos Vegetales del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA-España).

Material vegetal. Inicialmente se identificaron dos plantas de lulo; una con espinas localizada en la vereda de Buenos Aires, municipio de La Unión (Nariño), con características sobresalientes de sanidad y productividad y otra planta sin espinas, localizada en la vereda de San Andrés, municipio de Santiago, departamento del Putumayo. De estas plantas seleccionadas, se tomaron semillas correspondientes a medios hermanos, ante la dificultad para obtener semillas por autofecundación. En cada caso, se cosecharon frutos maduros, se extrajeron manualmente las semillas, se secaron en sombra hasta una humedad aproximada del 8-10% y se almacenaron herméticamente en recipientes de plástico a una temperatura de 4°C.

Germinación de semillas. Para la obtención in vitro de los explantes de cada uno de los genotipos, las semillas fueron previamente esterilizadas. Inicialmente las semillas se sumergieron en una solución jabonosa y se lavaron con agua estéril, luego se colocaron durante 15 minutos en hipoclorito de sodio al 1,5% y se lavaron cinco veces con agua estéril antes de ser transferidas al medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), en cajas petri de 9 cm., que una vez sembradas, se sellaron con cinta de parafilm estéril. Las semillas se colocaron a germinar a 25°C y un fotoperiodo de 12h/12h.

Siembra de explantes. Al cabo de 30 días, cuando las plántulas germinadas abrieron sus hojas cotiledonares, se tomaron explantes correspondientes a hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo con espinas (CE) y sin espinas (SE) y se sembraron en cajas petri estériles de 6 cm, que contenían 12 ml del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), suplementado con diferentes combinaciones hormonales de ANA (10,7µM, 21,5µM, 48,3µM) y BAP (1,3µM, 13,0µM) con 263,1mM de sacarosa y agar (7,0 g/L).

En un segundo experimento, explantes de hojas cotiledonares e hipocotilos de las dos variedades de lulo, obtenidos de plántulas germinadas in vitro, se sembraron en frascos estériles de vidrio de 150 ml que contenían 15 ml de medio basal MS con 7 g/L de agar, suplementado con las combinaciones de ANA (19,8µM,

31,9µM, 50,0µM), cinetina (0,0 µM, 13,9µM) y sacarosa (14,6mM, 58,4mM, 263,1mM). Los explantes se mantuvieron a 25±2°C, en condiciones de oscuridad (envueltos en papel aluminio), ya que ensayos previos, no publicados, mostraron que los recipientes incubados en oscuridad permitieron la formación de callos con mejor estructura y tamaño. A los 30 días, los cultivos se evaluaron y se transfirieron a un medio MS sin hormonas y con un fotoperiodo de 16h/8h.

Diseño experimental. Cada variedad botánica y tipo de explante en cada uno de los experimentos, se trabajó separadamente con un diseño experimental irrestrictamente al azar en arreglo factorial,. Los factores tenidos en cuenta en el primer experimento fueron los siguientes:

Factor A: Dosis de ANA (tres dosis)

Factor B: Dosis de BAP (dos dosis)

Se tuvo entonces, para cada variedad (2) y para cada tipo de explante (2) un total de 6 tratamientos y 10 repeticiones con, para un total de 240 unidades experimentales con cuatro explantes cada una.

En el segundo estudio se propusieron los siguientes factores:

Factor A: Dosis de ANA (tres dosis)

Factor B: Dosis de Cinetina (dos dosis)

Factor C: Concentraciones de sacarosa (tres concentraciones)

Esta distribución dio origen a 18 tratamientos para cada una de las dos variedades y los dos tipos de explante y 4 repeticiones, para un total de 288 unidades experimentales, con cuatro explantes cada una.

Evaluación. Se realizó un análisis descriptivo de las características de los callos producidos y se evaluó en porcentaje la presencia de raíces y de callos en

cada tratamiento; el tamaño medio de los callos formados en cada unidad experimental se determinó calificando cada callo con base en una escala de 1 a 5, promediándolos en cada unidad experimental y transformándolos en porcentaje, correspondiendo el 100% a la calificación 5 y el 0% a la ausencia de callo. Además, se contaron las estructuras embriogénicas formadas en cada unidad experimental.

Análisis estadístico. Los datos experimentales se sometieron a análisis de varianza con base en el modelo correspondiente al diseño experimental propuesto y pruebas de comparación de medias de Tukey para efectos simples e interacciones con $Pr > |t|_{0,05}$. El modelo que corresponde al diseño experimental DIA con arreglo factorial del primer trabajo, es el siguiente:

$$Y_{i,j} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i * \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

En donde,

$Y_{i,j}$ = es la ij-esima observación en el i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel del factor B.

μ = es la media general,

α_i = efecto del i-ésimo nivel del factor A,

β_j = efecto del j-ésimo nivel del factor B,

$\alpha_i * \beta_j$ = interacción del i-ésimo nivel del factor A con el j-ésimo nivel del factor B,

ε_{ijk} = error aleatorio o experimental.

Para el segundo trabajo, se adiciona un tercer factor, dos interacciones dobles y una triple interacción entre los factores. El modelo es el siguiente:

$$Y_{i,j,k} = \mu + \alpha_i + \beta_j + C_k + \alpha_i * \beta_j + \alpha_i * C_k + \beta_j * C_k + \alpha_i * \beta_j * C_k + \varepsilon_{ijk}$$

Resultados y discusión

Efecto de ANA y BAP sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas

El análisis de varianza para evaluar diferentes concentraciones de ANA y BAP adicionadas al medio MS, en el comportamiento de hojas cotiledonares, determinó diferencias estadísticas entre las dosis de ANA, dosis de BAP y en la interacción ANA*BAP para la formación de callos y diferencias entre dosis de ANA y BAP para formación de raíces; en las variables tamaño de callos y formación de estructuras embriogénicas, no se observaron diferencias estadísticas (Tabla 1).

En cuanto a la formación de callos se pudo establecer que con dosis baja y media de ANA, la adición de BAP al medio, mostró una respuesta favorable, ya que se incrementó el porcentaje de formación de callos de 65% a 100% en la dosis baja y de 80% a 100% en la dosis media de ANA; sin embargo, con la dosis alta de ANA, la adición o no de BAP no mostró efectos significativos, porque la sola aplicación de ANA fue suficiente para inducir un 100% de callos.

La respuesta de estos explantes en la formación de callos, mediante la adición de combinaciones de ANA y BAP al medio de cultivo MS, puede explicarse, según lo manifiesta Villalobos y Arias (1987) en el carácter auxínico del ANA, que induce la proliferación celular y en la adición del BAP que estimula el desarrollo de callos en algunas especies. Igualmente, es importante tener en cuenta la uniformidad y el estado de madurez del explante, ya que según González (2005), estas condiciones pueden determinar los requerimientos nutricionales y hormonales de los explantes cultivados. A medida que los tejidos maduran, la capacidad regenerativa de órganos y tejidos disminuye, por lo que, según lo manifiestan Carimi *et al.* (1997), los tejidos más jóvenes son los más indicados para el cultivo de tejidos, razón por la cual se seleccionaron explantes de hojas cotiledonares recién abiertas.

Tabla 1. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas, cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS			
		CALLO(%)	TAMAÑO DE CALLO	ENRAIZ(%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	1541,66**	0,06 ^{NS}	6572,91**	70,41 ^{NS}
BAP	1	5041,66**	0,41 ^{NS}	17510,41**	202,66 ^{NS}
Interacción ANAxBAP	2	1541,66**	0,06 ^{NS}	260,41 ^{NS}	7,91 ^{NS}
Error	54	138,88	0,58	336,80	90,09

** Diferencias estadísticas altamente significativas

^{NS} Sin diferencias estadísticas significativas

La formación de raíces en los explantes cotiledonares fue afectada tanto por la adición de diferentes concentraciones de ANA, como por la adición de BAP. En cuanto a las dosis de ANA, pudo observarse que el incremento progresivo en la concentración, disminuyó el porcentaje de enraizamiento de los explantes. La concentración de 10,7 μ M de ANA indujo un 67,5% de enraizamiento de los explantes, con diferencias estadísticas al compararse con las concentraciones de 21,5 μ M (50,0%) y 48,3 μ M (31,25%); también se presentaron diferencias estadísticas entre estas dos últimas concentraciones (Figura 1).

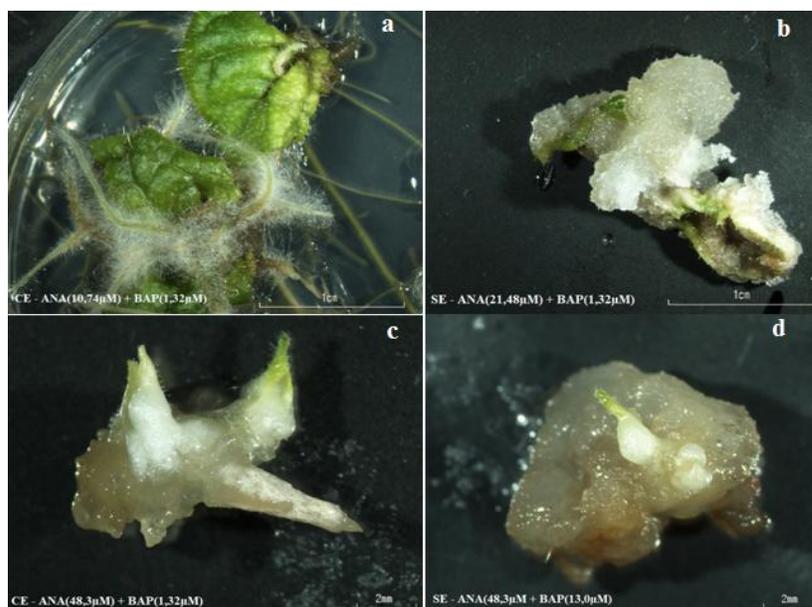


Figura 1. Efecto de la adición de ANA y BAP en explantes foliares e hipocotilos de lulo; a) formación de raíces en bajas concentraciones de ANA en hojas cotiledonares de lulo con espinas; b) inhibición de formación de raíces con dosis altas de ANA en hojas cotiledonares de lulo sin espinas; c) y d) presencia de embriones aberrantes en hipocotilos de lulo con espinas y sin espinas, respectivamente.

La adición de BAP redujo significativamente el porcentaje de enraizamiento de los explantes cotiledonares, presentándose diferencias estadísticas entre la dosis de $1,3\mu\text{M}$ (66,7%) y la dosis de $13,0\mu\text{M}$ (32,5%). Estos resultados coinciden con los de Casanova *et al.*, (2004), cuando afirman que los mayores enraizamientos observados en explantes foliares de clavel, se presentaron con la adición de $0,5\mu\text{M}$ de ANA en el medio y que estos valores decrecieron a medida que se incrementaron las concentraciones de BA.

Según Lo (1997), tejidos con heridas como los explantes, se liberan de la inhibición impuesta por la planta completa y expresan su potencial organogénico. Igualmente, los cortes permiten al explante aumentar la superficie de contacto con el medio de cultivo, incrementando así la absorción de hormonas y minerales. Rout *et al.* (1999), consideran que la inducción de raíces puede darse en un medio de cultivo, con adición o no de citoquininas, dependiendo del genotipo; además, la capacidad de enraizamiento es el resultado de la interacción de

complejos factores internos y externos. En trabajos realizados en rosa, pudo establecerse que el mayor enraizamiento se logra con explantes cortados y sembrados en medio MS suplementado con dosis bajas de ANA, AIA o IBA (rangos entre 0,1 – 5,0 mg/L) y con reducción en las concentraciones de sacarosa (2,0 – 2,5%).

La presencia de estructuras embriogénicas varió entre 6,25% con la dosis alta de ANA y 2,5% con la dosis baja, sin diferencias estadísticas significativas; pudo observarse que el incremento en la dosis de ANA redujo la aparición de embriones en el medio y afectó el crecimiento de los callos. De igual manera, cuando se adicionó BAP, la aparición de estas estructuras también se redujo, aunque sin diferencias estadísticas. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Kaparakis y Alderson (2003), que en sus trabajos de embriogénesis somática de *Capsicum annuum*, encontraron que ésta especie, comparada con otras, tenía requerimientos mucho más altos de BAP y que la aparición de embriones somáticos solamente puede darse en presencia de altas concentraciones de esta hormona, lo cual solamente reafirma el carácter genotipo-dependiente del proceso embriogénico.

Los embriones observados surgieron de callos blancos cristalinos y de aspecto granular, apareciendo inicialmente una estructura redondeada más blanca que el resto del tejido calloso, de la cual emergió un ápice que pronto adquirió la forma de hojas cotiledonares con formación de clorofila por su coloración verde.

Efecto de ANA y BAP sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo sin espinas

Los explantes cotiledonares de lulo sin espinas, mostraron un comportamiento similar a los mismos explantes provenientes de lulo con espinas. El análisis de varianza presentó diferencias estadísticas altamente significativas entre dosis de BAP para la variable formación de callos y entre las dosis de ANA y BAP para la variable enraizamiento de los explantes; no se presentaron diferencias

estadísticas para las variables tamaño del callo ni para la presencia de estructuras embrionarias. (Tabla 2).

Al comparar los promedios de formación de callo, se observaron diferencias estadísticas entre el porcentaje de callos con 1,3 μM BAP (100%) y el logrado con 13,0 μM de BAP (85,8%). En el porcentaje de enraizamiento de las hojas cotiledonares, se presentaron diferencias estadísticas entre las dosis baja y media de ANA (10,7 μM y 21,5 μM) que presentaron respectivamente 65,0% y 57,5%, y la dosis alta (48,3 μM) que solamente permitió un 38,7% de explantes enraizados; en la misma variable, la adición de 1,3 μM de BAP permitió un enraizamiento de 68,3%, con diferencias estadísticas al compararse con la dosis de 13,0 μM de BAP, que mostró un 39,2% de enraizamiento.

Trabajos realizados por Matos et al. (1995), utilizando explantes foliares de *Capraria biflora*, demostraron que la adición de ANA (1,0 mg/L) fue suficiente para inducir la formación de callos y raíces; cuando se adicionó cinetina (0,1 mg/L) al medio anterior, solamente se produjeron callos. Sin embargo, cuando se cambió la cinetina por BAP (1,0 mg/L) hubo formación de callos, tallos y raíces. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo y se comprueba la influencia principal de ANA, solo y en combinación con citocininas como el BAP, en la inducción de callos y raíces.

Aunque no se observaron diferencias estadísticas en cuanto a la formación de embriones, éstos tuvieron una frecuencia de aparición que varió entre 7,5% en la dosis baja de ANA y 2,5% en la dosis alta; los embriones aparecieron, como en el lulo con espinas, de callos blancos cristalinos de apariencia granular.

Tabla 2. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hojas cotiledonares de lulo sin espinas, cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS			
		CALLO(%)	TAMAÑO DE CALLO	ENRAIZ(%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	72,91 ^{NS}	0,15 ^{NS}	3656,25 ^{**}	135,42 ^{NS}
BAP	1	3010,41 ^{**}	0,02 ^{NS}	12760,42 ^{**}	10,42 ^{NS}
Interacción					
ANAxBAP	2	72,91 ^{NS}	0,02 ^{NS}	260,41 ^{NS}	10,42 ^{NS}
Error	54	149,30	0,32	309,02	98,37

^{**} Diferencias estadísticas altamente significativas

^{NS} Sin diferencias estadísticas significativas

Según Pascua *et al.*, (2002) los procesos organogénicos in vitro, están regulados por un gran número de factores, entre los cuales se destacan el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante, el sitio de corte del explante, reguladores de crecimiento, condiciones de iluminación, temperatura, carbohidratos y composición mineral del medio; estos factores son los que están determinando la frecuencia de aparición de callos, raíces y estructuras embrionarias en lulo. Los resultados observados en el presente trabajo, indican que el lulo es una planta con bajos requerimientos hormonales para inducir organogénesis, ya que en general, su mejor respuesta hormonal se presentó con dosis bajas de ANA y con 1,3 μ M de BAP.

Efecto de ANA y BAP sobre hipocotilos de lulo con espinas

Cuando se utilizaron hipocotilos de lulo con espinas como explantes, todos los tratamientos indujeron formación de callos en ambas variedades de lulo; el análisis de varianza para el tamaño de los callos, mostró diferencias estadísticas altamente significativas entre dosis de ANA, de BAP y en la interacción ANAxBAP. Para la variable enraizamiento solamente se observaron diferencias

entre dosis de ANA, mientras que las estructuras embrionarias se presentaron esporádicamente en todos los tratamientos, sin diferencias entre ellos (Tabla 3).

La prueba de comparación de medias para la interacción ANAxBAP en el tamaño de los callos, mostró que en la dosis baja (10,7µM) de ANA, los tratamientos con BAP fueron estadísticamente similares, mientras que en la dosis media (21,5µM) y en la dosis alta (48,3µM), el tamaño de los callos con la dosis de 1,3µM de BAP fue estadísticamente superior al tamaño de los callos obtenidos con una dosis de 13,0 µM de BAP (Figura 2).

En cuanto a la generación de raíces en los hipocotilos de lulo con espinas, el mayor enraizamiento se dio con 10,7 µM de ANA (11,25%) con diferencias estadísticas en comparación con la dosis de 48,3 µM de ANA que inhibió totalmente la generación de raíces en los hipocotilos cultivados (0%).

La aparición de embriones en el medio con hormonas osciló entre el 5% de los contenedores con al menos una estructura (Tratamientos: 48,3µM ANA +1,3 µMBAP; 10,7µM ANA+13,0µM BAP; 21,5µM ANA+13,0µM BAP) y 12,5% de contenedores con al menos una estructura embrionaria (Tratamiento: 48,3µM ANA +13,0µM BAP), con un promedio general en las combinaciones de 7,1%.

Tabla 3. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hipocotilos de lulo con espinas, cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		TAMAÑO DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	780,00**	656,25**	41,67 ^{NS}
BAP	1	1706,67**	375,00 ^{NS}	10,41 ^{NS}
Interacción ANAxBAP	2	1326,66**	93,75 ^{NS}	166,67 ^{NS}
Error	54	154,07	99,54	133,10

** Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

Los callos producidos presentaron una coloración blanca, transparente o de color crema, con apariencia gelatinosa y superficie granulosa o fina. Los embriones observados se caracterizaron por poseer una base amplia de color más blanco que el callo original, que se estrecha hacia el ápice y la estructura radicular inmersa en el cuerpo calloso (Figura 1).

Considerando que en el presente trabajo se están evaluando explantes de hojas cotiledonares, con células diferenciadas, el proceso de inducción embriogénica presenta una fase intermedia de callo, según lo manifiestan Merkle *et al.*, (1995). Una vez se desarrolla el proceso, los embriones surgen a partir de una sola célula o de varias, dependiendo del estado de las células colindantes. En el caso del lulo, los embriones aparecieron y germinaron en el mismo medio de inducción, por lo cual se los considera de carácter aberrante. Cuando se transfirieron los callos a un medio sin hormonas, el crecimiento se detuvo y las estructuras comenzaron un proceso de fenolización, debido posiblemente a la producción de altas cantidades de metabolitos secundarios, ya que cuando esta transferencia se realizó en un medio líquido, las células del callo presentaron división celular y aumento de volumen pero sin proliferación de masas proembriogénicas (PEM) y sin fenolización. Al parecer, la desdiferenciación provocada por la adición de ANA y BAP al medio de cultivo, generó un alto porcentaje de células sin inducción embriogénica.

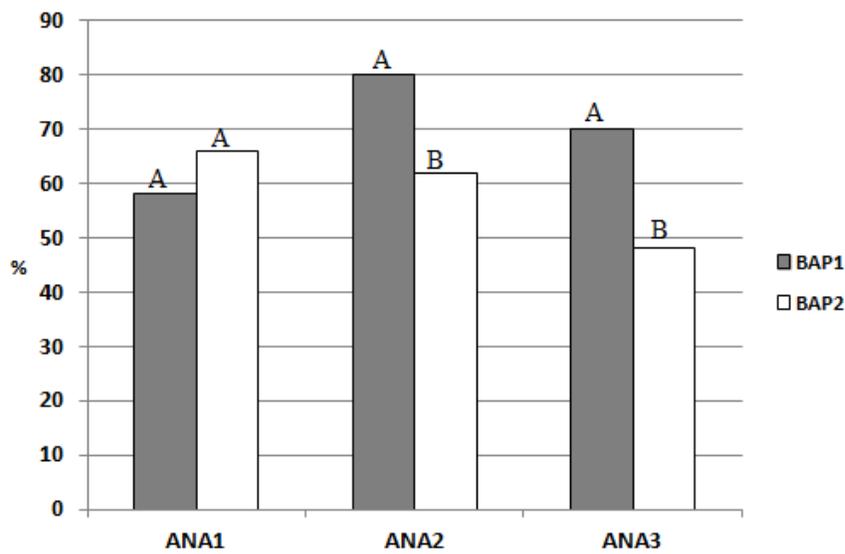


Figura 2. Efecto de la interacción ANAxBAP sobre el tamaño relativo de los callos formados en hipocotilos de lulo con espinas cultivados en medio MS. (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $P > |t|$ $\alpha = 0,05$). (ANA1=10,7 μ M; ANA2=21,5 μ M; ANA3=48,3 μ M; BAP1=1,3 μ M; BAP2=13,0 μ M).

Efecto de ANA y BAP sobre hipocotilos de lulo sin espinas

Cuando los explantes fueron hipocotilos de lulo sin espinas, se observó un comportamiento similar al de los hipocotilos con espinas. Todos los tratamientos indujeron callosidades cristalinas o gelatinosas, algunas de apariencia granular, de colores blanco a crema. En lo que respecta al enraizamiento de los explantes, se observaron diferencias estadísticas entre las dosis de ANA, mientras que en el tamaño de los callos, las diferencias se presentaron entre dosis de BAP. No se presentaron diferencias entre los tratamientos cuando se evaluó la aparición de estructuras embriogénicas (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), tamaño de callo, enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hipocotilos de lulo sin espinas, cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de ANA y BAP.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		TAMAÑO DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	106.66 ^{NS}	541.66 **	93.75 ^{NS}
BAP	1	2666.66**	41.66 ^{NS}	41.66 ^{NS}
Interacción ANAxBAP	2	186.66 ^{NS}	41.66 ^{NS}	72,91 ^{NS}
Error	54	167,40	74,07	159,72

** Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

La prueba de comparación de medias para la variable enraizamiento permitió establecer que la adición de 10,7 μ M de ANA indujo un mayor enraizamiento de los hipocotilos (10,0%), con diferencias estadísticas significativas respecto a las dosis de 21,5 μ M y 48,3 μ M, que permitieron 2,5% y 0% de hipocotilos con presencia de raíces, respectivamente.

El efecto decreciente sobre la variable enraizamiento, observado al incrementar las concentraciones de ANA, coincide con los resultados de Uribe *et al.* (2012), quienes hicieron las mismas observaciones trabajando con anturios; la inhibición del enraizamiento con dosis altas de ANA se debe posiblemente a la mayor estabilidad en el medio de cultivo de esta hormona, que la hace resistente a la degradación biológica y a la foto-oxidación, requiriéndose menores cantidades en el medio (Latsague *et al.*, 2009).

El análisis del efecto de la adición de BAP sobre el tamaño de los callos, permitió establecer que con la dosis baja (1,3 μ M) se obtienen mayores tamaños relativos de callo (62,0%) en comparación con la dosis alta de BAP (13,0 μ M) que permitió un tamaño relativo del 48,7%. Tanto la formación como el tamaño de los callos, puede explicarse, según Suarez *et al.* (2011), en los cambios ocurridos en las células del parénquima vascular, que son señales que orientan el destino celular

hacia la formación de agregados celulares inducidos por las diferentes concentraciones hormonales.

La aparición de estructuras embrionarias en cultivos de hipocotilos de lulo sin espinas, mostró mayores promedios que en el lulo con espinas y los promedios de los tratamientos oscilaron entre 15% en el tratamiento ANA (10,7 μM) + BAP (13,0 μM) y 7,5% en los tratamientos ANA (21,5 μM) + BAP (13,0 μM) y ANA (48,3 μM) + BAP (1,3 μM). Estas estructuras se originaron en callos de color blanco brillante, de apariencia granular; los embriones presentaron una forma redondeada con la aparición de un ápice que posteriormente dio origen a las hojas cotiledonares (Figura 1).

En general, se puede afirmar que la adición de ANA (10,7 μM) y BAP (1,3 μM) al medio de cultivo MS, indujo en hojas cotiledonares e hipocotilos, la proliferación de raíces y formación de callos en todos los explantes; la aparición de estructuras embriogénicas que germinaron en el medio inicial de cultivo adicionado con hormonas, permite considerarlas como embriones aberrantes; no se detectó un efecto significativo del BAP en la embriogénesis, como lo observaron Mir *et al.*, (2008) en berenjena, en donde la interacción ANA y BAP mejoró ostensiblemente la frecuencia de la embriogénesis somática; sin embargo, Gleddie *et al.* (1983), también reportan que las citoquininas inhiben la respuesta embriogénica de la berenjena al ANA, lo cual confirma las sutiles diferencias en las respuestas embriogénicas, debidas posiblemente a los diferentes balances hormonales endógenos de los genotipos.

Efecto de las concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa en el crecimiento de explantes de lulo con espinas (CE)

Hojas cotiledonares. El empleo de hojas cotiledonares de lulo con espinas determinó la presencia de interacciones ANA*Cinetina y ANA*Sacarosa en la formación de raíces y de ANA*Cinetina y Cinetina*Sacarosa en la formación de callos; en la aparición de estructuras embrionarias se observó la interacción

ANA*Cinetina; como efectos simples, los tres factores incidieron significativamente en la formación de raíces, cinetina en la formación de callos, y ANA y cinetina en la inducción de estructuras embrionarias, después de 30 días de incubación (Tabla 5)..

En la formación de raíces se observó una disminución progresiva del porcentaje de explantes enraizados, con el incremento en la concentración de ANA; la cinetina ejerció fuerte influencia en las dosis bajas de ANA (19,8 μM), presentándose diferencias estadísticas entre el mayor porcentaje de explantes enraizados sin la adición de cinetina y el observado con cinetina (13,9 μM); con 31,9 μM de ANA, también se redujo significativamente el porcentaje de explantes enraizados con la aplicación de cinetina; sin embargo, con la dosis alta de ANA (50,0 μM), el efecto de la aplicación de cinetina no fue significativo, ya que con o sin cinetina, el enraizamiento fue reducido (Figura 3).

La concentración de sacarosa tuvo un comportamiento diferente; con una baja concentración de ANA, el mayor enraizamiento se observó con 58,4 μM de sacarosa, mientras que con la dosis media de ANA el mayor porcentaje de explantes enraizados se obtuvo con 263,1 μM de sacarosa; con la mayor concentración de ANA, el efecto de la concentración de azúcar no fue significativo (Figura 3).

Tabla 5. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas, cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		FORMACION DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	1821,56 ^{NS}	13895,68 ^{**}	6171,87 ^{**}
CINETINA	1	8018,00 ^{**}	8696,60 ^{**}	13203,12 ^{**}
SACAROSA	2	1746,45 ^{NS}	834,96 [*]	416,66 ^{NS}
ANA*CINETINA	2	3359,30 [*]	1401,70 ^{**}	3359,37 ^{**}
ANA* SACAROSA	4	1319,55 ^{NS}	749,60 [*]	338,54 ^{NS}
CINET*SACAROSA	2	2986,83 [*]	283,17 ^{NS}	416,56 ^{NS}
ANA*CINET*SACAR	4	643,10 ^{NS}	340,37 ^{NS}	651,04 ^{NS}
ERROR	54	704,69	228,31	211,22

^{**} Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

^{*} Diferencias estadísticas al nivel del 95% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

Con las concentraciones bajas y altas de ANA, la cinetina no presentó un efecto significativo, sobre el porcentaje de hojas cotiledonares con formación de callo, pero en la dosis media, los explantes que crecieron en ausencia de cinetina presentaron mayor inducción de callos que los obtenidos en medio MS con cinetina (Figura 4). En la interacción Cinetina*sacarosa, se evidenció que en el medio sin cinetina, la influencia de la concentración de sacarosa no fue significativa, mientras que en el medio con cinetina, la concentración media de sacarosa (58,4 µM), indujo una mayor producción de explantes con presencia de callo (Figura 4).

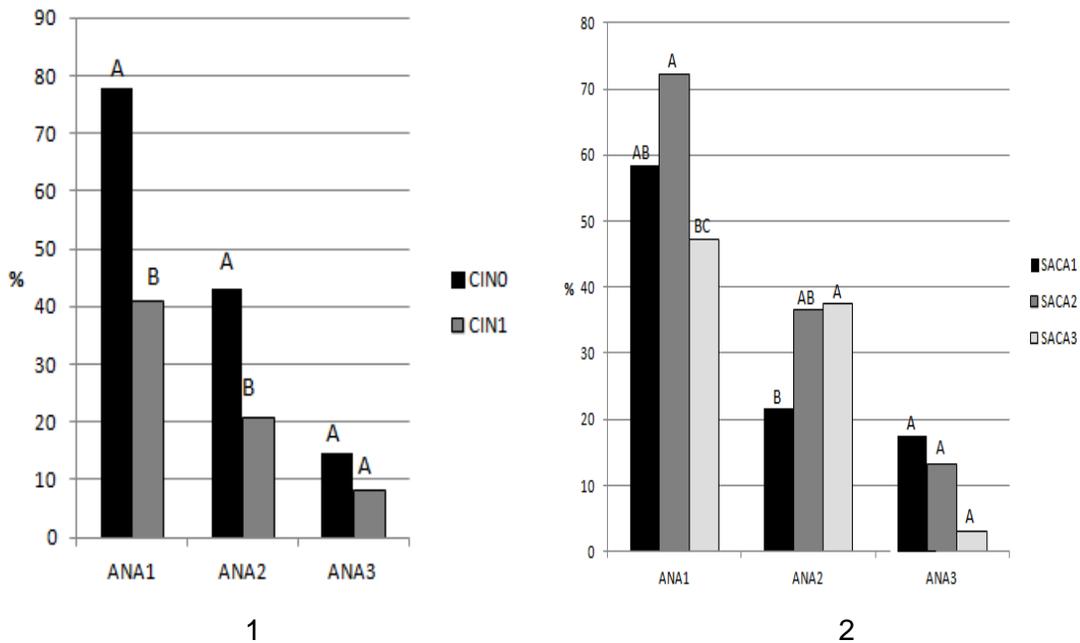


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y sacarosa en medio de cultivo MS, sobre el porcentaje de hojas cotiledonares enraizadas; 1) Interacción ANA*Cinetina; 2) Interacción ANA*Sacarosa (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t| \alpha=0,05$). (ANA1=19,8μM; ANA2=31,9 μM; ANA3=50,0 μM; CIN0=0 μM; CIN1=13,9 μM; SACA1=14,6 μM; SACA2=58,4 μM; SACA3=263,1 μM).

En la formación de callos y en su proliferación, el regulador de crecimiento y la concentración de éste en el medio de cultivo, juegan un papel definitivo; reguladores como el 2,4-D y ANA son los más utilizados, por sus efectos significativos en la elongación celular, expansión de los tejidos y formación de callos en altos porcentajes (Quiñonez *et al.*, 2008); generalmente en la mayoría de las especies que se cultivan *in vitro*, la ausencia alguna de estas auxinas hace que la frecuencia de formación de callo sea muy reducida o que no se presente (Matos, 2007).

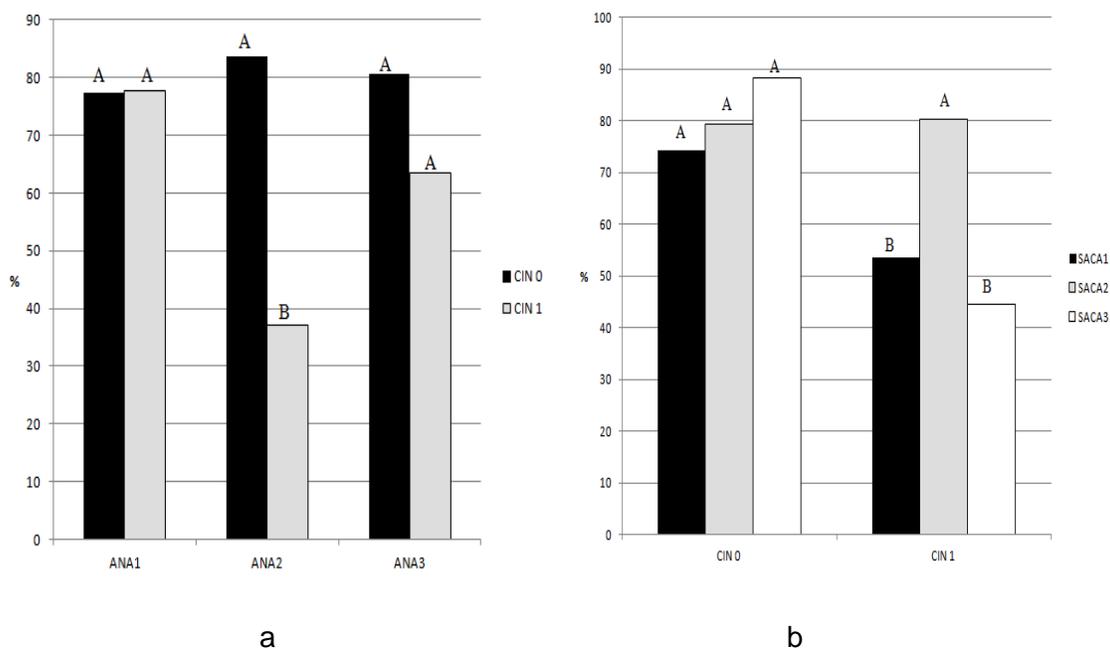


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y sacarosa en medio de cultivo MS, sobre el porcentaje de hojas cotiledonares con inducción de callo; a) Interacción ANA*Cinetina; b) Interacción Cinetina*Sacarosa. (ANA1=1,98µM; ANA2=31,9 µM; ANA3=50,0 µM; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 µM; SAC1=14,6 µM; SAC2=58,4 µM; SAC3=263,1 µM). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t| \alpha=0,05$).

La adición de cinetina al medio de cultivo redujo la inducción de embriones somáticos cuando interactuó con ANA; con 19,8 µM de ANA, con o sin cinetina, no se formaron embriones, mientras que con 31,9 µM y 50,0 µM de ANA, se observaron embriones en el 43,7% y 50% de los explantes, respectivamente, con diferencias significativas respecto a los mismos tratamientos de ANA, suplementados con 13,9 µM de cinetina (Figura 5).

La presencia de estructuras embrionarias, se caracterizó por la formación inicial de zonas callosas de color blanco en las regiones basales de las hojas cotiledonares, callos blancos, de textura gelatinosa de apariencia granular; el embrión aberrante siempre se inició con una estructura de base ensanchada, conformando el ápice caulinar y dando origen a las hojas cotiledonares, con un sistema radicular inmerso en el callo (Figura 6).

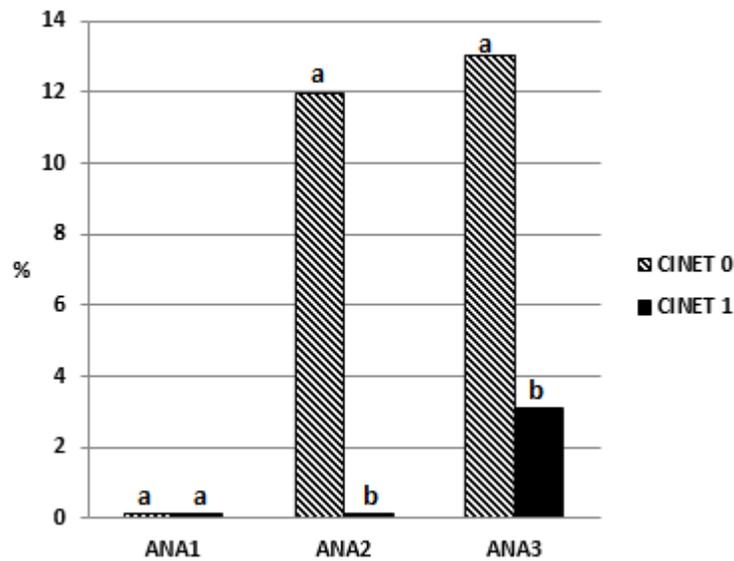


Figura 5. Efecto de la adición de cinetina sobre la acción de diferentes concentraciones de ANA (en medio MS), en la aparición de estructuras embrionarias sobre explantes de hojas cotiledonares de lulo con espinas. (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CINET0= sin cinetina; CINET1=13,9 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t| \alpha=0,05$).

Igual que en este estudio, Chakravarthi *et al.*, (2009) han reportado éxitos recientes al obtener embriogénesis somática en *S. trilobatum*, utilizando ANA o IAA y BAP o Cinetina, solas o en combinación, con diferentes explantes como nudos, hojas, ápices y segmentos internodales. La adición de Cinetina sola, al medio de cultivo MS y utilizando hojas cotiledonares como explantes produjo menos del 30% de embriogénesis, observando mayores porcentajes al utilizar hojas cotiledonares abiertas (28%) en comparación con la utilización de cotiledones no abiertos (26%). Estos valores máximos los observaron con una concentración de 13,95 μ M de Cinetina.

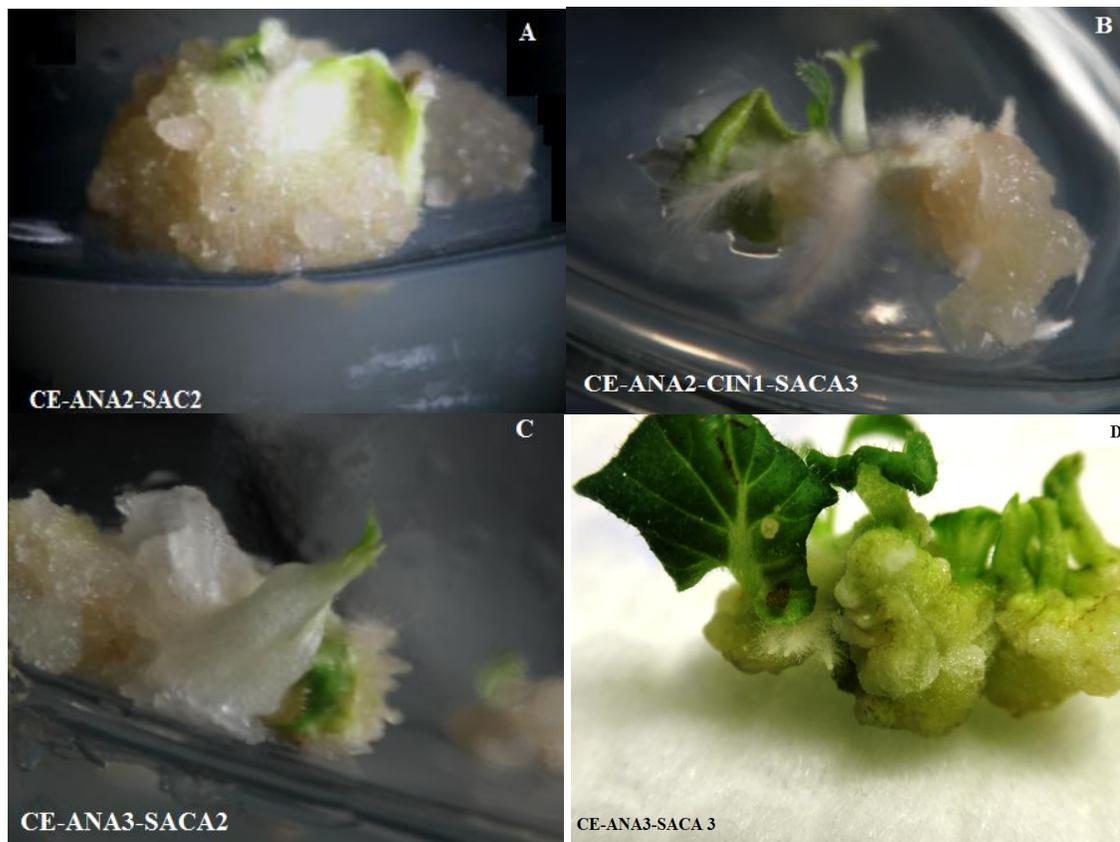


Figura 6. Estructuras embrionarias desarrolladas sobre explantes foliares de lulo con espinas (CE) obtenidas en medio MS con adición de diferentes concentraciones de sacarosa, ANA y Cinetina; a) obsérvese el aspecto granular y gelatinoso de los callos con ANA(31,9 μ M) + sacarosa(58,4 μ M); b) embriones aberrantes con sistema radicular con ANA(31,9 μ M) +Cinetina(13,9 μ M) + sacarosa (263,1 μ M); c) embrión en medio de cultivo con ANA(50 μ M) + sacarosa (58,4 μ M); d) tejido embrionario subcultivado en el medio básico (MS), suplementado con niveles bajos de fitoreguladores.

Hipocotilos. Cuando los explantes fueron hipocotilos, se observaron interacciones en la formación de raíces entre ANA*cinetina y Cinetina*sacarosa; en la aparición de callos se presentaron interacciones ANA*cinetina, mientras que en la presencia de estructuras embrionarias interactuaron ANA*Cinetina y ANA*sacarosa. Los tres factores analizados como factores simples, incidieron en la formación de raíces y estructuras embrionarias mientras que solamente la sacarosa influyó en la inducción de callos (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hipocotilos de lulo con espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		FORMACION DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	1275,93 ^{NS}	7132,22 ^{**}	1154,51 ^{**}
CINETINA	1	1724,80 ^{NS}	15438,17 ^{**}	703,12 ^{**}
SACAROSA	2	7281,65 ^{**}	6664,32 ^{**}	633,68 ^{**}
ANA*CINETINA	2	3109,08 [*]	1808,63 [*]	807,29 ^{**}
ANA* SACAROSA	4	2363,53 ^{NS}	739,26 ^{NS}	282,11 [*]
CINET*SACAROSA	2	680,66 ^{NS}	1758,57 [*]	78,12 ^{NS}
ANA*CINET*SACAR	4	547,74 ^{NS}	1047,26 ^{NS}	533,85 ^{**}
ERROR	54	885,28	458,28	78,12

** Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

* Diferencias estadísticas al nivel del 95% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

Se observó inhibición en la formación de raíces cuando se incluyó cinetina en el medio de cultivo, especialmente en las dosis media (31,9 μM) y alta de ANA (50,0 μM); esta misma condición se observó en las combinaciones de sacarosa (263,1 μM) y ANA (19,8 μM) y con sacarosa (14,6 μM) y ANA (58,4 μM). La interacción entre cinetinas y sacarosa mostró efecto inhibitorio de la Cinetina en la formación de raíces, cuando se aplicó con con altas concentraciones de sacarosa (260 μM) (Figura 7).

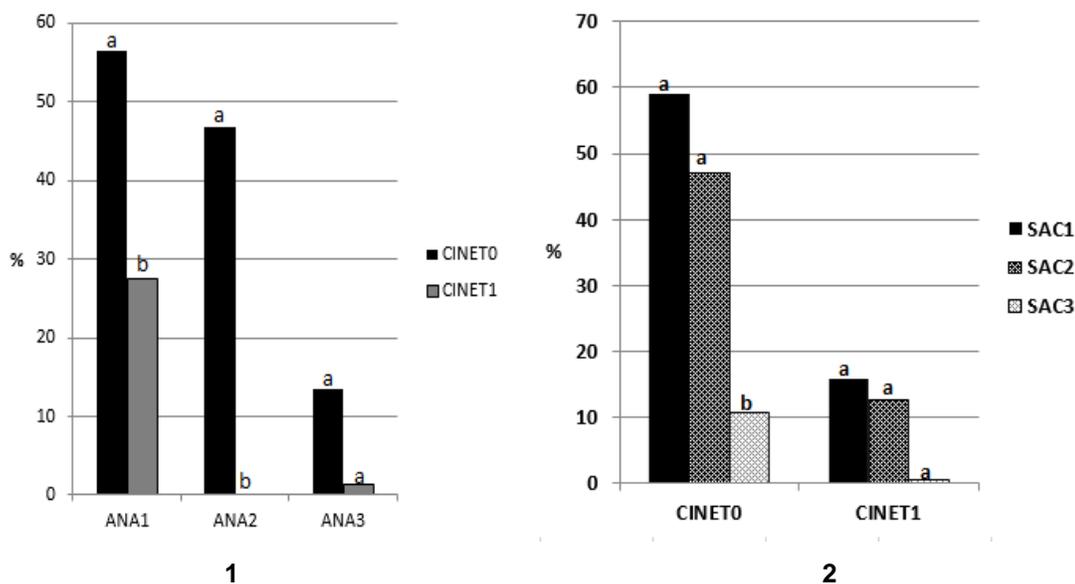


Figura 7. Inducción de raíces en hipocotilos de lulo con espinas, con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción Cinetina*sacarosa. (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 μ M; SAC1=14,6 μ M; SAC2=58,4 μ M; SAC3=263,1 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t| \alpha=0,05$).

La formación de callos en los hipocotilos, con la aplicación de los fitorreguladores ANA y Cinetina en sus diferentes combinaciones, fue alta, y solamente se determinaron diferencias estadísticas, entre los porcentajes de explantes con callo observados en la concentración media (79,3%) y baja (77,9%) de sacarosa, con los porcentajes de hipocotilos con formación de callo, obtenidos con alta concentración de sacarosa (52,6%). Esto concuerda con lo expresado por Tisserat (1985) en el sentido de que la producción de callos está relacionada directamente con la adición de auxinas al medio de cultivo, respuesta que puede incrementarse con la combinación de auxinas y citocininas; igualmente Solange *et al.*, (2002) afirman que la ausencia de reguladores en el medio de cultivo inhibe la formación de callos en comparación con tratamientos en los que se adicionaron auxinas como 2,4-D, IBA y ANA en presencia de BAP.

En cuanto a la aparición de estructuras embrionarias, evaluadas a partir de los 30 días de incubación, los mayores porcentajes de explantes con embriones (25%),

se obtuvieron con la dosis media de ANA, sin adición de cinetina; la misma dosis presentó un porcentaje de embriones superior con la dosis media (25%) y alta de sacarosa (18%) (Figura 8). Igual que con los explantes de hojas cotiledonares, los embriones de hipocotilos se originaron en callos blancos, brillantes, con apariencia gelatinosa, granular y de consistencia friable, con bases amplias, redondeadas, que se estrechan hacia el ápice caulinar, sumergidos en el cuerpo calloso (Figura 9).

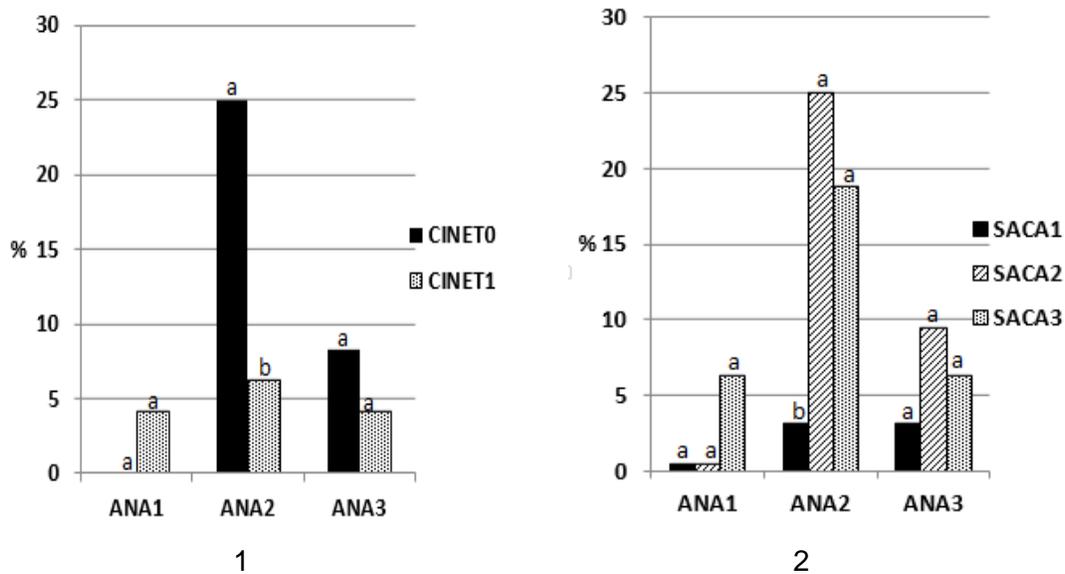


Figura 8. Formación de embriones con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción ANA*Sacarosa. (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 μ M; SAC1=14,6 μ M; SAC2=58,4 μ M; SAC3=263,1 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr > |t| \alpha = 0,05$).

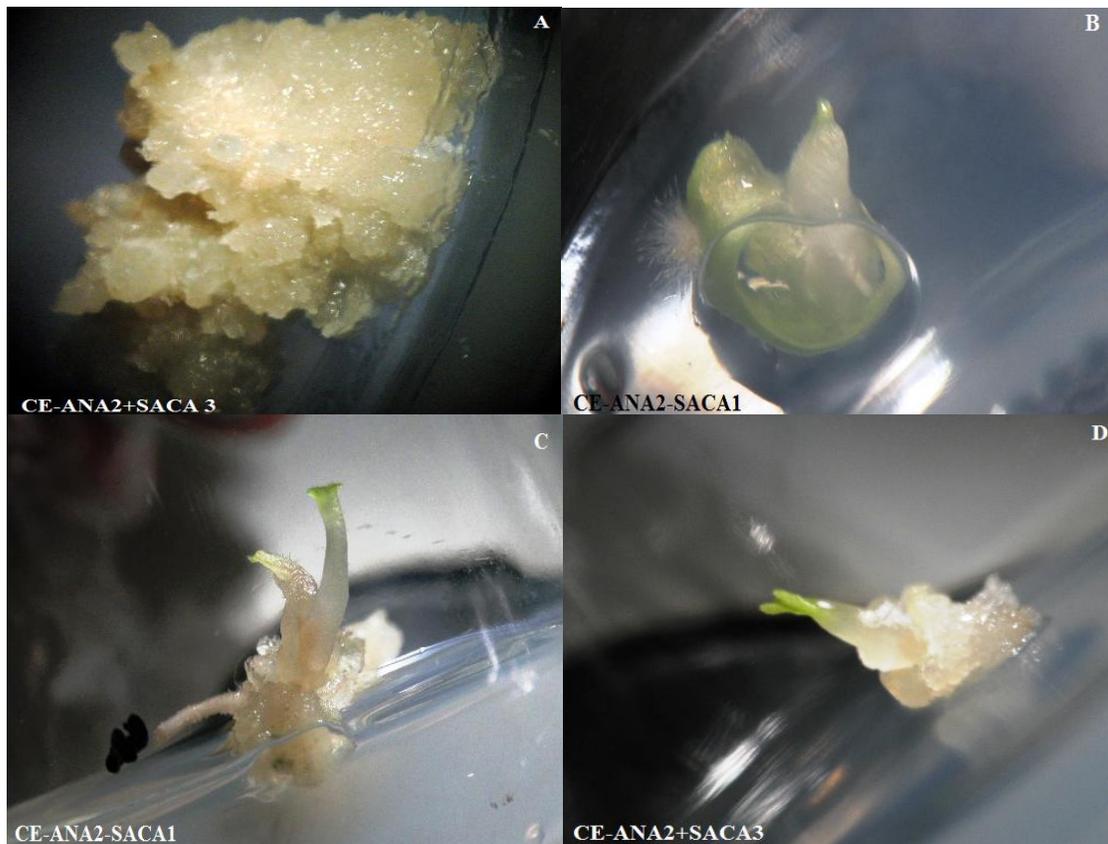


Figura 9. Desarrollo de las estructuras embrionarias observadas en hipocotilos de lulo con espinas (CE) obtenidas en medio MS suplementadas con ANA y sacarosa; a) aspecto de callos obtenidos con ANA(31,9µM) + sacarosa(50µM); b) embriones observados con ANA(31,9µM) + sacarosa (10µM); c) embrión desarrollado en medio con ANA(31,9µM) + sacarosa (10µM); d) embrión inducido con ANA(31,9µM) + sacarosa(260µM).

La concentración de sacarosa juega un rol importante en la embriogénesis somática del lulo; como se observó en este estudio y como lo reportan Merkle y Parrot (1985), altas concentraciones de sacarosa, sorbitol o ABA, inducen en las células estrés hídrico durante la inducción y crecimiento del callo embriogénico. Los mismos autores afirman que durante el estado de estrés, las células acumulan proteínas y carbohidratos que favorecen el desarrollo de las células embriogénicas e iniben la germinación precoz de los embriones somáticos; esta última afirmación no concuerda con el comportamiento observado en lulo, ya que aún con altas concentraciones de sacarosa (263,1 µM), los embriones se

germinaron en el medio suplementado con hormonas, originando embriones aberrantes de germinación precoz. Además, es posible que, como lo afirman Arahana *et al.*, (2010), callos con potencial embriogénico, no pudieran formar embriones por falta de una concentración adecuada de sacarosa, que permitiera la acumulación de nutrientes a nivel celular.

Efecto de ANA, cinetina y sacarosa en el crecimiento de explantes de lulo sin espinas (SE)

Hojas cotiledonares. Los resultados obtenidos con lulo sin espinas fueron bastante similares a los obtenidos con lulo con espinas. Los tratamientos analizados no mostraron diferencias estadísticas en cuanto a la formación de callos, pero el enraizamiento de hojas cotiledonares fue influenciado por los tres factores estudiados y por la interacción ANA*sacarosa; la inducción de estructuras embrionarias estuvo determinada por el efecto de ANA, cinetina, sacarosa y por las interacciones ANA*cinetina, ANA*sacarosa y cinetina*sacarosa (Tabla 7).

La formación de callos en los explantes de hojas cotiledonares fue alta y osciló entre 75,2% con la dosis baja de ANA (19,8 μ M) y 82,8% cuando se aplicó la dosis media (31,9 μ M) sin diferencias estadísticas en ninguno de los factores analizados. El porcentaje de explantes enraizados fue mayor sin la adición de cinetina; las concentraciones de sacarosa no afectaron los porcentajes de enraizamiento con la dosis baja de ANA, pero en las dosis media y alta, las mayores concentraciones de sacarosa redujeron significativamente el enraizamiento (Figura 10)

Tabla 7. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hojas cotiledonares de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, CINETINA y SACAROSA.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		FORMACION DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	378,54 ^{NS}	4025,06 ^{**}	1204,75 ^{**}
CINETINA	1	375,83 ^{NS}	6410,89 ^{**}	520,03 ^{**}
SACAROSA	2	903,16 ^{NS}	7392,43 ^{**}	2230,79 ^{**}
ANA*CINETINA	2	466,16 ^{NS}	446,84 ^{NS}	430,44 ^{**}
ANA* SACAROSA	4	952,55 ^{NS}	1674,93 ^{**}	534,18 ^{**}
CINET*SACAROSA	2	1707,00 ^{NS}	340,17 ^{NS}	414,82 ^{**}
ANA*CINET*SACAR	4	839,68 ^{NS}	116,50 ^{NS}	401,02 ^{**}
ERROR	54	793,33	188,54	45,37

^{**} Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

^{*} Diferencias estadísticas al nivel del 95% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

La formación de estructuras embrionarias en explantes de hojas cotiledonares de lulo sin espinas, permitió determinar que con dosis baja de ANA (19,8 μ M), la aparición de embriones es reducida (5,7%) y fue menor cuando se adicionó Cinetina (2,1%); esta frecuencia embriogénica se disparó con 31,9 μ M de ANA a 20,83%, pero se redujo significativamente cuando se adicionó cinetina al 6,2%. Sin embargo, cuando se adicionó la dosis alta de ANA (50,0 μ M), la frecuencia de aparición de embriones fue de 16,7% y se incrementó con la adición de Cinetina a 18,75%, sin diferencias estadísticas significativas (Figura 11a).

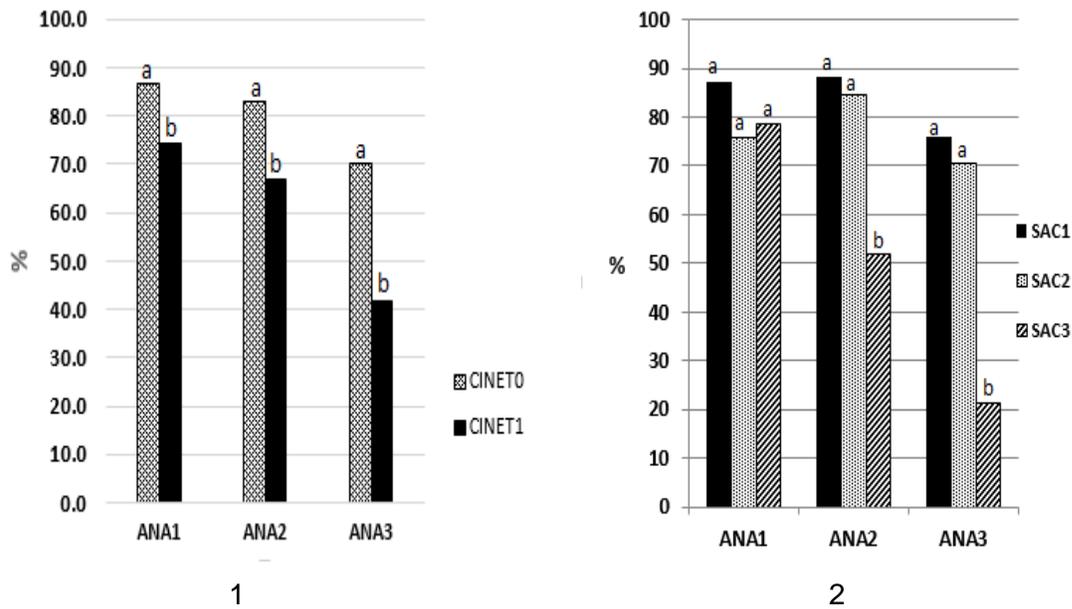


Figura 10. Enraizamiento de hojas cotiledonares de lulo sin espinas con la adición de diferentes concentraciones de ANA, Cinetina y Sacarosa; 1) interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción ANA*Sacarosa. . (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 μ M; SAC1=14,6 μ M; SAC2=58,4 μ M; SAC3=263,1 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t|$ $\alpha=0,05$).

Las concentraciones de sacarosa también afectaron la respuesta embriogénica de los explantes cotiledonares de lulo sin espinas a la incorporación de diferentes concentraciones de ANA en el medio de cultivo. Las mayores frecuencias de aparición de estructuras embrionarias se observaron con la dosis media de ANA y media y alta de sacarosa (18,7% y 21,9%, respectivamente) y con la dosis alta de ANA y dosis alta de sacarosa con un 31,25% de estructuras embriogénicas (Figura 11b).

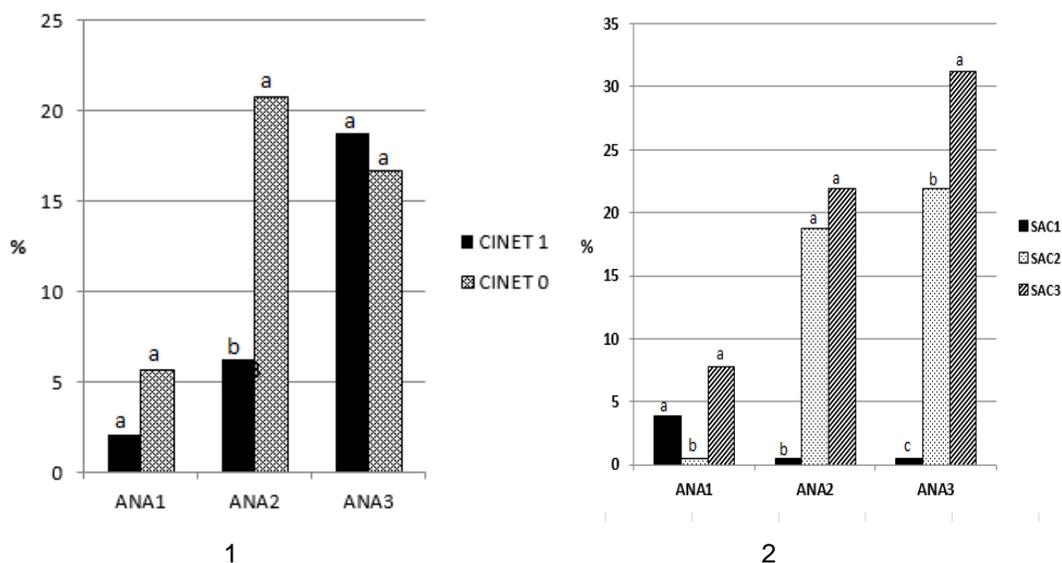


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa sobre la frecuencia de inducción de estructuras embriogénicas, en hojas cotiledonares de lulo sin espinas; 1) Interacción ANA*Cinetina y 2) Interacción ANA*Sacarosa. (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 μ M; SAC1=14,6 μ M; SAC2=58,4 μ M; SAC3=263,1 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr > |t| \alpha = 0,05$).

Hipocotilos. La respuesta de los explantes hipocotilos a las adiciones de ANA y Kinetina y diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo MS, mostró diferencias estadísticas para las concentraciones de ANA, Kinetina y sacarosa, así como para la interacción Kinetina*Sacarosa en la formación de raíces; la aplicación de ANA y Kinetina, presentó diferencias estadísticas en la formación de callos, mientras que en la formación de embriones, se observaron efectos significativos de ANA, Kinetina, Sacarosa y de las interacciones ANA*kinetina y Kinetina*Sacarosa (Tabla 8).

El análisis del efecto de la aplicación de diferentes dosis de ANA en la formación de callos en los explantes de hipocotilo presentó diferencias estadísticas significativas entre la dosis baja (89,0%) y la dosis alta (76,6%); de igual manera, la aplicación de cinetina redujo la inducción de callo en los hipocotilos con un 74,5% y con diferencias estadísticas cuando se comparó con el testigo sin cinetina, que presentó un 93,9% de callos.

Tabla 8. Análisis de varianza para las variables formación de callo (%), enraizamiento (%) y presencia de estructuras embrionarias (%) en hipocotilos de lulo sin espinas, cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de ANA, CINETINA y SACAROSA.

FV	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		FORMACION DE CALLO	ENRAIZAMIENTO (%)	ESTRUCT EMBR. (%)
ANA	2	1052,56*	7332,87**	327,69**
CINETINA	1	6749,28**	2744,17**	1353,33**
SACAROSA	2	114,82 ^{NS}	10961,97**	288,62**
ANA*CINETINA	2	76,56 ^{NS}	43,39 ^{NS}	171,44*
ANA* SACAROSA	4	753,31 ^{NS}	725,73 ^{NS}	96,57 ^{NS}
CINET*SACAROSA	2	476,63 ^{NS}	1188,45*	236,54*
ANA*CINET*SACAR	4	1376,17**	416,90 ^{NS}	155,16*
ERROR	54	328,59	305,42	51,35

** Diferencias estadísticas al nivel del 99% de probabilidad

* Diferencias estadísticas al nivel del 95% de probabilidad

^{NS} Sin diferencias estadísticas

En cuanto a la formación de raíces en los explantes hipocotilos, se observó un mayor enraizamiento con la dosis baja de ANA (58,7%) con respecto a la dosis alta que mostró un 24,9%; no se presentaron diferencias estadísticas entre las dosis baja y media (34,2%) de ANA. El análisis de la interacción Cinetina*Sacarosa, permitió determinar que en presencia de cinetina, la menor concentración de sacarosa permitió una mayor frecuencia de callos (55,5%) con diferencias estadísticas respecto a las concentraciones media (14,65%) y alta (29,1%); igualmente, la concentración media permitió un menor enraizamiento que la concentración alta; en ausencia de Cinetina, la menor concentración de sacarosa permitió mayor enraizamiento (72,3%) que la concentración media (38,3%) y que la concentración alta (25,7%), con diferencias estadísticas significativas (Figura 12).

Estudios realizados por Mir *et al.*, (2008) en *S. melongena*, mostraron que los hipocotilos, en especial su región apical, son los explantes más eficientes en su respuesta a la regeneración de plantas con un 46,39%, mientras que las hojas cotiledonares presentaron 44,87% y las raíces solo un 6,32%, resultados que

concuerdan igualmente con los observados por Sharma y Rajam (1995) en la misma especie vegetal y con Kintzios *et al.*, (2000) en *Capsicum annum*.

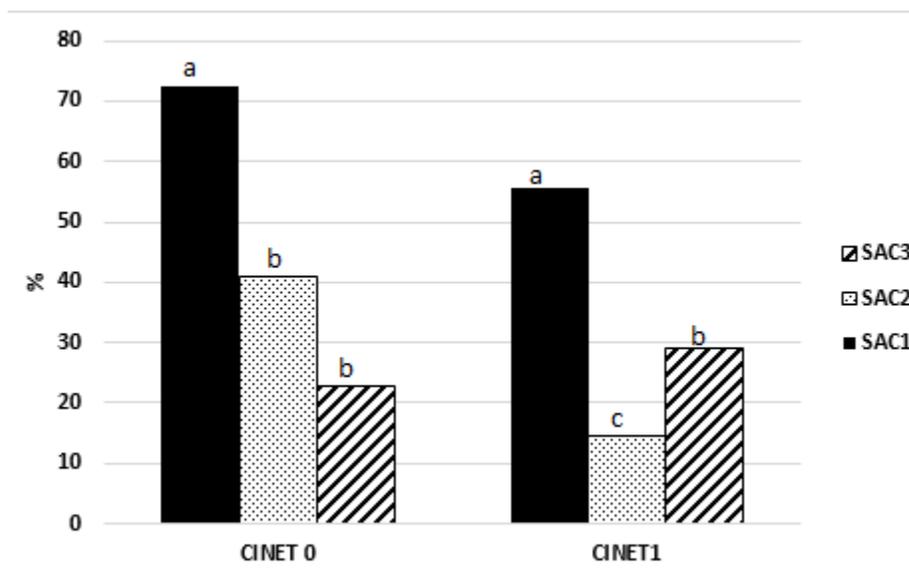


Figura 12. Efecto de la interacción Cinetina*Sacarosa sobre el enraizamiento de hipocotilos de lulo sin espinas; CINET0= sin cinetina; CINET1=13,9 μM; SAC1=14,6 μM; SAC2=58,4 μM; SAC3=263,1 μM). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. Pr>|t| α=0,05).

Cada uno de los factores estudiados (ANA, cinetina y sacarosa), afectaron significativamente el porcentaje de aparición de embriones somáticos aberrantes en el medio, con interacción entre ANA y cinetina y entre cinetina y sacarosa. En todas las concentraciones de ANA, la adición de cinetina, redujo significativamente la presencia de embriones, con excepción de la dosis baja de ANA; con las concentraciones de 31,9 μM y 50 μM de ANA se obtuvieron los mayores porcentajes de embriones somáticos (16,17% y 10,4%), con una amplia reducción cuando estas dosis se acompañaron con la aplicación de Cinetina (2,1% y 3,2%). La interacción cinetina*sacarosa solo mostró un efecto muy significativo de la sacarosa cuando no se aplicó cinetina, observándose un mayor porcentaje de embriones somáticos con 50μM y 260μM de sacarosa (12,5% y 15,6%, respectivamente), en el medio MS (Figura 13).

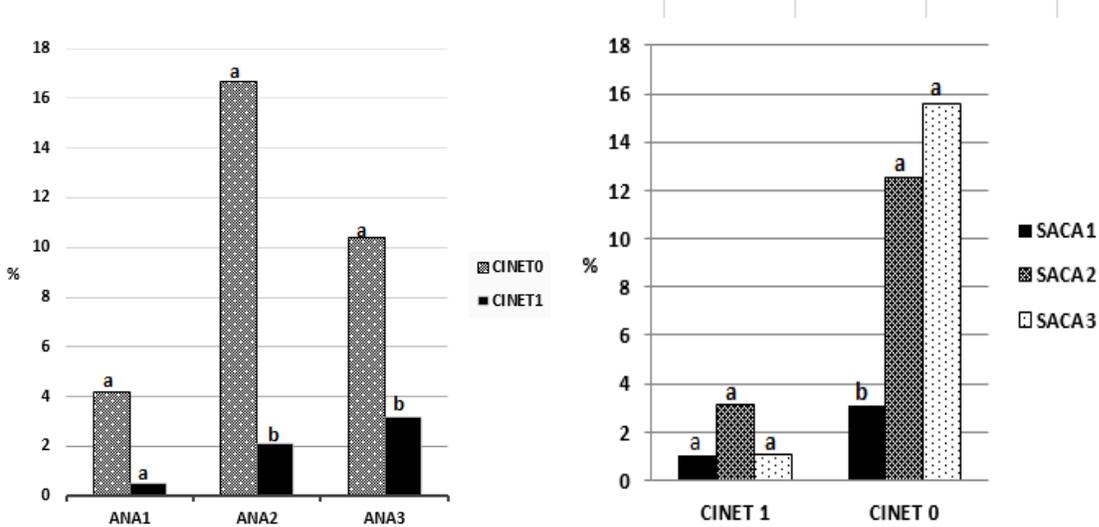


Figura 13. Efecto de diferentes concentraciones de ANA, cinetina y sacarosa, sobre la frecuencia de hipocotilos de lulo sin espinas (%) que mostraron inducción de embriones somáticos. (ANA1=1,98 μ M; ANA2=31,9 μ M; ANA3=50,0 μ M; CIN0= sin cinetina; CIN1=13,9 μ M; SAC1=14,6 μ M; SAC2=58,4 μ M; SAC3=263,1 μ M). (En cada concentración, barras con letras similares no presentaron diferencias significativas. $Pr>|t| \alpha=0,05$).

Los embriones somáticos, igual que en el lulo con espinas se originaron en callos con apariencia friable, de color blanco a crema y con apariencia granular; los embriones, que germinaron en el medio de inducción, presentaron ensanchamiento basal que culmina en el ápice donde comienzan a emerger los cotiledones y en la parte distal la radícula crece a través del callo sin alcanzar una completa independencia durante su desarrollo inicial (Figura 14). La aparición de embriones somáticos en el medio de inducción, confirma el carácter recalcitrante del lulo y la presencia de pocas células embriogénicas en medio de células diferenciadas; estas observaciones concuerdan con Santos y Fevereiro (2000), cuando expresan que en un mismo callo, pueden coexistir células con capacidad embriogénica y células no embriogénicas. Según González *et al.* (2005), las células embriogénicas proceden de células meristemáticas y de su división en tejidos meristemáticos específicos, conformados por células permanentemente embrionarias.

Cuando se eliminaron del medio los reguladores, los callos se fenolizaron y posteriormente se necrosaron, sin obtener la proliferación celular y formación de estructuras embrionarias esperada, lo cual hace evidente la ausencia de

volúmenes significativos de células embrionarias en el tejido, fallando en este caso la etapa inductiva con la adición de ANA, Cinetina y diferentes concentraciones de sacarosa, probadas como eficientes en la inducción embriogénica de otras especies solanáceas como *S. melongena* (Kantharajah y Golegaonkar, 2004; Matsuoka e Hinata, 1979), *Solanum tuberosum* (JayaSree *et al.*, 2001), *S. betacea* (Arahana *et al.*, 2011) y *Lycopersicon esculentum* (Chandel y Katiyar, 2000); se corrobora con estos resultados, lo expresado por Litz y Gray (1995) en el sentido de que los patrones de respuesta de los tejidos, están determinados epigenéticamente y están influenciados por el estado de desarrollo de la planta donante.

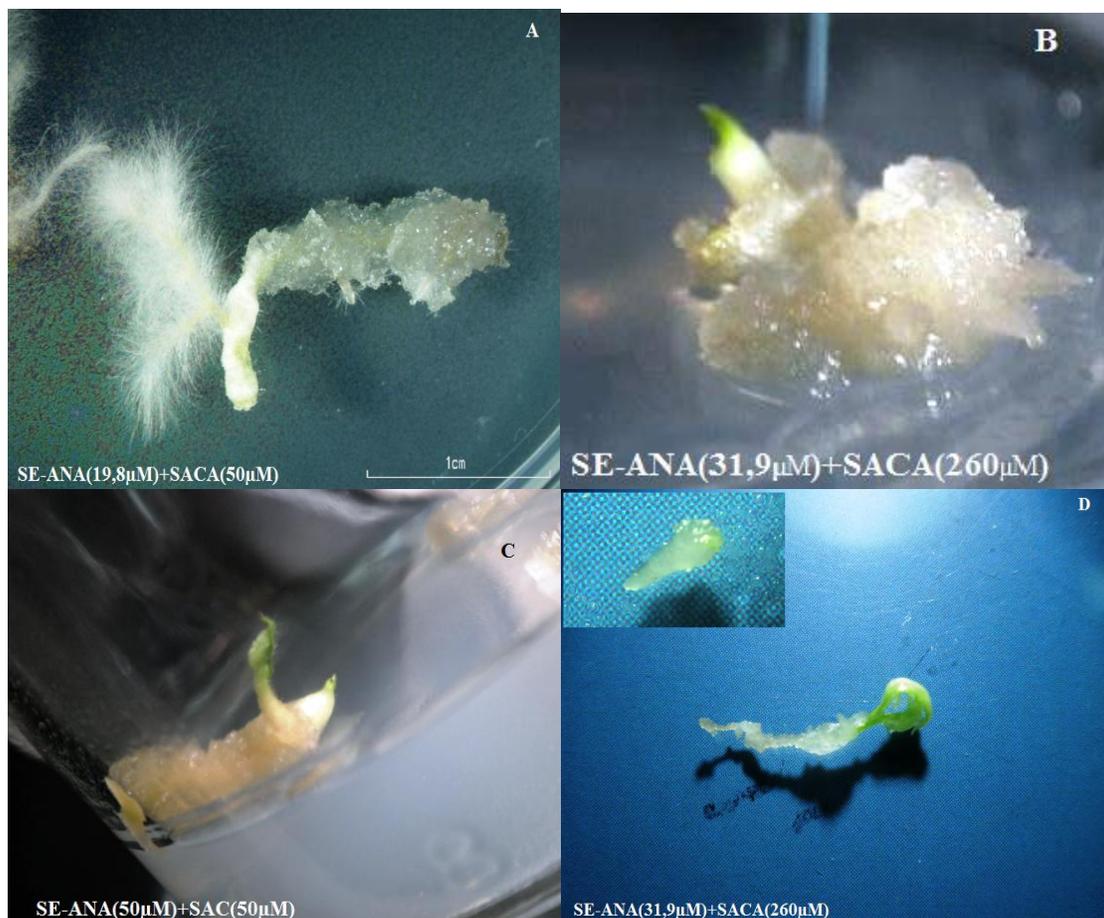


Figura 14. Observación del desarrollo de callos, raíces y embriones somáticos inducidos en hipocotilos de lulo sin espinas (SE) en medio MS con adición de diferentes concentraciones ANA y sacarosa. A) Callo y raíces; B y C) callos con estructura embrionaria. D) Embrión tipo torpedo y embrión germinado, separados del callo de formación.

Conclusiones

En condiciones de oscuridad, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog, se pudo establecer las siguientes conclusiones:

El lulo puede considerarse una especie recalcitrante que no responde adecuadamente a protocolos exitosos para la obtención de embriogénesis somática en otras solanáceas; en todos los tratamientos se observó una baja frecuencia de embriones germinados en el mismo medio de inducción.

La dosis baja de ANA ($10,7\ \mu\text{M}$), indujo el mayor porcentaje de callos en hojas cotiledonares de lulo con y sin espinas; este porcentaje decreció al incrementarse la concentración hormonal. Similar comportamiento se observó al incrementar la dosis de BAP.

Cuando los explantes fueron hipocotilos, el tamaño de los callos se disminuyó con la adición de $13,0\ \mu\text{M}$ de BAP y ANA ($21,5\ \mu\text{M}$ y $48,3\ \mu\text{M}$); igualmente, el enraizamiento de los explantes sufrió una reducción significativa con el incremento de las dosis de ANA.

La adición de dosis crecientes de ANA en el medio de cultivo MS, con explantes de hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo con espinas, produjo la reducción del enraizamiento de los explantes; de igual manera, la adición de $13,0\ \mu\text{M}$ de cinetina redujo significativamente la inducción de raíces.

Cuando se utilizaron hojas cotiledonares de lulo con espinas, las mayores frecuencias de estructuras embrionarias se observaron en el medio de inducción con adiciones de ANA ($31,9\ \mu\text{M}$ y $50\ \mu\text{M}$) y sacarosa ($50\ \mu\text{M}$ y $260\ \mu\text{M}$), 30 días después de la siembra, los cuales son de fácil reproducción en medio MS. Igual resultado se obtuvo con hipocotilos y la adición de ANA ($31,9\ \mu\text{M}$) + sacarosa

(58,4 μM y 263,1 μM). En ambos tipos de explante, la adición de Cinetina redujo la formación de estas estructuras.

La inducción de raíces en hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo sin espinas fue mayor con ANA (19,8 μM); en el primer explante, el enraizamiento se redujo significativamente con la adición de Cinetina (13,9 μM) y con dosis altas de sacarosa (58,4 μM y 263,1 μM).

Los explantes de hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo sin espinas, indujeron los mayores porcentajes de formación de embriones cuando el medio MS se suplementó con ANA (31,9 μM) sin Cinetina y con altas concentraciones de sacarosa en el medio (263,1 μM).

La eliminación de los contenidos hormonales del medio de cultivo, causó detención del crecimiento y necrosis de los callos, eliminando totalmente la posibilidad de obtener un proceso embriogénico recurrente.

Agradecimientos.

Los autores desean expresar su gratitud a la Universidad Nacional de Colombia, a la Universidad de Nariño, al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), en especial a los Dres. Mariano Toribio Iglesias y Jesús Alegre por su muy acertada orientación.

esultado se obtuvo con hipocotilos y la adición de ANA (31,9 μM) + sacarosa (58,4 μM y 263,1 μM). En ambos tipos de explante, la adición de Cinetina redujo la formación de estas estructuras.

La inducción de raíces en hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo sin espinas fue mayor con ANA (19,8 μM); en el primer explante, el enraizamiento se redujo

significativamente con la adición de Cinetina (13,9 μM) y con dosis altas de sacarosa (58,4 μM y 263,1 μM).

Los explantes de hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo sin espinas, indujeron los mayores porcentajes de formación de embriones cuando el medio MS se suplementó con ANA (31,9 μM) sin Cinetina y con altas concentraciones de sacarosa en el medio (263,1 μM).

La eliminación de los contenidos hormonales del medio de cultivo, causó detención del crecimiento y necrosis de los callos, eliminando totalmente la posibilidad de obtener un proceso embriogénico recurrente.

Agradecimientos.

Los autores desean expresar su gratitud a la Universidad Nacional de Colombia, a la Universidad de Nariño, al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), en especial a los Dres. Mariano Toribio Iglesias y Jesús Alegre por su muy acertada orientación.

3.Efecto del número de subcultivos sobre la variabilidad somática de plántulas obtenidas por embriogénesis somática de lulo (*Solanum quitoense* Lam.)

Resumen

A pesar de la importancia que tiene el lulo como frutal de clima medio y frío moderado, los múltiples problemas, principalmente de tipo sanitario y la ausencia de cultivares resistentes o tolerantes a enfermedades, hacen que su cultivo sea cada vez menos atractivo para los productores. La implementación de un paquete tecnológico que involucre la creación de nuevos y mejores cultivares, requiere estudiar protocolos de regeneración de plantas que garanticen el mantenimiento de la fidelidad genética del cultivar producido. La embriogénesis somática y la multiplicación in vitro de plantas son aspectos que deben establecerse, para la implementación de programas de mejoramiento sostenibles. Con el objeto de analizar estos procesos y su efecto sobre la variabilidad genética de plántulas de lulo con espinas (*S. quitoense* var. *septentrionale*) y sin espinas (*S. quitoense* var. *quitoense*) se planteó el presente estudio que, mediante el empleo de plantas regeneradas por vía de embriogénesis somática, se sometieron a diferente número de subcultivos. La variabilidad se evaluó utilizando marcadores microsatélites amplificados al azar (RAMs). Se analizaron siete cebadores que generaron un patrón de 115 bandas en lulo con espinas y 110 en lulo sin espinas. En lulo con espinas se obtuvo una heterocigosidad inesgada de 0,24 y un polimorfismo del 56,5%, con una distancia mínima (0,13) entre los tratamientos con un subcultivo (control) y con cinco subcultivos y máxima (0,51) entre el control y el tratamiento con seis subcultivos. En lulo sin espinas la heterocigosidad inesgada fue de 0,18 con un polimorfismo de 43,6%; la distancia inesgada (0,11) se encontró entre los tratamientos control y tres subcultivos y la máxima (0,51) entre el control y cuatro subcultivos.

Palabras clave: marcadores moleculares, RAMs, polimorfismo, heterocigosidad, distancia genética inesgada, variabilidad genética.

Effect of number of subcultures on the variability of seedlings obtained by somatic embryogenesis of lulo (*Solanum quitoense* Lam.)

Abstract

Despite the importance of the lulo as a medium and moderately cold weather fruit, the many problems, mainly of health and the absence of cultivars resistant or tolerant to diseases, make its cultivation is becoming less attractive to producers. The implementation of a technology package involving the creation of new and improved cultivars, requires studying plant regeneration protocols, to ensure the maintenance of genetic fidelity of cultivar produced. Somatic embryogenesis and in vitro multiplication of plants, are aspects that should be established for the implementation of sustainable breeding programs. In order to analyze these processes and their effect on the genetic variability of lulo with spines (*S. quitoense* var. *septentrionale*) and spineless (*S. quitoense* var. *quitoense*) was carried out this study, by using plants regenerated via somatic embryogenesis underwent different number of subcultures. The variability was evaluated using random amplified microsatellite markers (RAMs). were analyzed seven primers which generated a pattern of 115 bands to lulo with spines and 110 bands in spineless lulo. In lulo with spines was obtained unbiased heterozygosity of 0.24 and a 56.5% of polymorphism, with a minimum distance (0.13) between treatments with a subculture (control) and five subcultures and max (0, 51) between the control and the treatment with six subcultures. In spineless lulo the unbiased heterozygosity was 0.18, with a polymorphism of 43.6%; the distance unbiased (0.11) was found between the control treatments and three subcultures and the maximum (0.51), between control and four subcultures.

Keywords: molecular markers, RAMs, polymorphism, heterozygosity, genetic distance unbiased, genetic variability

Introducción

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), es un frutal andino de grandes posibilidades para su comercio exterior, debido a sus propiedades organolépticas y altos contenidos de antioxidantes, que lo califican como un frutal altamente promisorio (Lobo, 2006). El cultivo de lulo en Colombia, tiene serias limitaciones por el bajo nivel tecnológico, lo cual incrementa los problemas generados por su gran susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades (Muñoz, 2011); los éxitos logrados por los programas de mejoramiento orientados a obtener genotipos resistentes o tolerantes a los problemas sanitarios, se ven limitados por la condición de alogamia de esta especie (Lobo, 2006) y la diversidad de cultivares sembrados en áreas reducidas (Muñoz, 2011). Esta condición hace que la disponibilidad de métodos eficientes de multiplicación de plantas, que conserven la fidelidad genética de los padres superiores, sea de primordial importancia.

La propagación por estacas es posible pero no recomendada por su baja eficiencia, alto costo y por ser un vector de transmisión de enfermedades (García *et al.*, 2007), por lo cual es necesario recurrir técnicas de micropropagación *in vitro*, que garanticen no solo la regeneración masiva, sino la calidad genética de las plantas propagadas. En lulo se han desarrollado técnicas de regeneración de plantas a partir de pecíolos (Segovia 2002) y segmentos de hoja (Hendrix *et al.*, 1987); sin embargo, se desconoce la incidencia de la técnica sobre la fidelidad genética del material producido, ya que la variación somaclonal ocurre con frecuencia en muchas especies, como resultado de los procesos de micropropagación (Thomas *et al.*, 2006; Rout *et al.*, 2000). Esta variación produce plantas fuera de tipo, que reducen el valor comercial de las plantas producidas (Oh *et al.*, 2007).

La variación somaclonal, producto del cultivo de tejidos clonales, puede ser epigenética o genética; generalmente los cambios epigenéticos son producto de

fenómenos de metilación del ADN que inducen la expresión de genes normalmente silenciosos (Kaepler *et al.*, 2000), son cambios inestables que pueden desaparecer cuando la planta es retirada del medio de cultivo o después de pocas generaciones, mientras que la variación genética es estable y hereditaria (Kaepler *et al.*, 2000; Skirvin *et al.*, 1993)

La variación somaclonal involucra cambios en la estructura y número de cromosomas, mutación de genes, activación de transposones, cruzamientos somáticos, intercambio de cromátidas hermanas, ampliación y delección del ADN, cambios en el patrón de metilación, cambios en los ADN cloroplástico y mitocondrial (Bennici *et al.*, 2004; Jain y De Klerk, 1998; Karp, 1995) y pueden ser heredables o no heredables (Anu *et al.*, 2004; Sahijram *et al.*, 2003; Larkin y Scowcroft, 1981). En general, se considera que el cultivo de tejidos genera por sí solo variabilidad genética, incrementando la frecuencia de mutaciones; sin embargo, autores como Meins (1983) y Vasquez (2001), sugieren que la inestabilidad genética es altamente influenciada por el genotipo.

Son muchos los factores que determinan la variabilidad somática durante los procesos de cultivos *in vitro* como: 1.- genotipo de la planta donante; 2.- origen del explante; 3.- la composición del medio; 4.- frecuencia de los subcultivos; 5.- edad del cultivo y 6.- reguladores de crecimiento (Bennici *et al.*, 2004; Brar y Jain, 1998). Cardone *et al.*, (2010) adicionan a estos factores el tiempo de permanencia del explante en el medio de cultivo y del sistema de regeneración, afirmando que la embriogénesis somática podría generar menos alteraciones que la organogénesis (Hernandez, 2007).

La variación somaclonal puede detectarse mediante la observación de cambios fenotípicos (García-Aguila *et al.*, 2007; Zalewska *et al.*, 2007; Israeli *et al.*, 1991) o por medio de marcadores bioquímicos y moleculares, que pueden ser herramientas valiosas, para detectar la variación somaclonal a nivel de ADN (Bhattacharya *et al.*, 2010; Cardone *et al.*, 2010; Peredo *et al.*, 2009; Chuang *et*

al., 2009; Sanchez-Chiang y Jiménez, 2009; Bairu *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2004; Damasco *et al.*, 1996)

Los marcadores moleculares basados en el ADN analizan segmentos codificantes o no codificantes, representativos del genoma completo, identificando polimorfismos o diferencias entre individuos (Sanchez-Chiang y Jiménez, 2009; Agarwal *et al.*, 2008; Azofeita-Delgado, 2006); a pesar de que estos marcadores se emplean principalmente en estudios de diversidad, su uso es muy común en estudios de variabilidad somática (Bhattacharya *et al.*, 2010; Cardone *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2007; Bhatia *et al.*, 2004; Bennici *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2004; González *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; Araújo *et al.* 2001; Aronen *et al.*, 1999)

El uso de marcadores moleculares como RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) y ISSR (Inter simple sequence repeat), para la detección de variación somaclonal, es frecuente, porque pueden caracterizarla con gran precisión y menos dificultad que los análisis de cariotipo y que los fenotípicos (Sanchez-Chiang y Jimenez, 2009; Soneji *et al.*, 2002; Polanco y Ruiz, 2002); los microsatélites, son importantes en estudios de caracterización individual y mapeo genómico y son muy utilizados por su alto nivel de polimorfismo, carácter codominante, facilidad de aplicación y alta reproducibilidad (Muñoz *et al.*, 2008), presentando un poder de discriminación siete veces mayor que los RAPD (Kraic *et al.*, 1998).

Zietkiewicz *et al.*, (1994) propusieron un método que combina las ventajas de los microsatélites con los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que no requiere determinar una cantidad exacta de ADN antes de la reacción, es una técnica de bajo costo y no requiere de conocimiento previo de secuencias, ni uso de isótopos radioactivos. Hantula *et al.* (1996) seleccionaron cuatro “primers” (GT, ACA, CCA, CGA) con 18 bases de longitud que incluyen un extremo 5’

“degenerado” de tres nucleótidos, que sirve de gancho para asegurar la unión del “primer” al inicio del microsatélite y denominaron a la técnica como RAMs (Random Amplified Microsatellites) (Muñoz *et al.*, 2008). Según Mahuku *et al.*, (2002), con los marcadores RAMs se estudian poblaciones, se evalúa la diversidad genética de seres vivos y se determina la base de variación de los individuos. Además, permite seleccionar regiones de ADN y el número de polimorfismos detectables, es teóricamente ilimitado.

Con base en lo anterior, el presente trabajo se propuso evaluar la fidelidad genética de plantas de lulo con espinas (*Solanum quitoense* Lam. var. *septentrionale*) y de lulo sin espinas (*Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense*), obtenidas a partir de embriones somáticos y sometidos a sucesivos subcultivos.

Materiales y métodos

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, se obtuvieron plántulas de lulo con espinas y sin espinas, obtenidas por vía embriogénica en medio MS suplementado con ANA; se subcultivaron cada 30 días, durante un periodo de ocho meses el lulo con espinas y durante cuatro meses el lulo sin espinas. Se tomaron muestras foliares de plantas de cada generación para la extracción del ADN según el protocolo propuesto por Dellaporta *et al.* (1983), visualizándolo en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio y utilizando como referencia, diluciones de ADN de fago lambda (Sigma, St Louis, MO, USA). El ADN se llevó a una concentración final de 10 ng/μL para la evaluación de los cebadores microsatélites seleccionados. Los tratamientos analizados correspondieron al número de subcultivos realizados en cada una de las variedades, ocho para el lulo con espinas y cuatro para el lulo sin espinas.

En las reacciones de amplificación se probaron ocho cebadores pero se utilizaron solo siete, ya que el cebador CGA no amplificó en ninguna muestra; los cebadores, así como la secuencia de cada uno de ellos, se indican en la Tabla 1.

Las condiciones de hibridación y amplificación, se establecieron según el cebador seleccionado (Tabla 2); los productos se separaron y visualizaron en geles de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida-bisacrilamida) corridos a 160 V durante 1h y 10 minutos, teñidos con bromuro de etidio y sales de plata, tal como lo describen Sambrook *et al.*, (1989).

Tabla 1. Cebadores y secuencias utilizadas en la técnica RAMs para determinar la estabilidad genética de plántulas de lulo sometidas a subcultivos periódicos.

CEBADOR	SECUENCIA 5' A 3'
CT	DBDCTCTCTCTCTCTC
CGA	DHBCGACGACGACGACGA
CA	DBDACACACACACACACA
AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGAG
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGTGT
CCA	DDBCACCACCACCA
GT	VHV GTG TGT GTG TG
ACA	BDB ACA ACA ACA ACA ACA

Designaciones usadas para los sitios degenerados: H (A o T o C); B (G o T o C); V (G o A o C) y D (G o A o T).

Tabla 2. Condiciones de hibridación y amplificación para RAMs de los cebadores seleccionados.

CICLO	TEMPERATURA(°C)			TIEMPO (CEBADOR)			ETAPA
	AG	TG	GT	AG	TG	GT	
	CA	CT	CGA	CA	CT	CGA	
	ACA	CCA		ACA	CCA		
1		95			5 min.		Desnaturalización inicial
2		95			30 seg.		Desnaturalización
3	50	55	58		45 seg.		Hibridación
4		72			2 min.		Extensión
5	37	ciclos	desde	el	paso	2	
6		72			7 min.		Extensión final
7		16			5 min.		Fin

En cada uno de los geles se identificaron las bandas bien definidas para generar así una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0). Con base en esta matriz,

se realizaron análisis descriptivos y se establecieron distancias genéticas y de similitud. A través del criterio de la mínima distancia insesgada (Nei, 1978), se hizo un análisis de clasificación con el método UPGMA; estos análisis fueron realizados utilizando el programa TFPGA (Tools For Population Genetic Analysis) descrito por Miller (1997).

Resultados y discusión

Los siete cebadores analizados generaron un patrón de 115 bandas en lulo con espinas y 110 bandas en lulo sin espinas, con pesos moleculares entre 1400 y 200 pb; el número de bandas para los cebadores estuvo entre 12, para el cebador TG, y 25 para CA (Fig. 1).

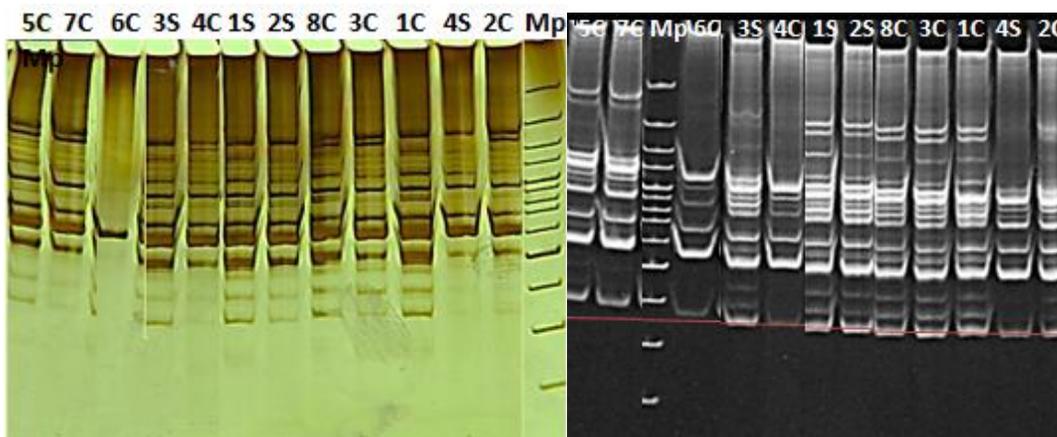


Figura 1. Patrones de bandas generadas con los primer RAMS CCA y CT en plántulas de lulo con espinas (C) (*Solanum quitoense* Lam.) y de lulo sin espinas (S), regeneradas a partir de embriones somáticos y diferente número de subcultivos (El número de subcultivos se indica en la parte superior).

En lulo con espinas se observó una heterocigocidad insesgada promedio de 0,24 y un porcentaje de polimorfismo del 56,52%; la similitud entre la muestra control, correspondiente a plántulas con un subcultivo y los tratamientos con cinco y seis subcultivos presentó valores entre 0,87 y 0,60, respectivamente; de igual forma, el cálculo de la distancia insesgada (Nei, 1978) mostró valores

comprendidos entre 0,13 (control y plántulas de cinco subcultivos) y 0,51 entre el control y plántulas de seis subcultivos (Tabla 3); este último tratamiento se alejó de los demás con valores entre 0,30 y 0,52. El análisis de clasificación mostró la conformación de siete nodos que incluyen a todos los tratamientos (Fig. 2); si se consideran los valores observados de heterocigosidad incesgada, polimorfismo y distancia genética, los tratamientos presentaron variabilidad genética, con tendencia a incrementarse a medida que se aumenta el número de subcultivos.

Tabla 3. Matriz de distancia genética (encima de la diagonal principal) y similitud incesgadas (debajo de la diagonal principal) (Nei, 1978), obtenidas en plántulas de lulo con espinas provenientes de embriones somáticos con diferente número de subcultivos.

TRAT	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-----	0,18	0,20	0,28	0,14	0,51	0,20	0,16
2	0,83	-----	0,17	0,14	0,19	0,47	0,17	0,12
3	0,81	0,84	-----	0,26	0,15	0,52	0,25	0,15
4	0,75	0,87	0,76	-----	0,24	0,30	0,27	0,24
5	0,87	0,82	0,86	0,78	-----	0,49	0,13	0,13
6	0,60	0,62	0,59	0,74	0,61	-----	0,47	0,49
7	0,81	0,84	0,77	0,76	0,88	0,62	-----	0,15
8	0,85	0,88	0,86	0,78	0,88	0,60	0,86	-----

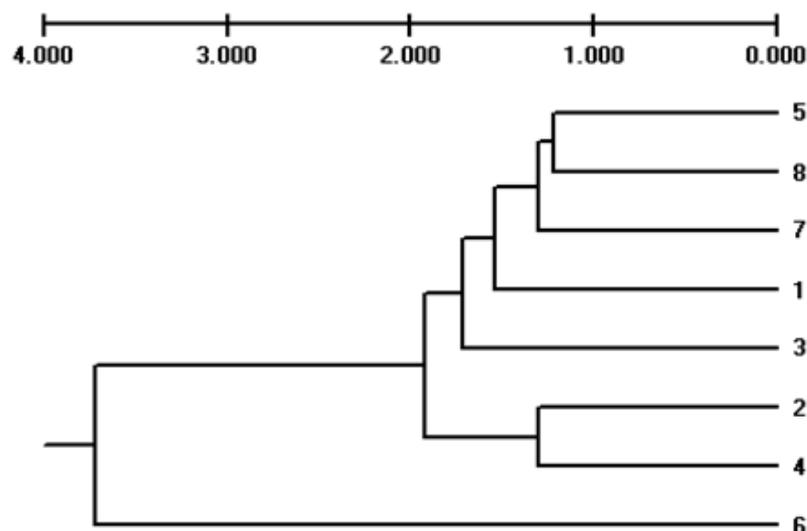


Figura 2. Dendrograma obtenido bajo el criterio de agrupamiento UPGMA, de los tratamientos correspondientes a diferente número de subcultivos in vitro de plántulas de lulo con espinas, con base en datos aportados por siete cebadores RAMs.

En los tratamientos correspondientes a subcultivos de plántulas de lulo sin espinas, obtenidas a partir de embriones somáticos, se presentó una heterocigosidad incesgada de 0,18 y un porcentaje de polimorfismo del 43,6%; el tratamiento control (1 subcultivo) mostró menores distancias con plántulas de dos y tres subcultivos (0,22 y 0,20 respectivamente), mientras que con el tratamiento de cuatro subcultivos, mostró una distancia de 0,51, lo cual permite inducir que el lulo sin espinas es genéticamente más sensible que el lulo con espinas, a la micropropagación recurrente. El tratamiento Control presentó similitudes genéticas de 0,80, 0,81 y 0,60 con respecto a los tratamientos con dos, tres y cuatro subcultivos, respectivamente (Tabla 4). El análisis de clasificación (Fig. 3), mostró a los tratamientos con dos y tres subcultivos como los más próximos (0,11) en el primer nodo, los cuales sumados al tratamiento control, conforman un segundo nodo ubicado a una distancia de 0,21, quedando distante el tratamiento con cuatro subcultivos ubicado en el nodo correspondiente a una distancia de 0,37.

Tabla 4. Matriz de distancia genética (encima de la diagonal) de Nei (1978) y similaridad (debajo de la diagonal) obtenidas en plántulas de lulo sin espinas provenientes de embriones somáticos con diferente número de subcultivos.

TRATAM	1	2	3	4
1	-----	0,22	0,20	0,51
2	0,80	-----	0,11	0,29
3	0,81	0,89	-----	0,31
4	0,60	0,74	0,72	-----

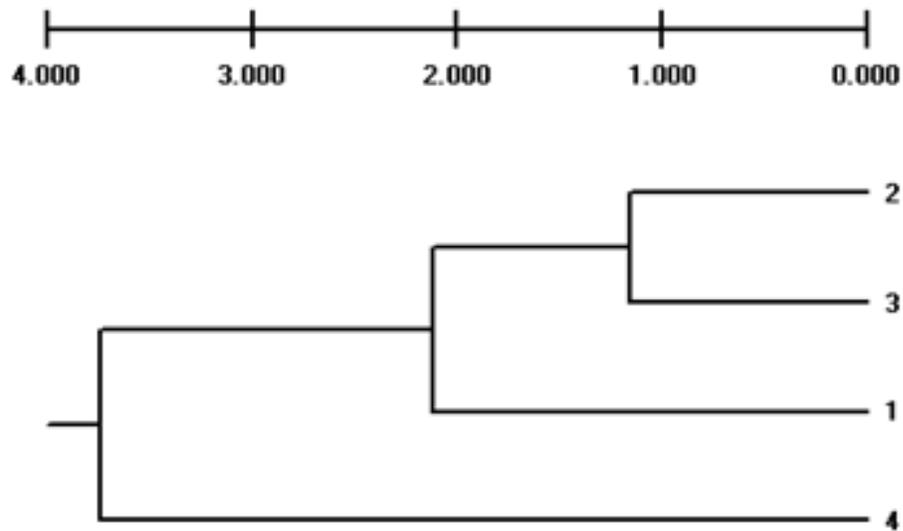


Figura 3. Dendrograma bajo el criterio de agrupamiento UPGMA de los tratamientos correspondientes a diferente número de subcultivos in vitro de plántulas de lulo sin espinas, con base en datos aportados por siete cebadores RAMs.

Si bien hasta el presente no se han reportado estudios moleculares sobre la variabilidad del lulo, obtenido por métodos de micropropagación in vitro, la metodología empleada (RAM's) muestra un amplio potencial en la definición de variabilidad, una metodología con amplias ventajas, si se compara con técnicas como RAPD's o como AFLP's, relacionadas con su bajo costo y su alto nivel de polimorfismo, al combinar las funciones de los microsatélites con las de los RAPD's (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2008).

Según Bhatia *et al.* (2004), la micropropagación de plantas in vitro puede inducir cambios genéticos y epigenéticos; estos cambios son atribuidos a posibles variaciones en la metilación del ADN. Sin embargo, en trabajos realizados con *L. esculentum* cv. Moneymaker, se estudiaron los patrones de metilación del ADN de callos y se compararon con la metilación del DNA de plantas testigo, sin encontrar diferencias significativas; estos datos han sido confirmados igualmente

por DeLanghe y DeBruijne (1976) quien analizó plantas provenientes de callos de dos años con 30 subcultivos, sin encontrar variaciones significativas.

De igual manera, Soniya *et al.*, (2001), estudió la estabilidad genética de plantas de tomate originadas en cultivo de tejidos, con medios enriquecidos con picloram, BAP y citoquininas y utilizando marcadores RAPD. De 15 bandas generadas, tres fueron compartidas y 12 polimórficas, estimando además un coeficiente de similaridad genética del 95% con respecto a la planta madre. De 10 plantas regeneradas, solamente una fue diferente.

La variabilidad observada en ambos genotipos no puede atribuirse únicamente al número de subcultivos, ya que existen aspectos no controlables en este estudio como la variabilidad intracelular (Sahijram *et al.*, 2003) y la variabilidad que pudo inducirse en los procesos previos de embriogénesis somática (Feuser, 2003; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Cardone *et al.*, 2010); sin embargo, la tasa de multiplicación o número de subcultivos, es una de las causas que se ha identificado como fuente importante de variación somaclonal, en la producción in vitro de plantas (Cote *et al.*, 1993; Cardone *et al.*, 2010). En banano, Sahijram *et al.* (2003) afirman que la variación somaclonal puede aparecer después de tres a ocho subcultivos; Bairu *et al.*, (2006) demostraron una alta correlación entre el número de subcultivos y la variación somaclonal de plantas de banano Cavendish, donde plantas con diez subcultivos mostraron una variación del 70% con relación a plantas con cinco subcultivos, que presentaron una variación del 10%; en lulo, se observa claramente un mayor distanciamiento entre los tratamientos con mayor número de subcultivos (seis en lulo con espinas y cuatro en lulo sin espinas) y el control.

La variabilidad observada en los diferentes tratamientos, puede tener varias causas relacionadas no solo con el número de subcultivos, sino con otros factores propios del cultivo in vitro (Karp, 1995), como son la constitución genética del explante, el tipo y la concentración hormonal en el medio, el método de cultivo, la

edad del explante y la condición ambiental (Patiño, 2010; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Jelenic *et al.*, 2001; Brar y Jain, 1998). De igual manera, Qin *et al.* (2007) afirman que el cultivo de plantas in vitro puede generar variación somaclonal, a menudo heredable e indeseable en la clonación de plantas.

Igualmente, es necesario tener en cuenta que en la fase de embriogénesis somática, previa a la multiplicación, las plántulas pasaron por una fase de desdiferenciación e inducción de callo que pudo incrementar la variabilidad somaclonal, ya que según lo expresan Qin *et al.* (2007), Sánchez *et al.*, (2003) y Leroy *et al.* (2001), las plantas regeneradas a partir de callos no organizados pueden presentar mayores variaciones genéticas que aquellas regeneradas directamente. Según Molina y García (1998), cuando se inicia la división celular a partir de tejidos diferenciados que originan inicialmente un callo, hay mayor riesgo de inestabilidad cromosómica y los números cromosómicos varían como producto de la fragmentación nuclear y mitosis de los fragmentos nucleares, combinada con la mitosis normal de los núcleos intactos (euploidía).

Las diferencias en el comportamiento de las dos variedades botánicas de lulo en cuanto a su heterocigosidad y polimorfismo, solo confirman la incidencia del genotipo en la variabilidad somática expresada por muchos autores (Gonzalez *et al.*, 2003; Aronen *et al.*, 1999; Brar y Jain, 1998; Israeli *et al.*, 1991; Meins, 1983); según Cardone *et al.* (2010), la frecuencia de las alteraciones somaclonales, depende de variaciones preexistentes en el genotipo y de las interacciones que surgen, entre el genotipo y los procesos involucrados en el cultivo in vitro.

Conclusiones

El análisis con marcadores RAMs permitió detectar variabilidad somática entre plántulas regeneradas a partir de embriones somáticos de lulo y sometidas a diferente número de subcultivos.

La variabilidad somaconal fue genotipo dependiente; las mayores distancias con relación al control se observaron con seis subcultivos en lulo con espinas y con cuatro subcultivos en lulo sin espinas.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, al Grupo de Tecnologías Nucleares de INGEOMINAS, al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional sede Palmira, a la Universidad de Nariño y en particular al Grupo de Producción de Frutales Andinos de la Facultad de Ciencias Agrícolas.

4. Conclusiones generales y Discusión

4.1 Conclusiones

Las solanáceas son consideradas especies recalcitrantes, en trabajos relacionados con embriogénesis somática, aunque en la actualidad, especies importantes de esta familia, se han clonado mediante la inducción embriogénica, como la berenjena (*Solanum melongena*) (Mir *et al.*, 2008; Gleddie *et al.*, 1983; Ali *et al.*, 1991; Rao y Singh, 1991, Sharma y Rajam, 1995; Huda y Bari, 2007; el tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Chen and Adachi, 1994; Newman *et al.*, 1996; Gill *et al.*, 1995; Kaparakis and Alderson, 2002), la papa (*Solanum tuberosum*) (Sanchez *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2005; JayaSree *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008; García y Martínez, 1995) y el pimentón (*Capsicum annuum*) (Barani *et al.*, 2005; Kintzios *et al.*, 2001; Bodhipadma y Leung, 2002; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007; Solis-Ramos *et al.*, 2010). A pesar de la importancia del lulo (*Solanum quitoense* Lam.), como especie frutal de alto valor nutracéutico, no existen reportes exitosos de haber logrado su clonación mediante embriogénesis somática y solamente se conocen los estudios realizados por Segovia (2002), quien intentó sin éxito la regeneración de lulo por la vía embriogénica.

El principal objetivo de este estudio, fue evaluar diferentes posibilidades relacionadas con medios de cultivo, hormonas, ambiente, tipos de explante, para la obtención de embriogénesis somática de dos variedades de lulo, una con espinas (*Solanum quitoense* var. *septentrionale*) y otra sin espinas (*Solanum quitoense* var. *quitoense*), considerando que el primero presenta mayor calidad industrial y el segundo, mayores facilidades en el manejo del cultivo y menor productividad.

La evaluación de un gran número de tratamientos, relacionados con los aspectos mencionados anteriormente, permitió ir poco a poco reduciendo el número de factores, hasta llegar al medio MS, a incubación en oscuridad y evaluación de las interacciones entre diferentes concentraciones de ANA, Citocininas y sacarosa, cuyos resultados se incluyen en el primer capítulo. Este trabajo permitió encontrar las relaciones hormona-sacarosa (ANA 31,9 μM y 50 μM y sacarosa 50 μM y 260 μM), que indujeron mayor formación de embriones somáticos individuales, en hojas cotiledonares e hipocotilos, denominados en el texto “embriones aberrantes”, por presentar germinación en el medio enriquecido con hormonas y carecer de un proceso recurrente, que permita garantizar la regeneración masiva de embriones. Trabajos realizados en el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), no publicados, permitieron comprobar la ausencia de procesos proliferativos, normales en el proceso de embriogénesis somática, cuando se inocularon agregados celulares de lulo, en medios líquidos con reducidas dosis de 2,4-D, incubados a 25°C y con un fotoperiodo de 16h/8h. Estas observaciones, permitieron concluir el carácter recalcitrante del lulo, en cuanto a los procesos relacionados con la embriogénesis somática.

La inclusión de los factores ANA, cinetina y sacarosa, indujo respuestas diferentes en el enraizamiento, inducción de callo y embriones somáticos en hojas cotiledonares e hipocotilos de lulo; se confirmó además, que la adición de cinetina, inhibe la acción enraizadora de pequeñas dosis de ANA y reduce el porcentaje de explantes con callo, lo cual coincide con Van Staden *et al.* (2008), quienes afirman que altas concentraciones de citoquininas (0,5-10 mg/L), previenen el crecimiento radicular y los efectos promotores del enraizamiento de las auxinas; lo contrario informan Charriere y Hahne (1998), cuando expresan que los procesos organogénicos requieren ser suplementados con auxinas y citoquininas.

Igualmente se observó un efecto positivo de la sacarosa en la aparición de estructuras embriogénicas, posiblemente porque además de constituir una fuente energética del proceso, la sacarosa actúa como un factor de estrés osmótico que mejora la eficiencia de la embriogénesis somática (Jheng *et al.*, 2006; Iraqi y Tremblay, 2001; Daigny *et al.*, 1996). Gleddie *et al.* (1983), consideran que el estrés hídrico originado por altas concentraciones de sacarosa induce a las células a acumular proteínas y carbohidratos, lo cual favorece la inducción de células embriogénicas e inhibe la germinación precoz de los embriones en *S. melongena*; esta última afirmación es contraria a lo observado en el presente trabajo y confirma el carácter recalcitrante del lulo, observándose que los embriones aparecen, esporádicamente, en los callos que crecen en el medio de inducción, sin generar la continuación de un proceso recurrente.

Igualmente, es necesario enfatizar en la necesidad de probar con otros explantes, ya que solamente se probaron hojas cotiledonares e hipocotilos; la utilización de embriones cigóticos inmaduros y anteras, ha demostrado ser una alternativa exitosa en otras especies consideradas como recalcitrantes. En este sentido, también es conveniente probar con otras auxinas y la adición de nuevos fitoreguladores, como los jasmonatos, brassinosteroides, poliaminas y oligosacáridos, con los cuales se ha logrado la embriogénesis somática de otras especies recalcitrantes (Arnold, 2008).

Otro objetivo propuesto, fue el de determinar la fidelidad genética del proceso de multiplicación de plantas, a partir de embriones somáticos germinados y subcultivados cada 30 días; los marcadores RAMs demostraron poseer en conjunto, un nivel de polimorfismo superior al 50%, que los valida para estudios de variación genética en lulo. Estos análisis demostraron la relación entre el número de subcultivos y las distancias genéticas encontradas, además de demostrar que la variación somaclonal del lulo es genotipo dependiente; desafortunadamente, no existen estudios relacionados sobre variación genética de lulo inducida por los cultivos *in vitro*, usando marcadores moleculares RAM,

que nos permitan hacer comparaciones. Igualmente, se hace necesario corroborar en campo el alcance de estas variaciones, en lo que respecta a su comportamiento agronómico.

El cultivo de tejidos es por su naturaleza, inductor de variación genética, conocida como variación somaclonal; este fenómeno es de gran importancia si se tiene en cuenta que un objetivo de la micropropagación es la conservación de la identidad genética de las plantas regeneradas, generalmente genotipos élite, ya que la variación podría afectar el desempeño de las plantas reproducidas.

Según Brar y Jain (1988), muchos factores están involucrados en el tipo y frecuencia de la variación somaclonal durante los procesos de regeneración vegetal; factores relacionados con el genotipo y estado de desarrollo del donante del explante, composición del medio y condiciones de incubación, se destacan como los más importantes. La metodología RAMs empleada en este estudio para determinar la variación somaclonal, presenta gran eficiencia en la determinación de posibles mutaciones originadas en el cultivo in vitro y es, según lo manifiesta Paredo *et al.*, (2009), la manera más apropiada de determinar la variación somaclonal; sin embargo, los mismos autores consideran que ninguna técnica, es suficiente por sí sola, para determinar la variación somaclonal y que lo ideal es abordar el problema de la variación genética, con más de una técnica molecular.

4.2 Recomendaciones

Se hace necesario continuar con estudios orientados a optimizar un protocolo de embriogénesis somática de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) que garantice la producción continua de embriones somáticos y su aclimatación en campo, mediante las siguientes actividades:

1. Evaluar el comportamiento de otros tipos de explantes juveniles (embriones cigóticos maduros e inmaduros, anteras, pétalos, raíces), con los mismos tratamientos analizados en el presente estudio.

2. Si bien, en trabajos exploratorios se descartaron otras hormonas como el 2,4-D, Dicamba, Zeatina, Thidiazuron y sustancias adicionales como la putrecina, caseína y carbón activado, es conveniente retomarlos cuando se introduzcan en el proceso otros tipos de explante.
3. Involucrar para la segunda fase del proceso embriogénico, el análisis de medios líquidos de proliferación, que reduzcan el riesgo de fenolización.
4. Explorar otras formas de regeneración in vitro de plantas de lulo, que efficienten la producción en masa de plantas de lulo, conservando las características de la planta madre.
5. Evaluar en campo los efectos del subcultivo continuo de plántulas de lulo, para determinar hasta dónde es posible realizar este proceso, sin cambios significativos en el comportamiento de las plantas producidas.

Bibliografía

Afele, J., Y. Tabei, T. Yamada, T. Momiyama, F. Takaiwa, T. Kayano, S. Nishimura, T. Nishio. 1996. Identification of mRNAs differentially expressed between embryogenic and non-embryogenic cultivars of eggplant during somatic embryogenesis. *Jpn. Agric. Res. Quart.* 30, 175–179.

Agarwal, M., N. Shrivastava, H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.

Agarwal, S., K. Kanwar, D. Sharma. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Scientia Horticulturae* 102:359–368.

Agronet, 2011. <http://agronet.gov.co>; consulta: 2 de diciembre del 2012.

Aleith, F., G. Richter. 1991. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta*, 183:17-24.

Ali, M. H. Okubo, K. Fujieda. 1991. *In vitro* multiplication of intraspecific and interspecific *Solanum* hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 60(3): 601-612.

Ammirato, P. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P., Biesboer, D.D. (Eds.), *Plant Biology, Plant Tissue and Cell Culture*, vol. 3. Alan R. Liss, New York, pp. 57-81.

Angulo, R. 2006. Lulo: el cultivo. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 100 p.

Anu, A., K. Babu, K. Peter. 2004. Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76: 261-267.

Arahana, V., A. Cabrera, M. Torres. 2010. Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática. Avances, (2): B16-B21.

Araújo, L., A. Prabhu, M. Filippi, L. Chaves. 2001. RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC47 for genetic divergence. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67:165-172.

Arnold, V. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. p. 335-354. In: Plant Propagation by Tissue Culture. E. George, P. Debergh, and G. De Klerk (ed.). Springer, Dordercht, The Netherlands.

Aronen T., J. Krajnakova, H. Haggman, L. Ryynanen. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. Plant Science 142:163-172.

Ascencio-Cabral, A., H. Gutierrez-Pulido, B. Rodriguez-Garay, A. Gutierrez-Mora. 2008. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. Scientia Horticulturae, 118:155-160.

Asohofrucol. 2012. Oportunidades comerciales de Colombia. Asociación Hortofrutícola de Colombia. Bogotá, 45 p.

Asohofrucol, Corpoica y Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. 2002. Manual técnico - El cultivo del Lulo. Manizales. Colombia. 10p.

Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso demarcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana, 17: 221-242.

- Bairu, M., C. Fennell, J. Van Staden. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae*, 108: 347-351
- Barany, I., P. Gonzalez-Melendi, B. Fadon, J. Mityko, M. Risueño, P. Testillano. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell.*, 97:709-722.
- Bardley, P., F. El-Fiki, K. Giles. 1984. Polyamine and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.*, 34:397-401.
- Bennici, A., M. Anzidei, G. Vendramin. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, 166: 221–227.
- Bernal, J., M. Londoño, G. Franco, M. Lobo. 2001. Lulo La Selva ICA-CORPOICA: primer material de lulo mejorado para Colombia. Plegable divulgativo. Rionegro, Antioquia, CORPOICA-INCORA. 8p.
- Betancourth, C., M. Zambrano, C. Narvaez. 2007. Reacción de diferentes genotipos de lulo (*Solanum septentrionale*) al ataque de *Fusarium oxysporum*. *Fitotecnia Colombiana*, 7(1):43-50.
- Bhatia P., N. Ashwath, T. Senaratna, D. Midmore. 2004. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 1-21.
- Bhattacharya, S., T. Bandopadhyay, P. Ghosh. 2010. Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker. *Scientia Horticulturae*, 123: 505-513.
- Bodhipadma, K., D. Leung. 2002. Factors Important for Somatic Embryogenesis in Zygotic Embryo Explants of *Capsicum annuum* L. *Journal of Plant Biology*, 45(1) : 49-55.

Bonga J., Y. Park. 2003. Clonal propagation, forest trees. En: Tissue culture and plant breeding. Elsevier Ltd. Pp. 1395-1402.

Boutilier, K., R. Offringa, V. Sharma. 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 14: 1737-1749.

Brar, D., S. Jain. 1998. Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: Jain S., Brar D. y Ahloowalia, B. editors. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp.15-24.

Braybrook, A., J. Harada. 2008. LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13(12):624-630.

Broertjes, C. 1966. Mutation breeding in chrysanthemum. *Euphytica*, 15:156-162.

Cade, R., T. Wehner, F. Blazich. 1990. Somatic embryos derived from cotyledons of cucumber. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 115: 691-696.

Cairney, J., G. Pullman. 2007. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytol.*, 176: 511-536.

Campbell, M., A. Brunner, H. Jones, S. Strauss. 2003. Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotech. J.*, 1:141-154.

Cardone, S., S. Olmos, V. Echenique. 2010. Variación somaclonal. In: *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Ed. Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski. Pp:229-243. ArgenBio, Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 648p.

Carimi, F., F. De Pasquale, F. Crescimanno. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant Science* 105:81-86.

Carimi, F., R. Di Lorenzo, F. Crescimanno, 1997. Callus induction and somatic embryogenesis in carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. *Scientia Horticulturae*, 70:73-79.

Casanova, E., A. Valdés, A. Zuker, B. Fernández, A. Vainstein, M. Trillas, L. Moysset. 2004. *ro/C*-transgenic carnation plants: adventitious organogenesis and levels of endogenous auxin and cytokinins. *Plant Science*, 167:551-560.

Celestino, C., I. Hernandez, E. Carneros, D. Lopez-Vela, M. Toribio. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For.*, 14: 345-357.

Centro Internacional de Agricultura Tropical. 2007. Ecofisiología de lulo y modelos de interacción planta ambiente para el desarrollo de la agricultura específica por sitio. Propuesta de Investigación presentada a la Convocatoria MADR-2007.

Cerón, I., J. Higueta, C. Cardona. 2010. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5:17-26.

Chakrabarty, D., K. Yu, K. Paek. 2003. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science*, 165: 61- 68.

Chakravarthi, V., D. Tejeswara, D. Yechuri, K. Prabavathi. 2009. Effect of explant age, hormones on somatic embryogenesis and production of multiple shoot from cotyledonary leaf explants of *Solanum trilobatum* L. *African Journal of Biotechnology*, 8(4):630-634.

Chandel, G., S. Katiyar. 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.). *Adv. Plant Sci.*, 13: 11-17.

Charriere, F., G. Hahne. 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Science*, 137:63-71.

Chen, J., W. Chang. 2000. Plant regeneration via embryo and shoot bud formation from flower-stalk explants of *Oncidium* 'Sweet Sugar'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 62:95-100.

Chen, L., T. Adachi. 1994. Plant regeneration via somatic embryogenesis from cotyledon protoplasts of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Breed. Sci.* 44:337-338.

Choi, P., S. Min, M. Ahn, W. Soh, J. Liu. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of Chinese cabbage. *Scientia Horticulturae*, 72:151-155.

Choi, Y., J. Jeong. 2002. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Rep.*, 20:1112-1116.

Choi Y., M. Katsumi, H. Sano. 2001. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci.*, 160: 1183-1190.

Choi, Y., D. Yang, J. Park, W. Soh, K. Choi. 1998. Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Rep.*, 17:544-551.

Chuang, S., Ch. Chen, J. Chen, W. Chou, J. Sung. 2009. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia Horticulturae*, 120:121-126.

Chugh, A., P. Khurana. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis - recent advances. *Current Sci.* 86: 715-730.

Cooke T., R. Racusen, J. Cohen. 1993. The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5:1494-1495.

Corporación Colombiana Internacional (CCI). 2007. El Futuro de los Derivados a Base de Lulo en Estados Unidos y Europa. Información de Monitoreo Internacional. En: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200662011146-_Lulo%20fresco%20y%20Pracesado.pdf. Consultado 10 de febrero del 2013.

Corrales, S., F. Varon, N. Barrera. 1999. Reconocimiento de nematodos y efecto de *Meloydogyne* en el cultivo de lulo *Solanum septentrionale* Lam. Acta Agronómica. 49(3-4): 43-47.

Correia, S., J. Canhoto. 2009. Somatic embryogenesis induction is promoted in knocked-out lines of *Arabidopsis thaliana* for a cDNA identified in non-embryogenic calluses of tamarillo (*Cyphomandra betacea*). New Biotechnology, 25: S300-S301.

Costa, G., F. Nogueira, W. Otoni, S. Brommonschenkel. 2000. In vitro regeneration of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 'IPA-5' and 'IPA-6'. Ciencia e Agrotecnologia, 24: 671-678.

Cote, F., J. Sandoval, P. Marie, E. Auboiron. 1993. Variations in micropropagated bananas and plantains: literature survey. Fruits, 48(1):11-20.

Cruz, P., K. Acosta, J. Cure, D. Rodríguez. 2007. Desarrollo y fenología del lulo *Solanum quitoense* var. *septentrionale* bajo polisombra desde siembra hasta primera fructificación. Agronomía Colombiana, 25(2):288-298.

Cuenca B., M. San-Jose, M. Martínez, A. Ballester, A. Vieitez. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Rep., 18: 538-543.

Daigny, G., H. Paul, R. Sangwan, B. Sangwan-Narreel. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv. 'Gloster 69'). Plant Cell Rep., 16:153-157.

Daigny, G., H. Paul, R. Sangwan, B. Sangwan-Narreel. 1996. Factors influencing secondary somatic embryogenesis in *Malus x domestica* Borkh. (cv. 'Gloster 69'). Plant Cell Rep., 16:153-157.

Damasco, O., G. Graham, R. Henry, S. Adkins, M. Smith, I. Godwin. 1996. RAPD detection of dwarf off-types in micropropagated 'Cavendish' (*Musa* spp. AAA) bananas. Plant Cell Rep., 16:118-123.

Datta, S., P. Misra, A. Mandal. 2005. In vitro mutagenesis: a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. *Curr. Science*, 88:155-158.

Davis, D., K. Breiland, D. Frear, G. Secor. 1994. Callus initiation and regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars with different sensitivities to metribuzin. *Plant Growth Regul. Soc. Am. Quart.*, 22: 65-73.

DeLanghe, F., E. DeBruijne. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus culture. *Science Hort.* 4:221–227.

Denis, F., Herner, R., S. Camacho. 1985. Naranjilla a potential cash crop for the small farmer in Latinoamerica. *Acta Horticultural* 158, 475-481.

De Vries S., H. Booij, P. Meyerink, G. Huisman, D. Wilde, T. Thomas, A. Van Kammen. 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension culture. *Planta*, 176: 196-204.

Desai, N., D. Joseph, P. Suprasanna, V. Bapat. 2006. Study of elemental variations during somatic embryogenesis in sugarcane using photon induced X-ray probe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B* 252:299-302.

De Langhe, E., E. De Bruijne. 1976. Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. *Sci Hort.*, 4:221-227.

Dellaporta, S., J. Wood, J. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1:19-21.

Devi, P., P. Radha, L. Sitamahalakshmi, D. Syamala, S. Manoj. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Scientia Horticulturae*, 99:1-8.

Dineshkumar, V., P. Kirti, J. Sachan, V. Chopra. 1995. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science*, 109: 207-213

- Dodeman, V., G. Ducreux, M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48:1493-1509.
- Domoki, M., J. Gyorgyey, J. Biro, T. Pasternak, A. Zvara, S. Bottka, L. Puskás, D. Dudits, A. Fehér. 2006. Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf protoplast-derived alfalfa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1759: 543–551.
- Dudits, D., J. Gyorgyey, L. Bogre, L. Bako. 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. pp. 267-308. In: Thorpe T.A. (ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Engelmann, F., M. Lartaud, N. Chabrillange, M. Carron, H. Etienne. 1997. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. *Cryo-letters*, 18:107-116.
- Estrada I. 1992. Potencial genético del lulo (*Solanum quitoense*) y factores que limitan su expresión. *Acta Hort.* 310, 171-182.
- Feher, A., T. Pasternak, D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 74: 201-228.
- Fernando, S., C. Gamage. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Science*, 151:193-198.
- Feuser, S., K. Meler, M. Daquinta, M. Guerra, R. Nodari. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72:221-227.
- Filipecki, M., H. Sommer, S. Malepszy. 1997. The MADS-box gene CUS1 is expressed during cucumber somatic embryogenesis. *Plant Science*, 125: 63-74.
- Filonova L., P. Bozhkov, S. Von Arnold. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.*, 51: 249-264.

Fobert, P. y D. Webb. 1988. Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. *Canadian Journal of Botany*, 66(9): 1734-1742.

Franco, G., J. Bernal, M. Giraldo, P. Tamayo, O. Castaño, A. Tamayo, J. Gallego, M. Botero, J. Rodríguez, N. Guevara, J. Morales, M. Londoño, G. Rios, J. Rodríguez, J. Cardona, J. Zuleta, J. Castaño, M. Ramírez. 2002. El Cultivo del Lulo, 1a Edición, Manizales, Asohofrucol, Corpoica. 103 p.

Fuchs, M., V. González, R. Rea, A. Zambrano, O. De Sousa, E. Diaz, Z. Gutiérrez, L. Castro. 2005. Mejoramiento de la caña de azúcar mediante la inducción de mutaciones en cultivo de callos. *Agronomía Trop.*, 55(1):133-149.

Gahan P., E. Pinto, S. Court, E. Eze, L. Wang, S. Mantell. 1994 Plant growth regulator induced xylogenesis in cotyledons of *Solanum aviculare*. *J. Exp. Bot.*, 45:1523-1532.

Gaj, M., S. Zhang, J. Harada, P. Lemaux. 2005. Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222:977-988.

García, E., S. Martínez. 1995. Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from Stem Nodal Sections . *Plant Physiol.*, 145:526- 530.

García, J., J. Floriano, L. Vera, J. Segura. 2007. Enfermedades y plagas del cultivo de lulo (*Solanum quitoense*) en el departamento del Huila. Corpoica, El Espinal, Tolima. 31p.

García-Águila, L., M. León, R. Kosky, P. Orellana, R. González. 2007. Evaluación en campo de la estabilidad genética en plantas obtenidas por embriogénesis somática del cv. híbrido 'FHIA 21' (Musa AAAB). *Biotecnología Vegetal*, 7(3): 143-147.

Gianazza, E., P. De Ponti, A. Scienza, P. Villa, L. Martinelli. 1992. Monitoring by two-dimensional electrophoresis somatic embryogenesis in leaf and petiole explants from *Vitis*. *Electrophoresis*, 13: 203-209.

Gill, R., K. Malik, M. Sanago, P. Saxena. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). J. Plant Physiol., 147: 273-276.

Gleddie, S., W. Keller, G. Setterfield. 1983. Somatic embryogenesis in plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). Can. J. Bot., 64:355-361.

Gleddie, S., W. Keller, G. Setterfield. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension derived protoplasts of *Solanum melongena* (eggplant). Canadian Journal of Botany, 64: 355-361.

Gobernación del Huila y Secretaria de Agricultura y Minería, 2006. Manual Técnico del Cultivo de Lulo (*Solanum quitoense* L.) en el departamento del Huila. Cadena Productiva Frutícola, secretaría técnica. Neiva, Huila. 34p

Gomez, L., Miranda, D., Barragán, E., Rivera, J., Ramirez, L., G. Caicedo. 1999. Manejo integrado del cultivo de lulo. CORPOICA, PLANTE y SENA. pp.13-19.

González, G., S. Alemán, D. Infante. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. Plant Science, 165:595- 601.

González, J., M. Oropeza, T. Vargas, E. García. 2006. Embriogénesis somática en dos especies del género *Plantago* (*Plantago major* L. y *Plantago hirtella* Kunth). Agronomía Trop., 56(4): 689-695.

Gonzalez, O., O. Sam, M. Hernández, M. Coronado, J. Silva. 2005. Caracterización histológica de la embriogénesis somática a partir de limbos foliares de boniato (*Hipomoea batatas* L. Lam.). Cultivos Tropicales, 26(4):37-41.

González, M. 2005. Influencia de la época del año en la respuesta in vitro del Cafeto *Coffea canephora* P. Var. Robusta. Revista Colombiana de Biotecnología, 7(1):5-14.

Guis, M., A. Latch, J. Pech, J. Roustan. 1997. An efficient method for production of diploid Cantaloupe Charentais Melon (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) by somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 69:199-206.

Hantula, J., M. Dusabenyagasani, R. Hamelin. 1996. Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur Path.*, 26: 159-166.

Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. Journ. Bot.*, 53:443-453.

Hao, Y., X. Wen, X. Deng. 2004. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. *J. Plant Physiol.*, 161:479-484.

Harada, J. 2001. Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *J. Plant Physiol.* 158: 405-409.

Hecht, V., J. Vielle-Calzada, M. Hartog, D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossnicklaus, S. De Vries. 2001. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.*, 127:803-816.

Hendrix, R., R. Litz, B. Kirchoff. 1987. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl., *S. quitoense* Lam. (Naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11: 67- 73.

Hepher A., M. Boulter, N. Harris, R. Nelson. 1988 Development of a superficial meristem during somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.). *Ann. Bot.*, 62:513-519.

Heiser C., C. Anderson. 1999. "New" Solanums. En: Perspectives on new crops and new uses. Janick J. ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 379-384.

Hernández I., C. Celestino, M. Toribio. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from mature corkoak trees. *Plant Cell Rep.*, 21: 759-764.

Hernandez, I. 2007. Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis de Doctorado. Universidad de Alcalá, España. 241p.

Hernández-García, C., C. López-Peralta, M. Buenrostro-Nava, E. Cárdenas Soriano, A. Pellegrineschi. 2007. Regeneración de maíces blancos subtropicales vía embriogénesis somática, *Agrociencia*, 41:743-753

Itomi, A., H. Amagai, H. Ezura. 1998. The influence of auxin type on the array of somaclonal variants generated from somatic embryogenesis of eggplant, *Solanum melongena* L. *Plant Breed.*, 117:379-383.

Holme, I., P. Krogstrup, J. Hansen. 1997. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x ogiformis* Honda Giganteus' as affected by proline. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 50: 203-210.

Huang, X., A. Nabipour, L. Gentzbittel, A. Sarrafi. 2007. Somatic embryogenesis from thin epidermal layers in sunflower and chromosomal regions controlling the response. *Plant Science*, 173:247-252.

Huda, A., M. Bari. 2007. Production of synthetic seed by encapsulating asexual embryo in eggplant (*Solanum melongena* L.). *International Journal of Agricultural Research*, 2(9):832-837.

Iraqi, D., F. Tremblay. 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol. Plant.*, 111:381-388.

Irvine, L., G. Benda, B. Legendre, R. Machado. 1991. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 26:115-125.

Israeli, Y., O. Reuveni, E. Lahav. 1991. Qualitative aspect of somaclonal variation in banana propagated by in vitro techniques. *Sci. Hort.*, 48:71-88.

Jain, S., G. De Klerk. 1998. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, 4(2):63-75.

Jalali, N., R. Naderi, M. Babalar, M. Mirmasoumi. 2010. Somatic embryogenesis in cyclamen with two explants and combinations of plant growth regulators. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 51(5):445-448.

Jayaramachandran, M., N. Kumaravadivel, S. Eapen, G. Kandasamy. 2010. Gene Action for yield attributing characters in segregating generation (M2) of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4): 802-805.

JayaSree, H., U. Pavan, M. Ramesh, A. Rao, K. Jagan Mohan Reddy, A. Sadanandam. 2001. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64:13-17.

Jeannin, G., G. Hahne. 1991. Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants from somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed.*, 107:280-287.

Jelenic, S., J. Berljak, D. Papes, S. Jelaska. 2001. Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 13-17.

Jheng, F., Y. Do, Y. Liauh, J. Chung, P. Huang. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science*, 170:1133-1140.

Ji, A., X. Geng, Y. Zhang, H. Yang, G. Wu. 2011. Advances in Somatic Embryogenesis Research of Horticultural Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 2:727-732.

Jimenez, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47:91–110.

Kaepler, S., H. Kaepler, Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.*, 43:179-188.

Kamat, M., P. Rao. 1978. Vegetative multiplication of eggplants (*Solanum melongena*) using tissue culture techniques. *Plant. Sci. Lett.*, 13:57-65.

Kanharajah, A., P. Golegaonkar. 2004. Somatic embryogenesis in eggplant. *Scientia Horticulturae*, 99: 107-117.

Kaparakis, G., P. Alderson. 2002. Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 77: 186-190.

Kaparakis, G., P. Alderson. 2008. Role for Cytokinins in Somatic Embryogenesis of Pepper (*Capsicum annuum* L.)?. *J. Plant Growth Regul.*, 27:110-114.

Karami, O., S. Deljou, M. Esna-Ashari, P. Ostad-Ahmadi. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 110:340-344.

Karp, A. 1995. Somaclonal variations as a tool for crop improvement, *Euphytica*, 85:295-302.

Kayim, M., N. Koc-Kemal. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae*, 109:29-34.

Kintzios, S., J. Drossopoulos, E. Shortsianitis, D. Peppes. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper

(*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explants pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, 85: 137-144.

Kintzios, S., J. Drossopoulos, Ch. Lymperopoulos. 2001. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 55-62.

Kintzios, S., C. Manos, O. Makri. 1999. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.). *Plant Cell Rep.*, 18: 467- 472.

Kintzios, S., N. Taravira. 1997. Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Breed.*, 116: 359-362.

Koleva-Gudeva, L., M. Spasenoski, F. Trajkova. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111:114-119.

Komai, F., I. Okuse, T. Harada. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Science*, 113:203-208.

Kraic, J., M. Sakova, E. Gregova. 1998. Comparison of differentiation capability or RAPD and SSR markers in commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Cereal Res Commun.* 26: 375-382.

Krassimira, S., B. Alexandrova, V. Conger. 2002. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). *Plant Science*, 162:301-307.

Krishnaraj, S., I. Vasil. 1995. Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. En: Thorpe TA (Ed) *In Vitro embryogenesis in plants*, pp.417-470. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Langhansova, L., H. Konradova, T. Vanek. 2004. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Rep.*, 22:725-730.

Larkin, P., W. Scrowcroft. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1):135-151.

Latsague, M., P. Sáez, J. Yáñez. 2009. Efecto del ácido indolbutírico en la capacidad rizogénica de estacas de *Eucryphia glutinosa*. *Bosque*, 30(2):102-105.

Leljak-Levanic, D., N. Bauer, S. Mihaljevic, S. Jelaska. 2004. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J. Plant. Physiol.*, 161: 229-236.

Leroy, X., K. Leon, J. Hily, P. Chaumeil, M. Branchard. 2001. Detection of in vitro culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 102:885-891.

Li X., S. Krasnyanski, S. Korban. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *J. Plant Physiol.*, 159:313-319.

Limanton-Grevet, A., M. Jullien. 2000. Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* can be an in vitro selection process leading to habituated and 2,4-D dependent embryogenic lines. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38:567-576.

Litz, R., D. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World J. Microb. Biot.*, 11:416-425.

Litz, R., R. Jarret. 1993. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. pp. 144-171. In: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. William Roca y Luis Mroginsky. (ed.) CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia.

Litz, R., 1986. Effect of osmotic stress on embryogenesis in *Carica* suspension culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 111(6):969-972.

Livadariu, O., N. Babeanu, O. Popa, I. Ionescu-Malancus. 2009. Study regarding in vitro propagation through somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* L. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 66(1-2):368-373.

Lo, K. 1997. Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet. *Scientia Horticulturae*, 72:49-57.

Lo Schiavo F. 1995. Early events in embryogenesis. In: Bajaj Y.P.S. (ed.), *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30. Springer, Berlin, pp. 20-29.

Lo Schiavo, F., I. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi. 1989. DNA methylation of embryonic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331

Lobo, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: Una visión conceptual. *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(2): 40-54.

Lobo, M. 2000. Papel de la variabilidad genética en el desarrollo de los frutales andinos como alternativa productiva. En: *Memorias. 3er Seminario de Frutales de Clima Frío Moderado*. Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, Manizales, Noviembre 15 al 17 de 2000. pp. 27-36.

Lobo, M., C. Medina. 2000. *Solanum quitoense* Lam. In: FUNEP. (Ed.), *Caracterizacao de frutas nativas da América Latina. Edicao comemorativa do 30 Aniversario da Sociedade Brasileira de Fruticultura*. pp: 41-43.

Lobo, M., E.Girard, J. Jaramillo, G. Jaramillo. 1983. El cultivo del lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.). *ICA-Infoma*, 17:10-20.

Loiseau, J., N. Michaux-Ferriere, Y. Le Deunff. 1998. Histology of somatic embryogenesis in pea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36:683-687.

Lotan, T., M. Ohto, K. Yee, M. West, R. Lo, R. Kwong, K. Yamagishi, R. Fisher, R. Goldberg, J. Harada. 1998. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93:1195-1205.

Lou, H., S. Kako. 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci. Hortic.* 64, 11-20.

Magioli, C., R. Barroco, C. Benício, L. Santiago-Fernandes, E. Mansur, G. Engler, M. Margis-Pinheiro, G. Sachetto-Martins. 2001. Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*Atgrp-5*). *Plant Science*, 161:559-567.

Magioli, C., E. Mansur. 2005. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. *Acta bot. bras.*, 19(1): 139-148.

Mahuku, G., M. Henríquez, J. Muñoz, R. Buruchara. 2002. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology*, 96(6): 580-589.

Marcano, A., P. Molina, M. Oropeza, E. de García. 2002. optimizacion del proceso de embriogénesis somatica en variedades venezolanas de caña de azucar. *Acta Científica Venezolana*, 53: 251–257.

Mariani, P. 1992. Eggplant somatic embryogenesis combined with synthetic seed technology. *Capsicum Newsletter*, 289-294 (special issue).

Márquez-Martín, B., C. Sánchez-Romero, R. Perán-Quesada, A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro. Factores que afectan a la obtención de embriones somáticos blanco-opacos de aguacate. *Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate)*. 2003. pp. 97-102.

Marsolais, A., D. Wilson, M. Tsujita, T. Senaratna. 1991. Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal

(*Pelargonium x domesticum*) geranium. Canadian Journal of Botany, 69(6):1188-1193.

Martin, K. 2003. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Scientia Horticulturae, 98:299-304.

Matos, A. 2007. Inducción de callo en plantas silvestres de Aloe vera “zábila” con diferentes combinaciones de 2,4-D, BA y Kinetina. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 41(4):503-516.

Matsuoka, H., K. Hinata. 1979. NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. Journal of Experimental Botany, 30: 363-370.

Medina, C., D. Sánchez, G. Camayo, M. Lobo, E. Martínez. 2008. Anatomía foliar comparativa de materiales de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) con y sin espinas. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 9(1):5-13.

Meins, F. 1983. Heritable variation in plant cell culture, Annu. Rev. Plant. Physiol., 34:327-346.

Merkle, S., W. Parrott, B. Flinn. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (Ed) *In Vitro* Embryogenesis in plants, pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.

Miller, M. 1997. TFPGA (Tools for population genetic analyses) vers. 1.3 distributed by the author flagsta: department of biological sciences. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.

Mir, K., A. Dhatt, J. Sandhu, S. Gosal. 2008. Genotype, explant and culture médium effects on somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Hort. Environ. Biotech, 49 (3):182-187.

Molina, M., M. García. 1998. Analysis of genetic variability in long-term callus cultures and regenerated plants of maize. *Cytologia*. 63: 183-190.

Muñoz, J. 2011. Análisis de la competitividad del sistema de producción de lulo (*Solanum quitoense* lam.) en tres Municipios de Nariño. Tesis de Maestría, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 128p.

Muñoz, J., A. Morillo, Y. Morillo. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4):219-226.

Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3):473-497.

Murthy, H., E. Hahn, K. Paek. 2008. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. *Scientia Horticulturae*, 118:168-171

Nakagawa, H., T. Saijyo, N. Yamauchi, M. Shigyo, S. Kako y A. Ito. 2001. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Scientia Horticulturae*, 90:85-92.

Nato, A., C. Fresneau, N. Moursalimova, J. De Buyser, D. Lavergne, Y. Henry. 2000. Expression of auxin and light-regulated arrestin-like proteins, G proteins and nucleoside diphosphate kinase during induction and development of wheat somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.*, 38 (6):483-490.

Newman, P., S. Krishnaraj, P. Saxena. 1996. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. *Int. J. Plant Sci.*, 157: 554-560.

Nhut, D., N. Hanh, P. Tuan, L. Nguyet, N. Tram, N. Chinh, N. Nguyen, D. Vinh. 2006. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. *Scientia Horticulturae*, 110: 93-97.

Nomura, K., A. Komamine. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.*, 79:988-991.

Oh, T., M. Cullis, K. Kunert, I. Engelborghs, R. Swennen, C. Cullis. 2007. Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa* spp.). *Physiol. Plant.*, 129: 766-774.

Ohki, S., C. Bigot, J. Mousseau. 1978. Analysis of shootforming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. *Plant Cell Physiol.*, 19:27-42.

Olah, R., A. Zok, A. Pedryc, S. Howard, L. Kovacs. 2009. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120:134-137.

Owens, L., C. Wozniak. 1991. Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 26:127-133.

Pareek, A., S. Kothari. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae*, 98: 449-459.

Park, Y. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.*, 59:651-656.

Park, Y., S. Son. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 15:95-105.

Patiño, C. 2010. Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1):7-15.

- Perea-Dallos, M. y F. Novak. 1988. Resultados promisorios en el mejoramiento genético a través de mutagénesis y regeneración de plantas de *Musa* spp vía embriogénesis somática. ACEVIV, 3: 29-32.
- Peredo, E., R. Arroyo-García, M. Revilla. 2009. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. J Plant Physiol., 166(10):1101-1111.
- Perreta, M., A. Vegetti. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revisión. Gayana Bot., 62(1): 9-19.
- Pinto G., C. Santos, L. Neves, C. Araújo. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globules* Labill. Plant Cell Rep., 21: 208-213.
- Polanco, C., M. Ruiz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. Plant Sci., 162: 817-824.
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. En: Debergh PC, Zimmermann, H. (Eds). Micropagation, pp. 425-445. Kluwer Academic Publishers, London.
- Prina, A., A. Landau, M. Pacheco, E. Hopp. 2010. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING.. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed. Gabriela Levitus, Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski. Pp:218-228. ArgenBio, Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 648p.
- Qin, Y., H. Li, Y. Guo. 2007. High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. Scientia Horticulturae, 111:203-208.
- Quainoo, A., A. Wetten, J. Allainguillaume. 2008. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. Journal of Virological Methods, 149:91-96.
- Quiñonez, M., J. Allcaco, M. Cáceres. 2008. Inducción y cultivo de callo de *Nicotiana paniculata* "Tabaco cimarrón".Scientia, 12(12):121-128.

Quiroz-Figueroa, F., C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. Loyola-Vargas. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Rep., 20:1141-1149.

Raghavan, V. (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. Am. J. Bot. 91, 1743-1756.

Rai, M., N. Akhtar, V. Jaiswal. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae, 113:129-133.

Rani, A., R. Reddy, V. Prakash, B. Padmaja. 2005. Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. Biol. Plant., 49: 347-354.

Redenbaugh, K., B. Paash, J. Nichol, M. Kossler, P. Viss, K. Walker. 1986. Synthetic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. Bio/Technology, 4:797-801.

Rao, P. 1992. Difference in somatic embryogenetic ability of cultured leaf explants of four genotypes of *Solanum melongena* L. Agronomie, 12: 469-475.

Rao, P., B. Singh. 1991. Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. Plant Cell Rep., 10: 7-11.

Rocha, F., M. Coan, J. Coimbra, J. Bertoldo, A. Guidolin, M. Kopp. 2010. Root distribution in common bean populations used in breeding programs. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 10: 40-47.

Roman, G., E. Harsan, S. Wagner. 2009. New cherry cultivars obtained by mutagenesis at the fruit research station Cluj, Romania. Bulletin UASVM Horticulture, 66(1-2):215-217.

- Rose, R., K. Nolan. 2006. Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 42:473-481.
- Rout, G., S. Samantaray, P. Das. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.*, 18:91-120.
- Rout, G., S. Samantaray, J. Mottley y P. Das. 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae*, 81:201-228.
- Sagare, A., K. Suhasini, K. Krishnamurthy. 1995. Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Science*, 109:87-93.
- Sahaza, D., M. Henao. 2001. Evaluación y caracterización morfológica del lulo. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. 57p.
- Sahijram, L., J. Soneyi, K. Bollamma. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.*, 39:551-556.
- Saito, T., S. Nishimura. 1994. Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Science*, 102: 205-211.
- Salinas, G. 2001. Impacto, Presente y Futuro de la Biotecnología en el Mejoramiento de Solanáceas. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico.
- Sambrook, J., E. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Gel electrophoresis of DNA, pp:3-60. In: Sambrook, J., E. Fritsch, T. Maniatis editors. *Molecular cloning: a Laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samosir, Y., I. Godwin, S. Adkins. 1997. An improved method for the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. Paper Abstract International Symposium on Coconut Biotechnology, Merida, Yucatán, Mexico, pp:1-5.

Sánchez, M., M. Martínez, S. Valladares, E. Ferro, A. Viéitez. 2003. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J. Plant Physiol.*, 160:699-707.

Sanchez, M., J. Rodríguez, G. de Lara Zárate, A. López, S. Barrales, G. González. 2005. Embriogénesis somática en papa cvs Atlantic y Fritolay 1867. *Rev. Chapingo, Serie Horticultura*, 11(2):219-224.

Sanchez-Chiang, N., V. Jiménez. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1): 135-151.

Santos, D., P. Fevereiro. 2000. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70:155-161.

Santos, M., E. Romano, C. Yotoko, M. Tinoco, B. Días, F. Aragao. 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science*, 168:723-729.

Seabrook, J., L. Douglass, L. 2001. Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Reports*, 20:175-182.

Segovia, V. 2002. Optimización de la regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) orientada a la transformación genética de las plantas. Maestría en Biotecnología de Plantas. Thesis, Universidad Internacional de Andalucía, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 74p.

Seibert, M., P. Wetherbee, D. Job. 1975. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiol.*, 56:130-139.

Seo, J., S. Weon, S. Ran, J. Liu. 2007. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in root explant cultures of carnation. *Plant Biotechnol. Rep.*, 1:67-70.

Sharma, S., G. Bryan, M. Winfield, S. Millam, S. 2007. Stability of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated via somatic embryos, axillary bud proliferated shoots, microtubers and true potato seeds: a comparative phenotypic, cytogenetic and molecular assessment. *Planta*, 226:1449-1458.

Sharma, S., S. Millam, P. Hedley J. McNicol, G. Bryan. 2008. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Mol Biol.*, 68:185-201.

Sharma, S., S. Millam. 2004. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.*, 23:115-119.

Sharma, P., M. Rajam. 1995, Genotype, eggplant and position effects on organogenesis and embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *J. Exp. Bot.*, 46:134-142

Shimada, T., T. Hirabayashi, T. Endo, H. Fujii, M. Kita, M. Omura. 2005. Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*, 103:233-238.

Sie, R., G. Charles, H. Sakhanokho, Y. Toueix, Y. Dje, A. Sangare, M. Branchard. 2010. Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators. *Australian Journal of Crop Science*, 4(2):98-106.

Singh, N., L. Sahoo, N. Sarin, P. Jaiwal. 2003. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Plant Science*, 164:341-347.

Skirvin, R., M. Norton, K. Mcpheeters. 1993. Somaclonal variation: has it proved useful for plant improvement? *Acta Hort.*, 336:333-340.

Solange, E., J. Pereira, A. Ramalho, N. Arbex, M. Cardoso, O. Alves. 2002. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. *Ciencia e Agrotecnologia* 26(2):301-308.

Solís-Ramos, L., S. Nahuath-Dzib, A. Andrade-Torres, F. Barredo-Pool, T. González-Estrada, E. Castaño de la Serna. 2010. Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia*, 65(3): 504-511.

Soneji, J., P. Rao, M. Mhatre. 2002. Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 77: 28-32.

Soniya, E., N. Banerjee, Das, M. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Curr. Sci.* 80: 1213–1215.

Sonone, N., S. Deshmukh, S. Lanjewar, R. Bhakre. 2010. Induced variability in quantitative characters of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(6):1409-1414.

Sparrow, A. 1966. Plant growth stimulation by ionizing radiations. In: *Effects of low doses of ionizing radiations on crop plants*. IAEA Tech. Rep. Ser., 64:12-15.

Stefanello, S., L. Vesco, J. Ducroquet, R. Nodari, M. Guerra. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae*, 105:117-126.

Stefaniak, B. 1994. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). *Plant Cell Reports*, 13(7): 386-389.

Suárez, O., E. Naranjo, L. Atehortúa, S. Blair. 2011. Organogénesis directa in vitro a partir de hojas de la planta. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 13(2):186-192.

- Tafur, R. (2006). Propuesta frutícola para Colombia y su impacto en la actividad económica nacional, regional y departamental. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. Primer Congreso Colombiano de Horticultura. 44-46
- Takahiro, M., J. Afele, T. Saito, T. Kayano, Y. Tabel, F. Takaiwa, K. Takayanagi, S. Nishimura. 1995. Differential Display Identifies Developmentally Regulated Genes during Somatic Embryogenesis in Eggplant (*Solanum melongena* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications 213, 376-382.
- Tan, C., D. Furtek. 2003. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. Plant Science 164, 407-412.
- Tarré, E., C. Magioli, M. Margis-Pinheiro, G. Sachetto-Martins, E. Mansur, L. Fernandes. 2004. Somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). Revista Brasileira de Botânica, 27(1): 70-84.
- Thomas, C., D. Meyer, C. Himber, A. Steinmetz. 2004. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogénesis. Plant Physiology and Biochemistry, 42:35-42.
- Thomas, J., D. Vijyan, S. Joshi, J. Lopez, R. Kumar. 2006. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats. J. Biotechnol. 123, 149-154.
- Thomas, T. 1993. Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. Plant Cell, 5:1401-1410.
- Tisserat, B., E. Esan, T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hortic. Rev., 1:1-78.
- Toribio M., C. Fernández, C. Celestino, M. Martínez, M. San-Jose, M. Vieitez. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 76:283-287.

Triqui, Z., A. Guédira, A. Chlyah, H. Chlyah, V. Souvannavong, R. Haicour, D. Sihachakr. 2008. Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). C. R. Biologies, 331:198-205.

Universidad de Antioquia (UDEA). 2007. Producción, Transformación y Comercialización de pulpas. Frutas Tropicales. In: <http://huitoto.udea.edu.co/FrutasTropicales/lulo.html>. Consulta: diciembre 2 del 2012.

Uribe, M., J. Ulloa, C. Delaveau, K. Saez, F. Muñoz, P. Cartes. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. Gayana Bot., 69(1):105-112.

Van Staden, J., E. Zazimalova, E. George. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. Pp: 205-227. In: Plant Propagation by Tissue Culture. E. George, P. Debergh, and G. De Klerk (ed.). Springer, Dordercht, The Netherlands.

Vargas, T., E. García, M. Oropeza. 2005. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* from cell suspension cultures: histological analysis and extracellular protein patterns. Journal of Plant Physiology, 162: 449-456.

Vasil, I. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals grasses. In: Lurquin, P.F., Kleinhofs, A. (Eds.), Genetic Engineering in Eukaryotes. Plenum, NY, pp. 233-252.

Vazquez, A. 2001. Insight into somaclonal variation. Plant Biosystems, 135:57-62.

Velásquez, R., Y. Sandrea, C. Betancourt, J. Mata, F. García. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. Agronomía Trop., 56(1): 61-74.

- Villalobos, I., O. Arias. 1987. Inducción y multiplicación de callos in vitro en trtes cultivares comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agronomía Costarricense*, 11(1):39-44.
- Vilchez, J., N. Albany, R. Gómez, L. Garcia. 2002. Induction of somatic embryogenesis in *Psidium guajava* L. starting at the zygotic embryo stage. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 19: 284-293.
- Vivar, H., M. Pinchinat. 1970. Viability of seed from interspecific crosses with naranjilla (*Solanum quitoense*). *Crop Sci.*, 10:450-452.
- Walker, D., W. Parrott. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 55–62.
- Wang, Y., F. Wang, H. Zhai, Q. Liu. 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in swettpotato. *Scientia Horticulturae*, 111:173-178.
- Wang, Y., X. Wang, Z. Ma, G. Zhang, G. Hang. 2006. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Two Recalcitrant Genotypes of *Gossypium hirsutum* L. *Agricultural Sciences in China*, 5:323-329.
- Wetherell, D. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 3:221-227.
- Yadav, J., M. Rajam. 1998. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.*, 116: 617-625.
- Yamada, T., H. Nakagawa, Y. Sinti, Y. 1967. Studies on the differentiation in Cultures cells. I. Embryogenesis in three strains of solanum callus. *Bot. Meg.*, 80:68-74.
- Yamada, T., H. Nakagawa, Y. Sinoto. 1967. Studies on the differentiation in cultured cells. I-Embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. *Botanical Magazine-Tokyo*, 80: 68-74.

Yang, X., X. Zhang. 2010. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1):36-57.

Zalewska, M., J. Lema-Ruminska, N. Miler. 2007. In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae*, 113:70-73.

Zapata-Castillo, P., A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez, N. Santana-Buzzy. 2007. Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) from Cell Suspensions. *Hortscience*, 42(2):329-333.

Zeng, F., X. Zhang, L. Cheng, L. Hu, L. Zhu, J. Cao, X. Guo. 2007. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics*, 90:620-628.

Zeng, F., X. Zhang, L. Zhu, L. Tu, X. Guo, Y. Nie. 2006. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Plant Mol. Biol.*, 60:167-183.

Zhambrano, A., J. Demey, M. Fuch, V. Gonzalez, R. Rea, O. De Souza, Z. Gutierrez. 2003. Selection of sugarcane clones resistant to SCMV. *Plant Science*, 165:221-225.

Zhang, J., W. Guo, X. Deng. 2006. Relationship Between Ploidy Variation of Citrus Calli and Competence for Somatic Embryogenesis. *Acta Genetica Sinica* 33, 647-654.

Zhu, G., J. Kinetand, S. Lutts. 2004. Characterization of rice (*Oryza sativa*) F3 populations selected for salt resistance and relationships between yield related parameters and physiological properties. *Australian Journal of Experimental Agronomy*, 44:333-342.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, D. Laubuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ssr) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Zimmerman, J. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5:1411-1423.

Zuo, J., Q. Niu, G. Frugis, N. Chua. 2002. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 30:349-359.