

MICROPROPAGACIÓN DEL TOMATE DE ÁRBOL (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), SOLANACEAE SILVESTRE USADA EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA

Idel Contreras Gatita¹ y Jonatha Almeida²

Laboratorio de Cultivos *in vitro*. Centro de Ingeniería Genética¹.
Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes².
Mérida, Venezuela.

RESUMEN

Los frutos del tomate de árbol son apreciados y consumidos en la región andina venezolana a partir de plantas silvestres. Con el fin de estimular su siembra como planta de interés agrícola, se realizaron varios ensayos para su propagación clonal. Fueron cultivados cotiledones e hipocotilos de plántulas germinadas *in vitro* en medio nutritivo básico de MS, añadiéndole ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$): inositol 100, ácido nicotínico 0,5, glicina 2,0; tiamina 1,0, piridoxina 0,5; sacarosa 30000. Para solidificar el medio nutritivo se añadió agar (B&T) al 0,9%. Los inductores de la morfogénesis fueron: Bencil Adenina (BA) (2,0- 3,5 -5,0) + Ácido Indol Acético (AIA) (0,5-0,75-1,0) y Zeatina (Z) sola (1,0-2,0). Los cultivos fueron incubados a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ y luz continua (750 - 2.000 lux). Después de tres semanas, tanto los cotiledones como los hipocotilos mostraron pequeñas protuberancias las cuales se diferenciaron directamente como yemas en los medios que contenían BA 2,0 + AIA 0,5 y Z sola 2,0. De ambos tipos de explantes, fueron obtenidas entre 70 y 415 yemas, las cuales fueron subcultivadas en el medio básico original, libre de hormonas, donde ocurrió su alargamiento y enraizamiento. El trasplante de las plantas se realizó cuando éstas alcanzaron entre 2 y 4 cm de altura, en recipientes con mezcla de sustrato semiestéril (tierra negra y arena) en proporciones iguales. Luego fueron llevadas al invernadero para su endurecimiento definitivo, donde crecieron normalmente.

Palabras clave: Tomate de árbol, micropropagación directa.

ABSTRACT

Wild tomato tree fruits from Andean regions are very appreciated and eaten for Andean people. In order to encourage its cultivation as an economical crop, assays were done to establish its micropropagation. Cotyledons and hypocotyls from plantlets aseptically germinated, were cultured *in vitro* on MS nutritive basic medium. It was complemented with ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$): inositol 100, nicotinic acid 0,5; glycine 2,0; thiamine 1,0; pyridoxine 0,5; and sucrose 30000. Agar (B&T) was added to solidify nutritive medium. To induce organogenesis, the following plant growth regulators were used: Bencil-Adenine (BA) (2,0 - 3,5- 5,0) + Indol Acetic Acid (IAA) (0,5-1,0) and Zeatin (Z) 2,0. Cultures were incubated at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ and continuous light (750-2000 lux). After 3 weeks, both types of explants showed small protuberances differentiated as buds on those media containing BA 2,0 + IAA 0,5. Were obtained between 70 and 415 buds from cotyledons and hypocotyls. Enlargement and rooting occurred when buds were cultured on the initiation medium hormone-free. When plants were 2-4 cm tall were transferred to a substrate composed by ground and sand at the same proportions. Then, tree tomato plants were carried out to the greenhouse for final acclimatization.

Key words: Tree tomato, direct micropropagation

INTRODUCCIÓN

El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), es una Solanaceae originaria de las regiones andinas de Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia y Argentina. Su domesticación y cultivo en esas zonas son anteriores al descubrimiento de América (Hernández y León, 1992). Ha sido introducida en las regiones montañosas de América Central, Caribe, India, Malasia, Filipinas, África, así como en Florida, California, Nueva Zelanda y Australia

(Geilfus, 1994).

Es un arbusto de 2-3 m de alto, produce flores en racimos y sus frutos son alargados (aovados), de 4 a 10 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho. La cáscara es lisa de color rojo-marrón, pulpa jugosa la cual contiene numerosas semillas. El fruto puede comerse crudo, cocido como vegetal, en sopas, salsas, ensaladas, etc., como fruta en dulces, mermeladas entre otros. El fruto del tomate de árbol es rico en vitami-

nas B (B1, B6) y C, niacina y fósforo (Hernández y León, 1992, Geilfus, 1994).

Es considerado en frutoterapia como una de las frutas que fortalecen el cerebro, contribuye a curar migrañas y cefaleas severas, la obesidad, la hipertensión y la rinitis. Está contraindicado si se tienen las siguientes enfermedades: alergias de la piel, tensión baja y urticaria (http://www.geocities.com/tomate_c_o/QUE_ES_TOMATE.htm. 2001).

Puede ser propagado por semillas y estacas, aunque también, en la literatura consultada, se reportó la inducción de la embriogénesis somática a partir de hojas de plántulas cultivadas en medio nutritivo MS con 2,4-D ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) o Ácido piclorámico ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y sacarosa al 9%. Fueron obtenidos callos con potencial embriogénico a los cuales se les realizó estudios histológicos y bioquímicos para seguir el proceso de desarrollo de los embriones somáticos (Ferreira et al., 1998). En el caso presente, fueron establecidos ensayos para su propagación in vitro; usando diferentes explantes, siempre a partir de plántulas provenientes de semillas, cosechadas de frutos obtenidos en un establecimiento comercial de la ciudad de Mérida, en cuya periferia el tomate de árbol crece silvestre o en pequeñas plantaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de frutos maduros de *C. betacea* obtenidos en el Mercado Principal de la ciudad de Mérida; fueron extraídas sus semillas para inducir la germinación asépticamente, con el fin de utilizar posteriormente, porciones de las plántulas como explantes para inducir la regeneración *de novo*.

Un lote de 100 semillas maduras, fueron lavadas repetidas veces y esterilizadas con hipoclorito de sodio (4%), fueron colocadas en Medio Orgánico Mínimo (MOM), sólido, de Murashige y Skoog (MS) (1962), con $20000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de sacarosa, en frascos tipo "Baby Jar". Fueron incubadas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz tenue continua.

Una vez que ocurrió la germinación y las plántulas alcanzaron entre 2 y 3 cm de altura, fueron usados como explantes cotiledones enteros y porciones de hipocotilos de 1 cm aprox., para ser cultivados en el medio básico inicial MS a la mitad de su fuerza iónica, al cual se le añadió ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$): inositol 100,

ácido nicotínico 0,5; glicina 2,0; tiamina 1,0; piridoxina 0,5; sacarosa 30000 y para solidificar el medio, agar (B&T) 1,1%. Los reguladores del crecimiento usados fueron: Bencil-Adenina (BA) 2,0-5,0 + Ácido Indol Acético (AIA) 0,5-1,0 y Zeatina (Z), sola, 1,0-2,0. En los subcultivos realizados se añadió a los medios Glutamina $5,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Una vez establecidos los cultivos de estos explantes, fueron incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en luz blanca fluorescente, continua de intensidad entre 750 y 2000 lux.

Cuando se produjo la regeneración de yemas, fueron cultivadas en el medio básico inicial, sin hormonas, para estimular el alargamiento. Se realizaron subcultivos entre 3 y 4 semanas a medios frescos de igual composición química, durante unos cinco meses.

Las vástagos alargados fueron individualizados en frascos Baby-Jar, los cuales contenían medio nutritivo básico, sin fitoreguladores donde ocurrió el enraizamiento.

El trasplante de las plantas de unos 5 cm de altura, se hizo a recipientes con sustrato estéril (tierra negra: arena) en proporciones iguales. Posteriormente fueron llevadas a condiciones de invernadero (Figura 3), y entre 4 y 5 semanas después algunas fueron sembradas en el campo.

Cada ensayo consistió de 10 muestras (cotiledones e hipocotilos) y fue repetido tres veces. Se realizaron observaciones periódicas y se registraron las respuestas morfológicas generadas por los explantes. Para la aplicación del test *t-student*, se consideraron los resultados totales de cada experimento para hacer las comparaciones de las medias respectivas y, se tomaron en cuenta sólo aquellas concentraciones que produjeron las mejores respuestas en términos de proliferación de vástagos. El valor de *p* fue fijado a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La germinación de las semillas del tomate de árbol (*C. betacea*) fue del 98% y ocurrió entre 5 y 10 días después de su incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz tenue continua.

Los reguladores, BA $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ + AIA $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ y Z $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, añadidos a los medios de cultivo

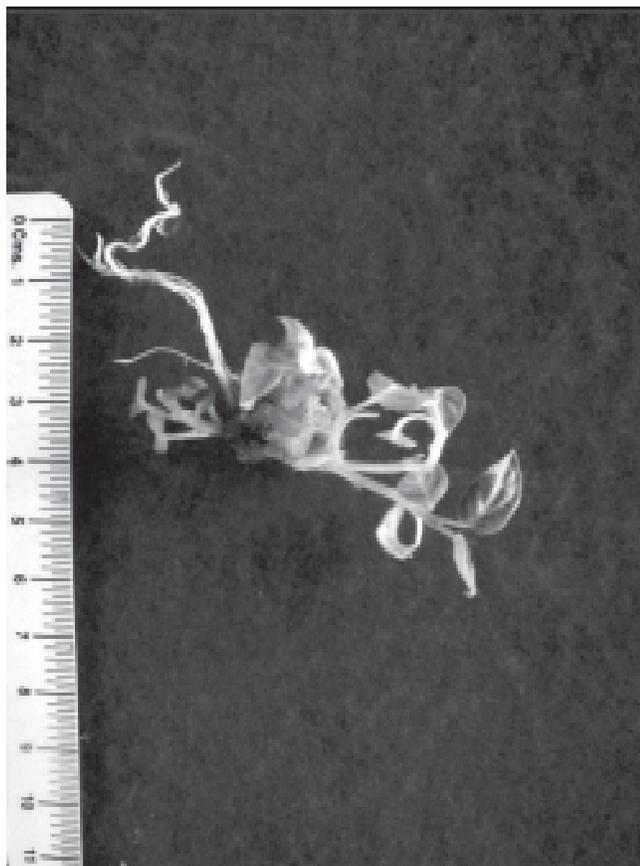


Figura 1. Planta de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), obtenida de cotiledón en medio nutritivo MS + BA 2,0 mg*l⁻¹+ AIA 0,5mg*l⁻¹

arriba mencionados, para la inducción de morfogénesis directa a partir de los cotiledones e hipocotilos (Figuras 1 y 2), fueron los que produjeron las mejores respuestas en términos de proliferación de vástagos y son los que se muestran a continuación:

Como puede inferirse del tratamiento estadístico utilizado, tanto la Zeatina como la combinación de BA + AIA, son buenos inductores de yemas *de novo*, a partir de los explantes cultivados. Si bien el número total de yemas (415) con la combinación respectiva, es ligeramente mayor que con la Zeatina (300), la prueba indica que no hay diferencia significativa entre ellos; quizás sea debido a la presencia de AIA en el medio de cultivo o al tipo de explante cultivado. Resultados similares fueron reportados por Christopher y Rajam, (1996), quienes indujeron la proliferación de vástagos en *Capsicum spp.*, también solanáceas, cuando añadieron al medio de

Tabla I. Regeneración de yemas *de novo* en cotiledones e hipocotilos de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) después de seis semanas de incubación.

EXPLANTES	TRATAMIENTOS (mg*l ⁻¹)	
	BA 2,0 + AIA 0,5	Zeatina 2,0
Cotiledones	415	300
Hipocotilos	280	70

- Los números representan los valores totales de yemas producidas por tratamiento.
- Se aplicó un test *t-student* para la diferencia de medias en cada uno de los tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05.

cultivo BA (4,4- 177,5 ìM) o Kinetina (4,7- 185,9ìM) en medio nutritivo MS. Cuando las combinaron con 2,3,5- ácido tri-yodo benzoico (1,0ìM), una auxina sintética, el número de vástagos diferenciados incrementaba. Posteriormente, Christopher y Rajam, (1996), trabajando con las mismas plantas de pimiento y aplicando análisis de varianza, determinaron que el efecto más significativo sobre la regeneración de vástagos se debía al tipo de explante usado para tal fin.

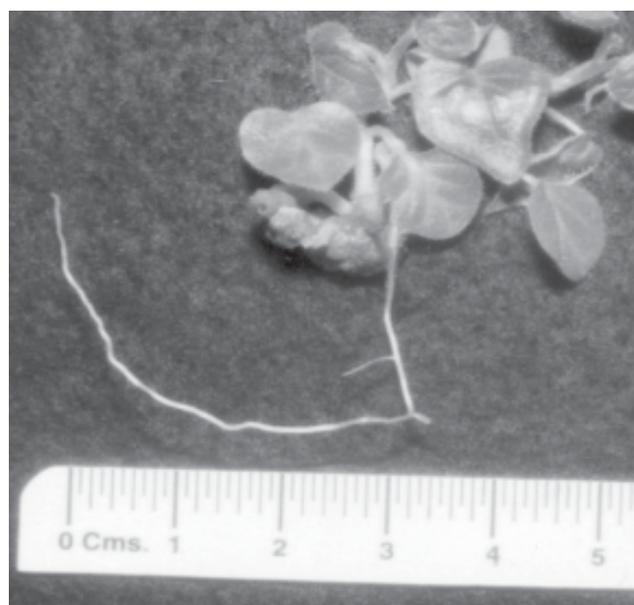


Figura 2. Planta de tomate de árbol (*C. betacea*) regenerada de hipocotilo en medio nutritivo MS + Z 2,0 mg*l⁻¹.



Figura 2. Planta de tomate de árbol (*C. betacea*) regenerada de hipocotilo en medio nutritivo MS + Z 2,0 mg^{*l}⁻¹.

En relación con la regeneración directa de yemas de tomate de árbol a partir de hipocotilos, el análisis estadístico permite inferir que el tratamiento con BA + AIA, es mejor, con respecto a los hipocotilos cultivados en el medio nutritivo con Zeatina. Cuando se trata de inducir multiplicación clonal de vástagos, se busca optimizar ésta, sin embargo, no siempre el mayor número es el de más fácil manipulación, cuando se trata de individualizar los vástagos para su alargamiento y posterior producción de raíces.

Los hipocotilos han mostrado ser explantes regenerativos de estructuras variadas, así ha sido reportado por Matsouka y Hinata (1979), trabajando con *Solanum melongena* (berenjena). Ellos encontraron tres respuestas diferentes cuando cultivaron los explantes, las cuales dependían de la concentración del ácido naftalén- acético (ANA) en el medio de cultivo. Cuando ésta era de 0,8 mg^{*l}⁻¹, solo se formó callo, cuando fue disminuida a 0,016 mg^{*l}⁻¹, se formaron callos que produjeron raíces

adventicias y, si la auxina no estaba presente se generaban vástagos adventicios. Reportaron además, que 8,0 mg^{*l}⁻¹ de ANA reprimía la formación de callo, pero estimulaba la formación de embrioides. Al añadir BA al medio, se incrementó la formación de vástagos, pero se inhibió la de raíces y la producción de embriones somáticos.

Como puede verse, el tomate de árbol, al igual que las otras solanáceas arriba mencionadas, entre ellas el tabaco (Murashige y Skoog, 1962) y el tomate (Gresshoff y Doy, 1972, Behki y Lesley, 1979), son especies que responden muy bien al ser cultivadas *in vitro*, en términos de regenerar yemas directa o indirectamente, embriones somáticos, plantas haploides, etc., lo cual facilita la implementación de cualquier programa dirigido a la propagación clonal masiva y al mejoramiento genético con fines determinados. De igual manera su manejo *ex vitro* es de relativa facilidad, porque tanto el período de endurecimiento como el desarrollo de las plantas en condiciones de invernadero ocurre en corto tiempo, en el caso presente, fueron suficientes 4 semanas para que estas plantas estuviesen aclimatizadas y llevadas al campo.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Profesor José Armando Rondón por las fotografías que ilustran el presente trabajo y al Profesor Rubén Hernández Gil por la información suministrada. Al Bachiller Jairo Ochoa por la asesoría estadística.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Behki, R. M. y S.M. Lesley. 1979. Shoot regeneration from leaf callus of *Lycopersicon esculentum* L. Z. Pflanzenphysiol. 98: 83-87.
- Christopher, T. y M. V. Rajam. 1994. *In vitro* clonal propagation of *Capsicum spp.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38: 25-29.
- Christopher, T y M. V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant, and medium on *in vitro* regeneration of red

pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 245-250.

Ferreira, M.R., M.L. Lopes, P.C. Verissimo, J.M. Conhoto y G.S. Cruz. 1998. Somatic embryogenesis in leaves of *Cyphomandra betacea*. Histological and biochemical studies. Abstracts. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. p.75.

Geilfus, F. 1994. Manual de agroforestería para el desarrollo rural. Vol. 2. Guía de especies. Ender- Caribe. Turrialba, Costa Rica. pp.355-357.

Gresshoff, P. y C. H. Doy 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. (tomato). *Planta* 107: 161-170.

Hernández B. J. E y J. León (editores) 1992. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la Agricultura y la Alimentación. Italia, pp. 183-186.

http://www.geocities.com/tomate_co/QUE_ES_TOMATE.htm, 2001.

Matsouka, H. y K. Hinata. 1979. NAA- Induced organogenesis and embryogenesis en hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. *J. Exp. Bot.* 30: 363-370.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 437-497.