

Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática

Venancio Arahana B.,^{1*} Antonio R. Cabrera V.,¹ María L. Torres P.¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador

*Autor principal/Corresponding author; e-mail: varahana@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: S. de la Torre, Ph.D.

Recibido/Received: 02/25/2010. Aceptado/Accepted: 04/01/2010.

Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

A reproducible micropropagation protocol for tamarillo (*Solanum betaceum*) via somatic embryogenesis was established in this study. Three types of explants were assayed: leaves, hypocotyls and zygotic embryos; all of them obtained from *in vitro* cultured seeds. Different concentrations of auxins 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and NAA (α -naphthaleneacetic acid) and sucrose were tested to find out an appropriate medium that stimulated the formation of embryogenic calli. MS medium supplemented with 5 mg/L of NAA and 90 g/L of sucrose (pH 5.8) induced somatic embryos formation from the upper thirds of hypocotyls and from zygotic embryos. One-hundred percent of the explants derived from zygotic embryos and hypocotyls developed big whitish calli. However, only 40 % of the hypocotyl-derived calli and 70 % of the zygotic embryo-derived calli produced somatic embryos. The results showed that somatic embryos were obtained after a four-week incubation period in MS medium supplemented with 5 mg/L of NAA and 90 g/L of sucrose. The somatic embryos grew rapidly and produced plantlets with normal phenotypes. These results suggest that this technique could be applied for large scale production of Tamarillo and other agronomically important Andean fruit crops.

Keywords. Somatic embryogenesis, *Solanum betaceum*, sucrose, NAA (α -naphthaleneacetic acid), somatic embryo.

Resumen

En esta investigación se estableció un método reproducible de micropropagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), a partir de embriones somáticos. Se usaron tres tipos de explantes, hojas, hipocótilos y embriones cigóticos, los cuales fueron obtenidos a partir de semillas de tomate de árbol de la variedad anaranjada común cultivadas *in vitro*. Se probaron dos tipos de auxinas 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) y ANA (ácido α -naftalenoacético), y sacarosa en distintas concentraciones a fin de encontrar un medio de cultivo que estimule la formación de callo embriogénico. Se encontró que el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa a pH 5,8 promovió la formación de embriones somáticos a partir del tercio superior de los hipocótilos y de embriones cigóticos. El 100 % de los explantes provenientes de embriones cigóticos y de hipocótilos formaron callos de buen tamaño y de una coloración blanco cremosa. Sin embargo, la formación de embriones somáticos en los callos obtenidos a partir de hipocótilos fue tan solo del 40 %, mientras que con los embriones cigóticos fue del 70 %. Los resultados mostraron que en medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa se obtuvieron embriones somáticos a partir de la cuarta semana de cultivo, los cuales se desarrollaron rápidamente y produjeron plántulas sin anomalías. Estos resultados evidencian la aplicabilidad de esta técnica para la producción a gran escala de plantas de interés agrícola para el país.

Palabras Clave. Embriogénesis somática, *Solanum betaceum*, sacarosa, ANA (ácido α -naftalenoacético), embrión somático.

Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es un arbusto semileñoso de 2 a 3 metros de altura, originario de los Andes, principalmente de Perú, Chile, Ecuador, Bolivia y Argentina; sin embargo, su producción se ha expandi-

do hasta zonas de Centro América y el Sureste Europeo [1]. Las variedades más conocidas son el tomate común, cuyo fruto tiene forma alargada, color morado o anaranjado; el tomate redondo, de color anaranjado rojizo, y el tomate mora, oblongo de pulpa morada [2]. Desde el



punto de vista nutricional, el tomate de árbol posee un alto contenido de fibra, vitaminas A y C, además de ser rico en minerales como calcio, hierro y fósforo; actúa como antioxidante y fortalece el sistema inmunológico [3]. En el Ecuador se dedican cerca de 5000 hectáreas al cultivo del tomate de árbol con un rendimiento entre 60 a 80 Ton/ha/año, siendo la principal variedad cultivada la anaranjada común [3]. Comercialmente es considerado como uno de los productos con mayor potencial agro exportable entre los cultivos propios de Sur América; además, la demanda mundial se ha incrementado, principalmente en la Unión Europea. Nueva Zelanda es el principal país productor y exportador de este fruto, además de ser donde mayores avances se han hecho en el desarrollo y tecnificación del cultivo [4].

En el Ecuador la producción de tomate de árbol con fines de exportación es incipiente, debido a deficientes sistemas de producción, problemas fitosanitarios, especialmente la presencia de la mosca de la fruta, y una falta de homogeneización en la calidad de la fruta. Por tales motivos el acceso del tomate de árbol ecuatoriano a mercados internacionales como Estados Unidos está restringido [1].

Las técnicas de cultivo *in vitro* podrían contribuir a resolver algunos problemas que afronta la producción de tomate de árbol en el Ecuador. La embriogénesis somática ofrece la posibilidad de propagar masivamente líneas o variedades élite sin el riesgo de alteración en su constitución genética, garantizando de esta manera la uniformización de las plantaciones. A través del mejoramiento *in vitro*, ya sea induciendo variación somaclonal o mediante la inserción de ADN foráneo por ingeniería genética, se podría generar variedades con diversas resistencias a insectos, patógenos y factores ambientales, así como mejorar la calidad de la fruta y el rendimiento. Además la embriogénesis somática tiene aplicación en áreas de investigación como variación clonal, estudios celulares y crioconservación de líneas embriogénicas [5].

Los primeros ensayos de embriogénesis somática en tomate de árbol fueron reportados por Canhoto y Lopes [6] en Portugal, quienes tuvieron éxito con el uso de auxinas, principalmente 2,4-D (ácido 2-dicloro fenoxiacético) en suspensiones líquidas, a partir de hojas e hipocótilos. Trabajos de embriogénesis somática realizados en otras solanáceas como la papa mostraron resultados eficientes con el uso de la auxina ANA (ácido naftalenacético) y con combinaciones de ANA y 2,4-D [7].

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método reproducible de micropropagación de una variedad local de tomate de árbol vía embriogénesis somática.

Metodología

Material Vegetal

Se adquirieron frutos de la variedad anaranjada común de tomate de árbol de un supermercado de Quito. Se

extrajeron las semillas de los frutos, se las lavó y secó. Luego, las semillas fueron desinfectadas, para lo cual se las sumergió en etanol al 70 %, por 5 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril y transferidas por 20 minutos a una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %, más 4 gotas de Tween 20. Por último se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y las semillas fueron cultivadas en medio Murashige and Skoog, 1962 (MS) con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar a pH 5.8 [8]. Se sembraron de 8 a 10 semillas por frasco, y para su germinación y desarrollo se llevaron a un cuarto de cultivo a una temperatura de 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad.

A medida que el proceso de germinación de las semillas progresaba se tomaron diferentes explantes para las pruebas de embriogénesis somática, así: embriones completos, extraídos de la semilla luego de la imbibición de ésta y cuando la radícula empezaba a emerger; hipocótilos (de 2 semanas de emergidos de la semilla) y hojas (de 4 semanas de edad).

Inducción de callo embriogénico y desarrollo de embriones

Se usó el medio basal MS, suplementado con sacarosa y auxinas (ANA y 2,4-D), cuyas concentraciones variaron de acuerdo con el explante utilizado (Tabla 1).

Establecimiento de ensayos con hojas: Se usaron 10 medios de cultivo con distintas concentraciones hormonales y de sacarosa (Tabla 1); de cada medio se prepararon dos cajas Petri y se colocaron 5 explantes por caja. A partir de hojas cortadas en la parte superior, inferior y lateral se obtuvieron explantes de aproximadamente 5 mm² que fueron colocados con el haz de la hoja hacia arriba en los diferentes medios de cultivo previamente mencionados. Los explantes fueron incubados en una estufa a 28 °C en oscuridad total.

Establecimiento de ensayos con hipocótilos: Se utilizó el medio basal MS suplementado con 8 diferentes combinaciones hormonales y de sacarosa (Tabla 1). Los hipocótilos fueron divididos en tercios: superior, medio e inferior para evaluar el potencial embriogénico de cada uno de estos segmentos. A dichos explantes se les realizaron cortes horizontales en la parte superior e inferior para que su exposición al medio de cultivo fuera mayor y de esta manera aumentar las posibilidades de obtener gran cantidad de callo. Se prepararon dos cajas de cada uno de los medios de cultivo anteriormente mencionados, y se colocaron 5 explantes por caja. Posteriormente, los hipocótilos fueron incubados en una estufa a 28 °C en oscuridad total hasta la germinación de los embriones.

Establecimiento de ensayos con embriones cigóticos: Se usó el medio basal MS suplementado con 5 concentraciones de auxinas y sacarosa. Se prepararon dos cajas de cada medio (Tabla 1). Los embriones cigóticos en proceso de germinación fueron liberados completamente de la testa de la semilla usando una pinza. Una vez

Hojas			Hipocótilo			Embriones Cigóticos		
Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento	Sacarosa (%)	Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento	Sacarosa (%)	Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento	Sacarosa (%)
Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)	Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)	Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)
medio 1	2	0	medio 1	0	5	medio 1	2	0
medio 2	5	0	medio 2	0	5	medio 2	2	0
medio 3	2	0	medio 3	0	5	medio 3	2	0
medio 4	5	0	medio 4	2	0	medio 4	2	0
medio 5	0	5	medio 5	5	0	medio 5	2	0
medio 6	0	5	medio 6	2	5			
medio 7	0	7	medio 7	2	0			
medio 8	0	7	medio 8	5	0			
medio 9	2	5						
medio 10	2	5						

Tabla 1: Medios de cultivo usados para la inducción de embriones somáticos a partir de explantes de hojas, hipocótilo y embriones cigóticos

extraídos, los embriones fueron colocados en los medios de cultivo, 5 embriones por caja, y se los incubó a 28 °C en oscuridad total hasta la germinación de los embriones somáticos.

Seguimiento y manejo de los ensayos

Se revisaron los cultivos cada semana y aquellos que mostraban indicios de formación de estructuras embriogénicas fueron observados con el estereomicroscopio. Los callos confirmados como embriogénicos fueron subcultivados en un medio de cultivo fresco de iguales características del que provenían.

Cuando se obtuvieron embriones somáticos, éstos fueron mantenidos a 28 °C en oscuridad total, hasta que tuvieron un tamaño aproximado de 5 mm. Posteriormente fueron transferidos a un medio MS basal con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar pH 5.8, y mantenidos en el cuarto de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas-luz y 8 horas-oscuridad y temperatura de 22±1 °C, para que continúen su desarrollo hasta plántulas.

Aclimatación de las plántulas obtenidas vía embriogénesis somática

Tierra comercial Multiflor fue tamizada y puesta en recipientes de barro, los cuales fueron colocados en el interior de frascos de vidrio, los mismos que fueron tapados con papel aluminio para su esterilización en autoclave.

Plántulas de un tamaño aproximado de 8 cm fueron transferidas a los frascos que contenían tierra estéril, a los que se les colocó una cubierta plástica, la cual se retiró paulatinamente a medida que las plántulas avanzaban en su proceso de aclimatación. Después de 30 días, las plantas que se encontraban completamente libres de la cubierta plástica y se mostraban vigorosas fueron transferidas a fundas plásticas con tierra comercial "Multiflor" hasta que alcanzaran un tamaño de 15 cm luego de lo cual fueron transferidas a campo abierto.

Resultados y Discusión

Ensayos con hojas

Los medios suplementados con 2,4-D, en concentraciones de 2 mg/L no dieron buenos resultados, puesto que

los callos formados eran de mala calidad y al poco tiempo empezaron a morir. Solo en el medio 4 (5 mg/L 2,4-D + 9 % sacarosa) (Tabla 1), se obtuvo un callo de tamaño medio (cerca de 1 cm de diámetro) y de un color blanco cremoso a las 3 semanas de iniciado el ensayo. Este callo se mantuvo en observación durante 2 meses, al cabo de los cuales fue desechado pues no proliferó mayormente y por el contrario fue deteriorándose paulatinamente. En los medios de cultivo que contenían 5 mg/L de ANA se obtuvieron callos a las 3 semanas de iniciado los ensayos, mientras que en los medios de cultivo que contenían 7 mg/L de ANA la formación de callo se dio a las 2 semanas. Aunque en todos los ensayos realizados con ANA se obtuvieron callos grandes de coloración blanca cremosa y textura friable, no mostraron signos de ser embriogénicos. Igualmente se mantuvieron en observación durante 2 meses y luego fueron desechados. Finalmente, en los ensayos realizados con los medios de cultivo 9 y 10 (Tabla 1), la formación de callo se dio precariamente en los bordes de los explantes a partir de la cuarta semana de cultivo, sin embargo una semana después, los callos formados empezaron a morir.

Otro aspecto a considerar fue que el porcentaje de explantes que formaron callo en los ensayos con 2,4-D fue muy bajo, teniendo el máximo en el medio 4 (25 %), mientras que en el medio 1 solo un 10 % de los explantes formaron callo (Tabla 1, Figura 1). Mientras que en los ensayos con ANA, a excepción del medio 5 (95 %), en todos los demás medios el 100 % de los explantes formaron callo (Tabla 1, Figura 1).

Ensayos con hipocótilos

Los ensayos en los que se usó el tercio superior del hipocótilo, formaron callo con un mayor crecimiento en comparación con los ensayos en los que se utilizó los tercios medio e inferior de los hipocótilos. La formación de callo empezó a partir de la segunda semana de cultivo en todos los medios usados (Tabla 1). En general los callos eran de tamaño mediano a grande (de 1 a 2 cm de diámetro) y de color blanco, a excepción de los callos formados en los medios 7 y 8 (Tabla 1), los cuales eran pequeños (cerca de 5 mm de diámetro) y amarillentos. Sin embargo solo los callos que se formaron en los medios de cultivo suplementados con 5 mg/l de ANA

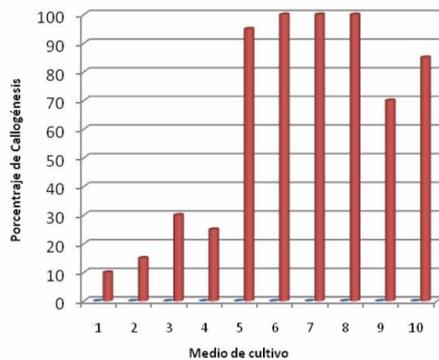


Figura 1: Porcentaje de explantes que formaron callo a partir de segmentos de hojas. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

y 9 % de sacarosa, produjeron embriones somáticos a los 24 días de iniciado el ensayo con una eficiencia del 40 % (Figuras 2 y 4). Con los demás medios utilizados, aunque se obtuvo callo friable de color blanco brillante, éste no llegó a producir embriones somáticos. A pesar de que los callos obtenidos en los medios 1 y 6 (Tabla 1) daban indicios de tener regiones embriogénicas, éstas nunca llegaron a desarrollarse y más bien al poco tiempo se tornaron friables y adquirieron una coloración café.

Ensayos con embriones cigóticos

En los ensayos realizados con embriones extraídos de la semilla antes de que emergiera la radícula, solo se formó un callo superficial, tenue, de color verde negruzco y demasiado friable, el cual a los pocos días se tornó café.

Por el contrario, los ensayos con embriones extraídos de la semilla, luego de la emergencia de la radícula, produjeron un callo de desarrollo acelerado, a los 7 días de iniciado el ensayo. Esto se observó en todos los medios de cultivo usados, en los que el 100 % de los explantes formaron callo (Figura 3), de un tamaño medio (1 cm de diámetro) y de color blanco cremoso, características que se asemejan a las reportadas por Canhoto y Lopes [6]. En el medio de cultivo suplementado con 5 mg/L de ANA y 9 % de sacarosa se obtuvo callo embriogénico a los 10 días de iniciado el ensayo, y en el 70 % de los callos se formaron embriones somáticos (Figura 3).

Embriones Somáticos

Los callos embriogénicos provenientes ya sea de hipocótilos, como de embriones cigóticos, se obtuvieron con el medio MS suplementado con 5 mg/l de ANA y 9 % de sacarosa. En los ensayos con hipocótilos, solo 40 % de callos obtenidos en el medio 2 (Tabla 1), formaron embriones somáticos (Figura 2). Germinaron cerca de 15 embriones somáticos por explante, de los cuales, 10 % se perdieron por contaminación, 50 % detuvieron su desarrollo al ser transferidos a medio MS basal con 3 % de sacarosa y solo un 40 % formaron plántulas que crecieron normalmente. Al contrario, en los ensayos con embriones extraídos de la semilla, luego de la emergencia de la radícula, el 70 % de los callos obtenidos en

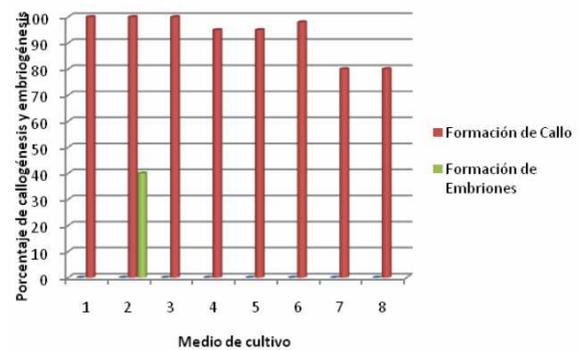


Figura 2: Porcentaje de explantes que formaron callo y embriones somáticos a partir del tercio superior del hipocótilo. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

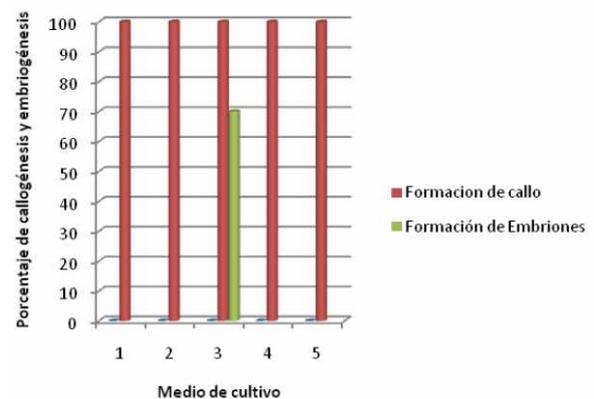


Figura 3: Porcentaje de explantes que formaron callo y embriones somáticos a partir de embriones cigóticos extraídos luego de la emergencia de la radícula. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

el medio 3 (Tabla 1) (Figura3), produjeron cerca de 15 embriones somáticos por explante, de los cuales, 5 % se perdieron por contaminación, 15 % detuvieron su desarrollo al ser transferidos a medio MS basal con 3 % de sacarosa y el 80 % se desarrollaron hasta plántulas que crecieron normalmente.

Los embriones somáticos que detuvieron su crecimiento, como se menciona anteriormente, tomaron un color rojizo morado y empezaron a morir a los pocos días del subcultivo, lo cual posiblemente se debió a un shock osmótico producido por el cambio brusco de una alta concentración de sacarosa (9 %) a una baja concentración de sacarosa (3 %).

En general, el callo embriogénico era de color blanco cremoso, translúcido y brillante (Figura 4A), como los reportados por Canhoto y Lopes [6]. Al cabo de 5 días de subcultivo de los callos embriogénicos en medio MS basal sólido, el desarrollo de estructuras proembrioides y de torpedo fue detectado (Figura 4B).

A la tercera semana de haberse instalado los ensayos de embriogénesis somática, tanto a partir de embriones cigóticos como del tercio superior de los hipocótilos, se pudo observar a simple vista la aparición de los embriones somáticos. A la cuarta semana éstos alcanzaron

cerca de 5 mm de largo (Figura 4C). Los embriones somáticos subcultivados en MS basal con 3 % de sacarosa germinaron rápidamente, a los 8 días de subcultivo se observó la brotación de la radícula y la formación de pequeñas hojas, además de que la coloración de los embriones pasó de blanco a un verde rojizo (Figura 4D), para luego continuar con un egrosamiento y alargamiento del hipocótilo, ensanchamiento de hojas y aparición de raíces secundarias, lo cual sucedió a partir de las dos semanas de iniciado el subcultivo. A las 4 semanas, la plántula ya estaba completamente formada (Figura 5A) y a las 6 – 8 semanas, las plántulas estaban listas para la fase de aclimatación. El periodo de aclimatación se realizó aproximadamente por dos meses y luego las plantas fueron pasadas a campo abierto, donde se desarrollaron normalmente (Figuras 5B y 5C).

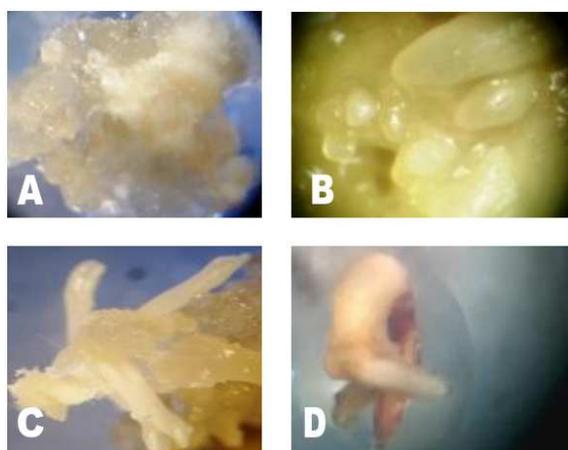


Figura 4: Fases de desarrollo de los embriones somáticos obtenidos en medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa a pH 5,8. (A) Callo embriogénico obtenido en oscuridad total a 28 °C. (B) Estructuras globulares y de torpedo vistas al estereomicroscopio en la superficie del callo embriogénico. (C) Embriones somáticos de 5 mm de longitud obtenidos a partir de hipocótilo y mantenidos en oscuridad total a 28 °C. (D) Embriones somáticos con indicios de brotación de radícula y hojas, después de 7 días de ser subcultivados a medio MS basal con 30 gr/L de sacarosa a pH 5,8.

Los medios de cultivo que indujeron la formación de embriones somáticos tanto a partir de hipocótilos como de embriones cigóticos fueron los suplementados con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa. Resultados similares reporta López Vela [7] en trabajos realizados con *Solanum tuberosum*, en los que se obtuvieron embriones somáticos rápidamente en el medio de cultivo que contenía ANA, aunque con un índice de producción muy bajo en relación al potencial que posee la embriogénesis somática.

El tiempo en el que se obtienen embriones somáticos puede representar una ventaja a explotar posteriormente. Así, en el presente trabajo a las tres semanas de iniciados los ensayos ya se obtuvieron embriones somáticos, mientras que en los reportes de Canhoto y Lopes [6], éstos se obtuvieron a los 4 meses de haber iniciado los ensayos.

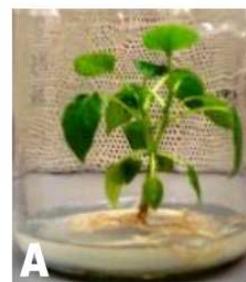


Figura 5: Plantas de tomate de árbol obtenidas vía embriogénesis somática. (A) Planta completa cultivada en MS basal a 22 °C y fotoperiodo 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad. (B) Plantas durante la fase de aclimatación en tierra, mantenidas en cuarto de cultivo a 22 °C y fotoperiodo 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad. (C) Plantas después de 9 meses de crecimiento en campo abierto.

Hay dos aspectos importantes a considerar en la embriogénesis somática, la edad del explante y el medio de cultivo. Mientras más joven sea el tejido, éste suele ser más susceptible al proceso de diferenciación celular hacia un estado embriogénico; sin embargo, si el tejido es demasiado joven, pudiese no soportar el estrés provocado por las condiciones del medio de cultivo y morir [9].

El hecho de que los embriones cigóticos extraídos de semillas antes de emerger la radícula formaran callo de precaria apariencia puede deberse a que el eje embrionario no estaba expuesto, por la presencia de los cotiledones que lo cubrían, y por tanto no había tejido sensible a la acción de las hormonas.

Además la concentración de sacarosa en el medio de cultivo ha mostrado ser de gran importancia para la maduración y posterior desarrollo de los embriones somáticos. Según lo reportan Márquez y Sánchez [10], agentes como el manitol, Polietilenglicol (PEG), altas concentraciones de sacarosa, sorbitol y el ácido abscísico (ABA) inducen en las células un proceso de estrés hídrico durante la formación del callo embriogénico [10]. Este estrés hídrico induce a las células a acumular sustancias de reserva como proteínas y carbohidratos, lo

cual favorece el desarrollo de las células embriogénicas e inhibe una germinación precoz de los embriones somáticos [11]. Podría ser que muchos de los callos con potencial embriogénico que se obtuvieron en este trabajo no formaron embriones al inhibirse la maduración de las células por falta de una concentración apropiada de sacarosa que indujera a las células a acumular nutrientes.

Las plantas obtenidas vía embriogénesis somática son morfológicamente similares a las plantas obtenidas vía semillas, seguramente porque los mecanismos celulares involucrados en la formación del embrión son comunes en los dos tipos de embriogénesis [12], lo cual se pudo comprobar con las plantas obtenidas en el presente trabajo.

Conclusiones

Como conclusión, se puede decir que el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa es el adecuado para la obtención de embriones somáticos de tomate de árbol a partir del tercio superior del hipocotilo o de embriones cigóticos. La aplicación de la técnica de embriogénesis somática para la producción agrícola representa una valiosa herramienta para la obtención de plantas con las características que se quiere propagar, a más de proporcionar una base para futuras investigaciones a nivel celular y de reproducción clonal en *Solanum betaceum*.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en la realización de esta investigación, y al apoyo financiero obtenido a través de un Small Grant de la USFQ. Un gracias especial a Diana Ayala y Nicolás Bastidas por sus contribuciones en la escritura de este artículo.

Referencias

- [1] Soria, N. 2005. "Tomate de árbol/tamarillo/sweet tomato." Technical report. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.
- [2] Lebn, J. 1996. "Guía para el cultivo de tomate de árbol." Technical report. INIAP-COTESUP.
- [3] Cadena, E. 2006. "Estudio de prefactibilidad para el tomate de árbol." Technical report. SICA, Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.
- [4] Kreuter, M. L. 2006. "Andean fruits and vegetables of the world." Technical report. MNS, European Fruits and Vegetals Reports.
- [5] Hernández, L. and Careros, E. 2005. "Embriogénesis somática como elemento de la biotecnología forestal." Technical report. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural (IMIDRA).
- [6] Canhoto, J. M. and Lopes, M. L. 2005. "Protocol of somatic embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra beta-cea*)." Technical report. Facultad de Ciencias e Tecnología. Universidade de Coimbra.
- [7] López-Vela, D. 2005. "Embriogénesis somática en *Solanum tuberosum*." Technical report. L. Cv Andinita. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural (IMIDRA).
- [8] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- [9] Jiménez, V. and Guevara, E. 1995. "Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos." Technical report. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica.
- [10] Márquez, M. Sánchez, R. 2003. "Factores que afectan la obtención de embriones somáticos blanco-opacos de aguacate." Technical report. Dpto. de Biología Vegetal. Universidad de Málaga. Málaga, España.
- [11] Merkle, S. A. and Parrot, B. S. 1995. "Morphogenic aspects of somatic embryogenesis." *In Vitro Embryogenesis in Planta.* 155-203.
- [12] Gomez, R. 1998. "Generalidades sobre la embriogénesis somática." Technical report. Resúmenes del curso Internacional de Propagación in vitro de especies vegetales. Santa Clara, Cuba.