

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Formulación del Problema

La explotación de frutales andinos en nuestro país, del cual forma parte el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), ha aumentado en los últimos 15 años, pues varios mercados de Europa y América han abierto sus importaciones por su alta rentabilidad. Últimamente el flujo de tomate de árbol se desplaza desde Colombia al Ecuador por falta de oferta interna, por ello debe ser enfocado de acuerdo a la demanda del mercado externo, mismo que exige conceptos de calidad alimentaria.

Para generar una óptima calidad se necesita incursionar en una tecnología ecológica, con nuevos sistemas de control de plagas y enfermedades, nutrición adecuada y en general un manejo con enfoque ecológico e integrado que permita equilibrar la demanda con la oferta que puede hacer nuestro país, pues ofrece las condiciones agroclimáticas ideales para el desarrollo del cultivo, pudiendo generar una producción masiva con miras a exportación. No obstante la especie tiene muchos problemas relacionados con el manejo, ataque de enfermedades, plagas, inadecuada nutrición e insuficiente manejo post-cosecha. (Soria, 2008).

El tamarillo o tomate de árbol es un frutal andino que tiene un tiempo de cultivo en nuestro país de aproximadamente 60 años, y su exportación inició a finales de los años 80; sin embargo, hasta la fecha no se ha podido consolidar un mercado estable permanente.

Este fruto cuenta con gran aceptación en el mercado por sus propiedades organolépticas, pero la falta de tecnificación del cultivo está causando grandes pérdidas; por lo cual se necesita fortalecer la investigación para mejorar los rendimientos y la calidad de la producción con enfoque en una cadena productiva ampliada, proceso en el cual se hace indispensable el uso de la biotecnología y en especial su cultivo *in vitro*, pues con esta técnica se puede solventar la falta de producción, generando mayor cantidad y mejor calidad de plantas en menor tiempo. (Soria, 2008).

El cultivo *in vitro* se define como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Estas técnicas se caracterizan porque ocurre a microescala, sobre todo en una superficie pequeña; se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos, nutricionales y hormonales y se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos). (Roca & Mroginski, 1993).

El desarrollo de las especies en un sistema de cultivo *in vitro* está principalmente guiado por las concentraciones de los reguladores de crecimiento que se utilicen, existiendo hormonas de diferentes tipos, como son: auxinas, citoquininas, giberelinas, entre otras; de alto valor comercial y de diferente eficiencia dependiendo de su interacción, motivo por el cual se trata de utilizar nuevos tipos de hormonas reguladoras de crecimiento que generen igual o mejor eficiencia a un costo económico menor, como es el caso de las brasinolidas, fitohormonas de origen natural que generan resultados con concentraciones ínfimas de empleo.

1.2 Justificación del Problema

El tomate de árbol constituye una fruta fresca que es también conocida como tamarillo, la misma que es originaria de los Andes ecuatoriano - peruanos. Es una fruta exótica con delicioso sabor y aroma. Crece en arbustos con follaje grande y flores rosadas con exquisita fragancia, originarios de los valles interandinos; particularmente en Ecuador. La sierra ecuatoriana posee varias zonas óptimas para la producción de esta fruta; zonas caracterizadas por un clima templado y fresco, y suelos con buen contenido de materia orgánica. Las provincias más representativas en cultivos de esta fruta son Pichincha, Azuay, Loja, Tungurahua, Napo, Cotopaxi y Bolívar.

Las condiciones agroambientales que presenta el Ecuador nos indica que el tamarillo no es un cultivo estacional ya que la cosecha se la puede realizar de una manera continua pero mediante lotes escalonados. La temperatura estable a lo largo del año y los prolongados periodos de luminosidad de la zona ecuatorial determinan que la fruta de Ecuador tenga un mejor desarrollo de sus almidones, lo que resulta en un sabor menos ácido y agradable. Dada la presencia relativamente baja de plagas en nuestro medio no se necesita de una cantidad muy alta de fungicidas para combatir a las mismas y se prevé un incremento de cultivos de tamarillo orgánico y semi-orgánico

Según datos encontrados en el Ministerio de Agricultura y Ganadería el cultivo comercial de este producto se inicia en el país en el 1970, aumentando su área de producción periódicamente, logrando en esta manera en el año de 1991 cultivar 120 hectáreas, y para el año 1998 de 2287 hectáreas. (Maldonado *et al.*, 2009)

Las exportadoras no consideran el tamarillo como un producto “estrella” dentro de sus exportaciones, a pesar de que es un producto con gran aceptación en el mercado internacional. Esta es la razón por la que su rubro de exportación es tan bajo en relación a otros productos más tradicionales. De igual manera la demanda interna es demasiado atractiva para la gran mayoría de los productores lo que da menos atractivo a la demanda externa. Dada la inversión que implica cultivar un producto para exportar, así como su colocación en el mercado externo, muchos prefieren producir para cubrir la demanda local; lo cual ha causado que seamos el primer mercado de destino de fruta Colombiana. A pesar de ser productores, importamos de Colombia 5 veces más fruta de la que producimos, esto deja un gran mercado para los productores que incursionan en el mercado local. (Maldonado *et al.*, 2009)

La regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis y embriogénesis somática o zigótica es un prerequisite indispensable para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas. La aplicación de la biología molecular y celular al mejoramiento de plantas requiere que células simples vegetativas desarrollen una planta completa (totipotencia). En la capacidad de división celular y regeneración de las plantas de tomate, hay exigencias diferenciadas en cuanto a la composición del medio de cultivo, especialmente en lo referente a reguladores del crecimiento (McKersie y Brown, 2006).

Se ha encontrado diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate, que están determinadas en gran medida por los reguladores del crecimiento y el tipo de explante usados, aún cuando sean diferentes explantes de una misma planta, este aspecto se debe tener en cuenta a la hora de recomendar el empleo de uno u otro regulador de crecimiento. (Santana, 1985; Torelli, 1996)

La introducción de los brasinoesteroides en las tecnologías de regeneración *in vitro* pudiera constituir una alternativa promisoría, para mejorar la eficiencia económica

del proceso con insumos nacionales, al elevar los coeficientes de multiplicación y obtener plántulas con un desarrollo vegetativo adecuado (González, 1998).

Los brasinoesteroides constituyen biorreguladores con probada actividad en el crecimiento vegetal y con mecanismos de acción diferentes a los de los biorreguladores clásicos, por lo que ha sido de gran interés científico técnico la utilización de análogos de brasinoesteroides en la biotecnología vegetal, lo que permitirá validar su acción como reguladores del crecimiento y posibilitará su uso en diferentes estudios *in vitro* (Moré *et al*, 2001)

Estos biorreguladores han generado grandes resultados en procesos de propagación de plantas en campo (Nuñez, 2000), es por tal motivo que este trabajo es pionero en la utilización de estos biorreguladores en la micropropagación *in vitro*. Con este proyecto a más de determinar concentraciones estándares de uso para las diferentes fases del cultivo *in vitro* de *Solanum betaceae*, se pretende observar su interacción con las citoquininas y auxinas, determinando así su sinergismo o antagonismo a distintas concentraciones de uso, y observar la variabilidad y viabilidad de los resultados que se puedan generar, con miras en una aplicación futura, donde se pueda disminuir costos de producción y mejorar la producción en campo con productos orgánicos libres de químicos y de gran viabilidad productiva.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Solanum betaceae*), con miras a una propagación masiva de plantas élite

1.3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar el método de desinfección para la especie *Solanum betaceum* que permita introducirla en el sistema de cultivo *in vitro* con bajos niveles de oxidación y contaminación

- Determinar el medio de cultivo ideal para las fases de establecimiento y multiplicación de los explantes de *Solanum betaceum*, que ofrezca condiciones ideales para aplicar las diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento.
- Determinar la concentración de brasinoesteroides óptima para el crecimiento y desarrollo de las semillas en la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* de tomate de árbol.
- Evaluar la interacción entre brasinoesteroides con la auxina ácido indol acético (AIA) y la citoquinina bencilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación del cultivo *in vitro* de *Solanum betaceum*.
- Verificar en la fase de aclimatación que las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* sean viables para su desarrollo en campo.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características Generales de la Especie en Estudio

1.4.1.1 Taxonomía

Las solanáceas son una familia de plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas, que pertenecen al orden Solanales, de las dicotiledóneas Magnoliopsida. Comprende aproximadamente 98 géneros y alrededor de 2700 especies, con una gran diversidad de hábito, morfología y ecología. En esta familia se incluyen especies alimenticias importantes como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum betaceum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los pimientos o ajíes (*Capsicum spp*). (Olmstead, R, *et al.* 1999).

Solanum betaceae es conocido internacionalmente como tomate de árbol, sachatomate, tomate andino, "tomate cimarrón, tomate extranjero, granadilla y contragallinazo" en Centroamérica, "berenjena y tomate de palo" en México, "tomate de monte, tomate silvestre, pepino de monte y gallinazo panga" en Colombia y Perú, "chilto, sima, tomate de lima" en Bolivia, "tomate chimango, tomateiro da serra" en Brasil y "Tamarillo" en Nueva Zelanda, país en donde ha sido introducido. (Reyes, Sanabria, 1993)

En base a la propuesta realizada por Bohs (1989) de incorporar la totalidad del género *Cyphomandra* en el género *Solanum*, la nueva clasificación taxonómica, es la siguiente:

Reino:	Plantae
División:	Fanerógamas
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledóneas
Subclase:	Mirtaceae
Orden:	Tubiflorales
Familia:	Solanácea
Género:	<i>Solanum</i> (<i>Cyphomandra</i>)
Especie:	<i>Solanum betaceum</i>

Los nombres detallados a continuación se consideran sinónimos de *Solanum betaceum*: *Solanum crassifolium* por Ortega en 1800; *Pionandra betacea* por Miers en 1845; *Cyphomandra betacea* por Sendtn en 1845; *Cyphomandra procera* por Wawra; en 1863; *Solanum insigne* por Madeira en 1868; *Cyphomandra crassifolia* por Kuntze y Revis en 1898. Finalmente quedo nombrada la especie como *Solanum betaceum* por Anales en 1799. (Olmstead, *et al.* 2008).

1.4.1.2 Distribución Geográfica y Origen de la Especie

La familia Solanácea es considerada una familia cosmopolita, distribuyéndose por todo el mundo a excepción de Antártida. La mayor diversidad de las especies se encuentra en América del Sur y América Central. El origen nativo de *Solanum betaceum* no está resuelto. A veces se lo considera extinto. Las subpoblaciones putativas silvestres son pequeñas, en áreas restringidas de Argentina y de Bolivia. Está muy cultivado en los Andes, Europa, África, Nueva Zelanda. (Hernández y León, 1992).

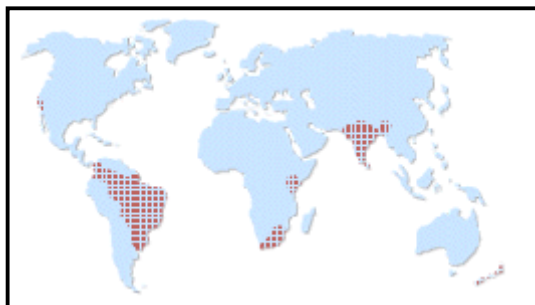


Figura 1.1 Distribución mundial de *Solanum betaceum*, y centros de diversidad propuestos por Munch en 1986 (Tomado de Fundación EROSKI, 2009).

La especie procede de Sudamérica, concretamente de los Andes peruanos. Se cultiva en zonas tropicales altas de Brasil, Colombia y Sudáfrica. Hoy día son países productores Colombia, Brasil, Nueva Zelanda, Kenia, Sudáfrica, California, India y Sri Lanka. (Figura 1.1). Existen tres variedades que se diferencian por el color de su piel: rojo, naranja (más dulces y con semillas tiernas y de menor tamaño que el resto) y amarillo (Bernal, 1995).

Las variedades más comercializadas son: Tomate común, de forma alargada, color morado y anaranjado; Tomate redondo, colombiano, de color anaranjado o rojizo y Tomate mora, de Nueva Zelanda, forma oblonga y de color morado. El sabor de la fruta difiere en su mezcla de sabor dulce y agrio según la variedad.

La especie puede ocupar una gran variedad de ecosistemas, desde los desiertos hasta los bosques tropicales y, frecuentemente se las halla también en la vegetación secundaria que coloniza áreas disturbadas. El género *Solanum* es uno de los más grandes de Angiospermas, es de distribución mundial, con la mayor concentración de especies en el trópico y subtrópico. No obstante, la mayoría de las especies de *Solanum* son originarias de sudamérica, especialmente en los Andes. Existen centros secundarios de diversidad y endemismo en Norte América, América Central, el este de Brasil, las Indias Occidentales, Australia, África y Madagascar (Bohs, 1989).

La planta se caracteriza por su alta capacidad de adaptación en diferentes zonas climáticas como los Andes ecuatorianos donde hay climas templados y frescos, en altitudes comprendidas entre 200 a 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Sánchez, 1996). La producción empieza al año y medio o dos años después de la

siembra, siendo intensa solamente por 4 ó 5 años (5 meses /año) pudiendo durar de 10 a 12 años. (Geilfus, 1994)

1.4.1.3 Descripción botánica y morfología

Es un árbol o arbusto plurianual de 3 a 4 años, con una altura entre 2 y 3 metros, presenta un tallo único, con corteza grisácea y follaje perenne, el cual se pierde en gran porcentaje en zonas con frío invernal y sus hojas se hielan.

1.4.1.3.1 Raíz

El sistema radicular del tomate de árbol se caracteriza por que puede alcanzar profundidades de hasta un metro. La mayor concentración de raíces conocidas como absorbentes se encuentra entre los 25 y 50 centímetros de profundidad. El crecimiento del sistema radicular depende de algunos factores como el manejo del suelo durante la plantación, el desarrollo del cultivo, la ubicación de los fertilizantes o abonado y el tipo de sistema de riego. (Sánchez y Vargas, 2009)

1.4.1.3.2 Tallo

El tallo es único, corto, frágil, de corteza grisácea y algo curvo en ocasiones. Su forma es cilíndrica y puede alcanzar alturas ente 2,5 y 3 metros. Se encuentran tres ramas a un rango de altura entre 1,0 y 1,5 metros, de acuerdo al genotipo cultivado, la nutrición, y el ambiente donde se desarrolla.

En plantas injertadas, se obtiene alturas menores, cercanas a los 2 metros. El tronco es erecto, presenta una coloración verde-oscuro o verde pálido con lenticelas y pubescencias en estado juvenil, que luego se torna verde grisáceo en el estado adulto; inicialmente es suculento, pero conforme se desarrolla y ramifica empieza a tornarse semileñosa. (Sánchez y Vargas, 2009).

1.4.1.3.3 Hojas

El follaje es perenne, aunque en zonas con frío invernal, se pierde bastante y se hielan las hojas. La forma se describe como acorazonadas, subcarnosas, suavemente pubescentes por el envés. Son hojas alternas, enteras, en los extremos de las ramas; tiene un pecíolo robusto de 4 a 8 centímetros de longitud.

Cuando las plantas son jóvenes, las hojas que se desarrollan en el ramo principal son coniformes, grandes, de 30 a 40 centímetros de largo; y las hojas que se implantan en ramas secundarias y terciarias que forman la copa miden alrededor de 20 centímetros. El color de las hojas cambia con los genotipos, es verde oscuro en los cultivares anaranjado puntón y de color rojizo en sus ápices en tomate rojo puntón (Bernal, 1995).



Figura 1.2 Foto tomada del Huerto del M.Sc. Norman Soria.
Patate - Tungurahua. Abril 2008.

1.4.1.3.4 Flores

Las flores que genera la especie son pequeñas, con una longitud de 1,3 a 1,5 centímetros, el color que presentan es blanco-rosáceo, dispuestas en pequeños racimos terminales. Tienen 5 pétalos y 5 estambres amarillos. La floración se da en los meses de Mayo y Junio. (Hunziker, 1979)

Los racimos se desarrollan en las axilas de las hojas o sobre ellas y pueden estar conformados hasta por 40 flores. Fenotípicamente son pediceladas, pentámeras, con corola de color rosado. La polinización es autógama (polinización por polen de la

misma flor), en gran parte; pero también tiene polinización alógama (polinización cruzada) ya que las flores abiertas son visitadas por abejas.

1.4.1.3.5 Fruto y Semillas

El fruto se presenta como una baya ovoide de 4 a 10 centímetros de longitud y de 3 a 5 centímetros de ancho, que se encuentra suspendida por un pedúnculo largo; la cáscara es lisa, de color rojo o anaranjado en la madurez, con estrías de color más claro. Presenta un largo pedúnculo en el que persiste el cáliz de la flor.

El mesocarpio es de color amarillo crema a naranja de sabor ligeramente amargo, el mucílago gelatinoso que rodea las semillas es ligeramente ácido y dulce, de color naranja a violeta. Las semillas son pequeñas de 2 a 4 milímetros de largo y de forma aplanada lenticular, de color blanco cuando son tiernas, a medida que alcanzan la madurez se cubren de pigmentos anaranjados, rojizos o morados intensos, que darán la tonalidad al jugo de la fruta; su número varía entre 200 a 300 unidades en los diferentes cultivares (Salinero y Vela, 2005).

Los frutos son comestibles, pudiendo comerse crudos directamente o en ensaladas o preferiblemente se cocinan para preparar jugos, dulces y postres. Proporcionan hierro, potasio, magnesio, fósforo y vitaminas A, C y E.



Figura 1.3. Inflorescencia y fruto de *Solanum betaceum*. Fotos tomadas del huerto de Ing. Norman Soria. Patate - Ecuador. Abril 2008

1.4.1.4 Usos y Propiedades

1.4.1.4.1 Uso Medicinal

El género *Solanum* es empleado en la medicina tradicional de Sur y Centroamérica, con alrededor de siete especies, de las cuales tres de ellas corresponden a especies comestibles: *S. betacea*, *C. hartweggi* y *C. sibundoyensis*. Se emplean comúnmente las hojas, con menor frecuencia los frutos y tallos. es así que estas especies están dirigidas a heridas y llagas, parásitos intestinales, afecciones de la garganta, dolores musculares, afecciones del hígado, gripe, afecciones cutáneas, diabetes, reumatismo, "fiebre intestinal", mordeduras de serpientes y erisipela. (Reyes y Sanabria, 1993)

Los usos medicinales de *Solanum betaceum* en Colombia y Ecuador están relacionados con las afecciones de garganta y gripe. El fruto o las hojas, previamente calentadas o soasadas, se aplican en forma tópica contra la inflamación de amígdalas o anginas especialmente. Para la gripe, se consume el fruto fresco en ayunas. Se sabe que el fruto posee alto contenido de ácido ascórbico. Venezuela lo utiliza a este fruto para elevar la hemoglobina, en el tratamiento de la anemia. Otra propiedad atribuida es como remedio de problemas hepáticos en Jamaica y Bolivia. (Reyes y Sanabria, 1993)

1.4.1.4.2 Contenido Nutricional

Estudios químicos en un fruto fresco de *Solanum betaceae* indican que es una fuente importante de beta-caroteno (pro vitamina A), vitamina B6, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E y Hierro. Su contenido de nitrógeno y aminoácidos libres es muy alto. También posee contenidos altos de potasio, magnesio, fósforo, así como de pectinas y carotenoides. Su contenido de carbohidratos es bajo, en promedio una fruta proporciona menos de 40 calorías. El fruto maduro contiene menos del 1% de almidón y 5% de azúcares -sacarosa, glucosa y fructosa.

Otros componentes químicos responsables de la coloración del fruto son antocianinas, leucoantocianinas, flavonas y flavonoles. Se han reportado en *Solanum betaceae* dos alcaloides esteroidales del tipo de los espirosolanos, solasodina y

tomatidenol siendo los que mayor atención han recibido como fuentes alternativas de esteroides de interés farmacéutico. (Reyes y Sanabria, 1993)

1.4.1.5 Enfermedades

El tomate de árbol presenta bastante resistencia a plagas, aunque ocasionalmente puede estar afectado principalmente por enfermedades causadas por hongos como *Phytophthora intestans*, *Fusarium solani* y *Colletotrichum gleosporioides* como las principales y descritas a continuación; además también se tiene problemas con infecciones por nematodos, pues estos constituyen un grave problema en suelos arenosos, por lo que en algunas zonas se cultiva en grandes contenedores para evitar problemas con ellos.

1.4.1.5.1 Lancha o Tizón (*Phytophthora intestans*.)

La enfermedad conocida como Lancha se desarrolla principalmente en períodos lluviosos con temperaturas que fluctúan entre los 10 y 24 °C. (Grados Celsius).

a) Síntomas

Esta enfermedad ataca las hojas presentándose como manchas húmedas circulares de color café a negro, con ondulaciones concéntricas en las que aparece un polvillo blanquecino afectando gran parte de las hojas. De igual manera en las ramas y tallos aparecen manchas negras brillantes de consistencia acuosa que destruyen la corteza y tejidos conductores. En las inflorescencias produce unas manchas negras afectando los vasos conductores con lo cual provoca la caída de flores y frutos en formación.

b) Ciclo Biológico

El hongo para su esporulación necesita de alta humedad relativa cercana al 100% y temperaturas comprendidas entre 16 y 22 °C, y la germinación de los esporangios necesita rocío o cierto volumen de agua en las hojas de las plantas y una menor temperatura entre 10 y 15 °C.

El hongo penetra en el interior del tejido a través de los tubos germinales desarrollándose el micelio al interior con una temperatura en intervalo 17 a 22°C; en temperaturas superiores el hongo se inhibe pero no se destruye (Sánchez y Vargas, 2009).

1.4.1.5.2 Mancha Negra o Pata de Puerco (*Fusarium solani*)

Esta enfermedad también se presenta en zonas húmedas, con altas precipitaciones, y temperaturas alrededor de 15 °C provocando severos daños en a plantación

a) Síntomas

Esta enfermedad inicia con manchas necróticas de color pardo, que generan bifurcación de las ramas principales. Las lesiones evolucionan formando hundimientos y grietas que afectan generalmente la corteza de las ramas. Conforme avanza la enfermedad, llega a la base del tallo, y raíces, dañando el tejido y produciendo fuertes olores por el marchitamiento de la planta (Sánchez y Vargas, 2009).

b) Ciclo Biológico

Las esporas no son de gran cuidado, pues son fácilmente diseminadas por el viento, equipo agrícola, agua o contacto. La propagación de la enfermedad se da cuando el hongo ingresa al tejido por daños de insectos y herramientas de trabajo.

1.4.1.5.3 Antracnosis (*Colletotrichum gleosporioides*)

Esta enfermedad es también conocida como “ojo de pollo”; la cual está ampliamente distribuida y es considerada como la enfermedad más importante del cultivo. Su mayor incidencia se presenta en épocas lluviosas y con temperaturas promedio entre 13 a 15°C y humedad ambiental del 95%.

a) Síntomas

La Antracnosis en hojas se presenta como manchas con anillos concéntricos de color oscuro y bordes definidos. La acción del viento e insectos como el chinche y otros, contribuyen a la diseminación de la enfermedad.

En los frutos los síntomas se dan en sus diferentes estados de desarrollo, los cuales muestran inicialmente decoloración y pequeñas lesiones de apariencia aceitosa, que progresivamente se tornan pardas o negras, con bordes bien definidos, ligeramente hundidas; en el centro de la lesión se forma un polvillo rosado tenue, que corresponde a la esporulación del hongo. Posteriormente las lesiones se van uniendo y llegan a cubrir gran parte del fruto, que se seca y toma la apariencia de momificado. Estas manchas reducen la presentación del fruto, pudiendo ocasionar pérdidas entre el 50 y 100% de la producción (Sánchez y Vargas, 2009).

1.4.1.6 Importancia de la Especie

Dentro de los cultivos frutícolas de clima frío moderado, el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) constituye una alternativa de gran importancia socioeconómica, como cultivo principal o de rotación, ya que es un importante recurso andino tanto alimenticio como medicinal. Las principales zonas productoras del clima frío moderado comprenden entre los 1600 a los 2400 msn (Rondón *et al.*, 1999)

El alto potencial de rendimiento del cultivo por unidad de área si bien es una característica importante, que ofrece excelentes perspectivas para la generación continua de ingresos por su estabilidad en el mercado nacional, y las expectativas como generador de divisas en algunos mercados internacionales, se ve seriamente afectada y disminuida en términos reales por el incremento de diversos factores limitantes, entre los que se destaca la generalización de los problemas fitosanitarios, principalmente de la antracnosis, enfermedad que presenta niveles de incidencia y severidad cada vez más altas en todas las zonas productoras y cuyas pérdidas superan el 40% con control y sin él, un 100% de la producción, esta situación unida a la dependencia exclusiva de fungicidas para su control trae como consecuencia la disminución significativa del ciclo productivo del cultivo. (Rondón, *et al.* 1999)

Dado que los actuales sistemas de control de contaminación basados en la aplicación periódica de fungicidas, no constituyen una solución efectiva al problema de reducción de inóculo potencial dentro del cultivo, y generando contaminación de suelos y acuíferos; por lo cual es prioritario y fundamental el desarrollo de estudios tecnológicos inclinados hacia un mejor conocimiento del comportamiento biológico e inmunitario de la especie, con generación de mayor producción a menor costo y de mejor calidad, premisas necesarias para el desarrollo de alternativas más eficientes, estables y económicas, como es el sistema de cultivo *in vitro*, el cual otorga un manejo integral de la especie en cuanto a enfermedades y producción de calidad.

Estudios futuros deberán atender su demanda como cultivo potencial comercial de gran aceptación, la investigación quimiotaxonómica y fitoquímica de interés farmacéutico, así como el fitomejoramiento de sus variantes de acuerdo a criterios de consumo como sabor, color y tamaño; opciones que ofrece la biotecnología en su aplicación.

1.4.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se basa principalmente en diseñar un medio de cultivo ideal para la sobrevivencia y desarrollo de la especie a tratar, el cual contiene sales esenciales para el crecimiento de un explante, en condiciones estériles, libres de contaminación, pues al no ser un medio selectivo para plantas se puede generar crecimiento bactericida o fúngico necrosando el explante. Esta técnica se la realiza a tamaño micro, en donde se evalúan diferentes condiciones ideales para el crecimiento de una determinada especie, ya estandarizada la metodología se procede a una mayor escala productiva; es así que la técnica de micropropagación *in vitro* es una herramienta que ha permitido desarrollar aplicaciones en la agricultura, horticultura y silvicultura como investigación más básica y de gran producción comercial. (Pierik, 1990).

La multiplicación masiva *in vitro* permite reproducir cientos de clones de una misma especie, es decir con genotipos y fenotipos similares y ofrece ventajas productivas como menores tiempos de multiplicación; tener mayor control de sanidad, facilita el transporte de material y permite multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Roca y Mroginski, 1993). De igual forma esta técnica permite obtener nuevas plántulas todo el año, independientemente del factor climático como

temperatura, luz, humedad, entre otros, abasteciendo así el mercado todo el año (Kester *et al.*, 1990).

Actualmente esta técnica tiene numerosas aplicaciones, siendo la principal la propagación masiva de plantas, especialmente especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción. Como se parte de tejido somático se genera clonación de individuos con características agronómicas deseables durante todo el año, en donde se incluye que estén libres de contaminación bacteriana, viral o micótica. Es así que la obtención de plantas élites para diversos estudios fisiológicos se da en base a germinación de semillas *in vitro*, producción de plántulas haploides o propagación clonal por meristemas y yemas axilares (Pierik, 1990).

En cuanto a la mejora genética vegetal que ofrece esta técnica, el cultivo de tejidos vegetales muestra su propia relevancia en la aplicación de técnicas como, conservación de germoplasma, obtención de variantes somaclonales, de metabolitos secundarios, el rescate de embriones, la obtención y el cultivo de híbridos somáticos, la obtención de haploides, el desarrollo de semilla sintética. En ese mismo sentido, las denominadas “nuevas biotecnologías”, especialmente las derivadas de los avances en Biología Molecular, Celular, Ingeniería Genética, trabajos de investigación básica de punta en morfogénesis y embriogénesis vegetal tienen una dependencia ineludible con el Cultivo *in vitro* de Tejidos vegetales (Evans, Coleman y Kearns, 2003).

1.4.3 Totipotencialidad Celular

La reproducción asexual de plantas por esta metodología de cultivo *in vitro* se da gracias a que varias células poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin la participación de una fusión de células sexuales o gametas. Esta capacidad se denomina totipotencialidad celular, se encuentra en células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en los distintos órganos de la planta. La totipotencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta y la edad que tenga la planta. (Segretin, *et al.* 2008)

Las células vegetales que crecen en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden generar una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos, respuesta conocida como organogénesis o embriogénesis indirecta; o una respuesta morfogénica, la cual forma directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos) denominado embriogénesis directa. (Pierik, 1988)

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 explante inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células. (Heller, 1996)

1.4.4 Micropropagación

La micropropagación de una especie *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica, pues permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados en medios nutritivos con concentraciones específicas, y condiciones ambientales ideales de temperatura, humedad y luz. Una vez estandarizados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso para llevarlo a una mayor escala de producción.

Esta micropropagación se la puede realizar a través de dos principales métodos, el primero incluye la utilización de las células sexuales, conocido como embriogénesis cigótica; y el segundo involucra el uso de la totipotencialidad de las células, a través del cultivo de meristemas o propagación clonal (asexual)

1.4.4.1 Embriogénesis Cigótica

La embriogénesis cigótica o también conocida en cultivo *in vitro* como la propagación generativa, es la que involucra células recombinadas sexualmente, es decir gametos; el objetivo de esta técnica es el genera plantas *in vitro* netamente

puras, que no hayan estado en condiciones de campo, para así lograr resultados más precisos en un sistema heterótrofo y observar las diferencias con plantas que ingresan a este sistema desde condiciones ambientales externas. (Muñoz, 2006).

Esta técnica se complementa con el tipo de cultivo *in vitro* denominado cultivo de embriones extraídos de semillas, ya que involucra la obtención de semillas viables cuando la germinación *in vivo* es un problema. El método es sencillo, pues se coloca una semilla esterilizada en el medio de cultivo y se espera que germine, en ciertas especies la semilla debe estar cerca de madurar. En otros casos es necesario extraer un embrión inmaduro y hacerlo crecer directamente en un medio sólido (Evans *et al.*, 2003).

La especie *Solanum betaceum* es ideal para aplicar el sistema de cultivo *in vitro* de semillas maduras. Este método se utiliza para eliminar la inhibición de la germinación de las semillas y para mejorar los porcentajes de germinación comparados con los obtenidos *in vivo*. Por ser tejidos embrionarios, otorgan excelente material para ser usados en estudios de propagación clonal *in vitro* en virtud de su naturaleza y alto potencial regenerativo (Pierik, 1990).

Según Roca y Mroginski, 1993; el cultivo aséptico se ha convertido en un “rescate” de los embriones que normalmente no crecen ni se convierten en plántulas. Si bien no se está clonando la especie, se está preservando su germoplasma, lo cual es ideal cuando se trata de especies difíciles de germinar o en procesos de extinción (Roca y Mroginski, 1993).

Cuando se utiliza embriones maduros, éstos incrementan su actividad autotrófica y no se necesita de un medio muy complejo. Azúcar o glucosa es la fuente de carbohidratos más usual, el aminoácido glutamina se utiliza principalmente en subcultivos, cuando la plántula ya está acostumbrada al sistema *in vitro*. La concentración del gel semi-sólido es importante porque puede generar deshidratación del embrión (Evans *et al.*, 2003).

En cuanto a la utilización del medio de cultivo ideal, éste debe ser adaptado para cada especie. Aunque diferentes medios son capaces de mantener los microcultivos, el medio utilizado preferencialmente es el medio Murashigue & Skoog (Nuñez, 2007) y para embriones inmaduros el medio basal Gamborg (Evans *et al.*, 2003).

Como inconvenientes de esta técnica se presentan la germinación precoz de los embriones cigóticos, que originaran plantas anormales o débiles; lo cual se combate con una alta presión osmótica, baja tensión de nitrógeno, elevado nivel de potasio, nitrógeno, y ácido abscísico en el medio; en general, cuan más joven sea el embrión, más osmolaridad requerirá en el medio de cultivo (Nuñez *et al.*, 2008).

1.4.4.2 Cultivo de Meristemas

La propagación clonal por cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales. Obteniendo varias ventajas en su aplicación como el control de las condiciones ambientales, lo cual produce plántulas no totalmente autótrofas, sino heterótrofes; permite estudiar diversos procesos fisiológicos; evita el riesgo de contaminación con patógenos, se logra obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos, de manera uniforme, ya que la variación somaclonal es mínima. De igual forma se facilita el transporte del material.

Las zonas meristemáticas están compuestas por células no diferenciadas que se dividen activamente, también llamadas células totipotentes por su habilidad de dar lugar a todos los tejidos vegetales. Típicamente, las células meristemáticas son pequeñas, poliédricas, en su mayoría equidimensionales. El citoplasma ocupa la mayor parte de volumen celular ya que las vacuolas son muy pequeñas, las células meristemáticas no contienen cloroplastos ni ningún otro plástido diferenciado, la pared celular es delgada y carece de pared secundaria.

La utilización de este tejido vegetal en el sistema de cultivo *in vitro* se da porque las células meristemáticas son homologas funcionales de las células madre que dan lugar a todos los tejidos en animales, y se caracterizan por mantenerse siempre jóvenes y poco diferenciadas. Tienen capacidad de división y de éstas células aparecen los demás tejidos; diferencia primordial entre tejidos vegetales y animales, ya que las células animales llegaron a la multicelularidad de una forma completamente diferente. (Castillo, 2004).

La yema apical contiene un grupo de células que conforman el meristema apical que va entre 0,01 y 0,3 milímetros; tejido embrionario pero somático que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta. A partir de ellos se pueden regenerar plantas completas. El uso de yemas, ápices y meristemas para micropropagación de especies ha tomado gran acogida por la comunidad científica por la gran regeneración de especies que otorga; es por esto que son materiales ideales para desarrollar plántulas a menor tiempo y libres de contaminación, manteniendo el genotipo y fenotipo de la especie élite. No siempre se obtiene una planta completa, sino en ocasiones con distintas concentraciones hormonales se logra estimular la formación de brotes múltiples (Roca y Mroginski, 1993).

Las plántulas que se obtiene *in vitro* generan ramas axilares, las cuales pueden ser subcultivadas en medio ideal para micropropagar la especie de manera más eficiente; teóricamente, los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares o enraizar como se busca en este proyecto de tesis a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. (Roca y Mroginski, 1993).

1.4.4.2.1 Etapas de la Micropropagación Clonal *in vitro*

El sistema de cultivo *in vitro* se divide en varias etapas bien definidas, pues se necesita de un orden para hacer que la metodología genere resultados, es así que depende del tipo de explante a utilizar y el tipo de especies, pues se puede agregar u omitir alguna etapa durante el proceso.

Etapas 0. Selección de Plantas Donadoras

La mayoría de proyectos basados en cultivo *in vitro* utilizan como explante yemas apicales y axilares por poseer tejido meristemático, el cual mientras más joven y menos diferenciado sea, mejor será la respuesta *in vitro*; por ejemplo ápice, hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera, entre otros es decir se trabaja con material de plantas jóvenes en donde sus células no tengan reducido su potencial de crecimiento por senescencia. Otro motivo de la utilización de estos explantes es que no se genera variación somaclonal por ser un tejido somático, originando una certeza de que se está reproduciendo una planta con idéntica carga génica que la madre. (Roca y Mroginski, 1993).

Un cultivo en condiciones de asepsia, se lo genera con explantes de buena nutrición y desarrollo adecuado. Motivo por el cual se sugiere mantener a las plantas madre durante un periodo de tiempo considerable en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

Etapa 1. Desinfección del Material Vegetal

Los explantes extraídos de las plantas madre pueden ser yemas, porciones de hojas, raíces o semillas. La desinfección de los fragmentos de planta madre trata de eliminar los contaminantes externos, siendo los más comunes hongos y bacterias que habitan en forma natural en el ambiente; cabe decir que existen especies que traen contaminación endógena que no se expresa inmediatamente después de la siembra. Se utiliza para la desinfección principalmente agua estéril, jabón, hipoclorito de sodio, fungicidas si es muy drástica la contaminación y etanol. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia con el uso de las cámaras de flujo laminar. (Pierik, 1990).

Etapa 2. Establecimiento del Material *in vitro*

Estandarizado el método de desinfección las semillas o las yemas que se va a utilizar como explante se ponen en medio de cultivo estéril. La formulación del medio cambia según lo se quiera obtener, ya sea un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales. En esta etapa se trabaja con un medio basal, el cual va a acostumbrar a los explantes a un sistema *in vitro*, en donde se trabaja con condiciones ambientales y nutritivas controladas, originando que las plántulas que se desarrollen no sean totalmente autótrofas.

En esta etapa se obtienen muchas formulaciones de medios de cultivo según el tipo de planta y el explante con el cual se trabaje. Por ejemplo el medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es el más empleado por su equilibrio nutricional; razón por la cual el medio de cultivo empleado es uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogénica deseada. (Pierik, 1990).

Tabla 1.1 Composición de medios de cultivo para células vegetales (Adaptada del Libro *Biotecnología*, UNQ 2006).

Componentes	Características y ejemplos
Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada para la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales Otras: giberelinas, ácido absícico, etileno, brasinolidas.
Mezclas de sustancias poco definidas	Ejemplos: extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Usados como soporte. Incluyen agar, azarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

Etapas 3. Multiplicación de los Brotes

Ya estandarizado el medio de cultivo ideal para la especie, y acostumbrada al sistema *in vitro* se procede a la multiplicación de la misma, es decir en el medio de cultivo se introduce la utilización de reguladores de crecimiento o fitohormonas, con las cuales se va a obtener las morfologías deseadas para la investigación. La etapa de establecimiento genera principalmente brotes de procedencia axilar o adventicia con

varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema, material con el cual se desarrollara subcultivos con distintas concentraciones de biorreguladores para obtener una metodología estandarizada para una futura producción masiva de la especie. (Roca y Mroginski, 1993).

En esta etapa ya se tienen dominados los problemas de oxidación y contaminación que genera la especie en la etapa de establecimiento, por lo cual se trabaja solo con plántulas sobrevivientes y sanas. Cabe mencionar que en los subcultivos que se desarrolla en esta etapa no se coloca nuevamente reguladores de crecimiento, solo en el primer medio de introducción a la multiplicación, puesto que haría se sobresaturen las plantas hormonalmente.

Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados. (Castillo, 2004).

Etapas 4. Enraizamiento de los Explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente explantes individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Castillo, 2004)

Etapas 5. Aclimatación de los Explantes Enraizados.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales.

En el momento en que se extraen los explantes enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Las plántulas enraizadas, deben ser aclimatadas a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (Devlin, 1976).

Estas plántulas se plantarán en contenedores (almacigueros) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando.

Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

1.4.4.2 Factores Químicos

a) Carbohidratos

La fuente de carbono que tienen los medios de cultivo nutricionales es el azúcar, ya que con este compuesto superan su sobrevivencia siendo heterótrofos en este sistema *in vitro*. La concentración de azúcar, que puede ser sucrosa, fructosa o sacarosa se mantiene en rangos del 1 a 5%. La concentración de carbono también

depende del origen del material a utilizar, si es un material viejo o dañado se recomienda utilizar bajas concentraciones de carbono, puesto que este material tienen a autonecrosarse generando fenoles para su oxidación, con la baja de carbono se logra que el material vegetal logre sobrevivir a condiciones *in vitro* pero que no logre defenderse. (Pierik, 1990).

b) Sales Inorgánicas

Los medios de cultivo están compuestos principalmente por dos tipos de sales conocidas como macronutrientes que se utilizan en concentraciones milimolares (mM), y micronutrientes que se utilizan en concentraciones micromolares (µM), siendo los primeros esenciales para un medio nutritivo; y los segundos pueden ser modificados acorde a los requerimientos y características de la especie a investigar. Los nutrientes inorgánicos son elementos minerales, que basados en sus concentraciones de uso se clasifican en dos grupos: macroelementos.

Tabla 1. 2. Elementos contenidos en los medios nutritivos y concentraciones necesarias (Tomado de Evans et al., 2003).

	ELEMENTOS	CONCENTRACIÓN
Macroelementos	Nitrógeno (NO_2^-) (NH_4^+)	20 - 40 mM
	Azufre (SO_4^{2-})	1 - 3 mM
	Fósforo (PO_4^-)	1 - 3 mM
	Calcio	1 - 3 mM
	Magnesio	1 - 3 mM
	Potasio	20 - 30 mM
Microelementos	Hierro	
	Boro	-
	Cobalto	0,1 µM
	Cobre	0,1 µM
	Iodo	-
	Manganeso	5 - 30 µM
	Molibdeno	0,1 µM
	Zinc	5 - 30 µM

c) Vitaminas, Aditivos y Aminoácidos

Son compuestos químicos que no son esenciales para la célula vegetal, pero se incluyen en muchos procesos metabólicos que se dan en el crecimiento y desarrollo de la especie. Entre las más utilizadas tenemos el ácido nicotínico (niacina), piridoxina

(piridoxol, vitamina B6), ácido fólico, ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E). (Peña, 2009)

La utilización de mioinositol es muy frecuente en medios para monocotiledóneas, gimnospermas y algunas dicotiledóneas, pues juega un papel importante en el desarrollo de la pared celular y la membrana (Evans *et al.*, 2003). Los aminoácidos, en especial la L-glutamina son usados como fuente de nitrógeno orgánico; para así estimular la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

d) Reguladores de Crecimiento

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos o sintéticos provenientes de las plantas superiores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las especies, pues son moléculas activas y de fácil degradación que se utiliza en ínfimas cantidades. En el sistema del cultivo *in vitro* se utilizan especialmente auxinas y citoquininas para este crecimiento y desarrollo de los explantes. (Pierik, 1990).

Auxinas

El nombre auxina proviene del griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. El ácido indolacético (IAA) es la forma predominante, sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen otras auxinas indólicas naturales en plantas.

Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas. Cuando se encuentran conjugadas, la auxina se encuentra metabólicamente unida a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso parece ser reversible. La concentración de auxina libre en plantas varía de 1 a 100 mg/kg peso fresco. En contraste, la concentración de auxina conjugada ha sido demostrada en ocasiones que es sustancialmente más elevada. (González, 2003)

Una característica sorprendente de la auxina es la fuerte polaridad exhibida en su transporte a través de la planta. La auxina es transportada por medio de un mecanismo dependiente de energía, alejándose en forma basipétala desde el punto

apical de la planta hacia su base. Este flujo de auxina reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical. El movimiento de la auxina fuera de la lámina foliar hacia la base del pecíolo parece también prevenir la abscisión.

La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológico como el crecimiento y diferenciación celular, y por lo tanto en el crecimiento en longitud de la planta. Estimulan también el crecimiento y maduración de frutas, da floración, senectud y geotropismo. (Evans *et al.*, 2003).

La auxina se dirige a la zona oscura de la planta, produciendo que las células de esa zona crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara de la planta. Esto produce una curvatura de la punta de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas. También se utilizan las auxinas sintéticas: ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1 – naftalenacético (ANA), ácido 3 – indol butírico (AIB) y ácido p – clorofenoxiacético (Evans *et al.*, 2003).

Citoquininas

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citoquinina (cito kinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz (*Zea*). (Pierik, 1990).

Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular. La presencia de altos niveles de citoquininas puede facilitar su habilidad de actuar como una fuente demandante de nutrientes. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. (González, *et al.* 1998)

Otros efectos generales de las citoquininas en plantas incluyen estimulación de la germinación de semillas, estimulación de la formación de frutas sin semillas, ruptura del letargo de semillas, inducción de la formación de brotes, mejora de la floración, alteración en el crecimiento de frutos y ruptura de la dominancia apical.

Las citoquininas más comunes son la kinetina, BAP, 2ip y PBA. Actúan sinérgicamente con las auxinas para promover una mayor división celular y por ende mejor crecimiento y desarrollo de la planta. En concentraciones elevadas (1 – 10 mg L⁻¹) pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Se puede decir que promueven la formación de vástagos axilares porque disminuyen la dominancia apical, además de retardar el envejecimiento (Pierik, 1990).

Brasinoesteroides

En las técnicas que utiliza la micropropagación se encuentra la organogénesis somática y embriogénesis zigótica, las cuales son efectivas en la obtención de plantas completas y mejoradas en poco tiempo con grandes resultados; pero este proceso se ha visto complicado por los altos costos de los reactivos, en especial de los biorreguladores, tan necesarios en la elaboración de los medios de cultivo. Varios países como Ecuador han visto la necesidad de investigar la forma de sustituir estas sustancias con productos naturales que puedan ejercer la misma actividad que los productos sintéticos; de esta manera la utilización de biopreparados de producción comercial representan en la última década una alternativa para aumentar los rendimientos agrícolas, disminuir los costos de producción y hacer un mejor uso de los productos naturales. (Espinoza *et al*, 2005)

El implemento de brasinolidas o llamados también brasinoesteroides como sustancias semi-sintéticas que estimulan el crecimiento vegetal; poseen grandes posibilidades de sustitución de los reguladores de crecimiento tradicionales como las auxinas y citoquininas. Estos compuestos son de naturaleza esteroide, siendo, la brasinolida, el primer compuesto aislado a partir de una fuente natural en 1979 de *Brasica napus* (Adam, 1998). Los brasinoesteroides son biopreparados de producción comercial, considerados reguladores del crecimiento de origen natural.

Brasinoesteroides (BRs) son productos naturales que se encuentran en las plantas a muy bajas concentraciones. Las respuestas a los brasinoesteroides incluyen efectos sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación del estrés. Los brasinoesteroides, además, interactúan con las señales ambientales y pueden afectar el desarrollo de insectos y hongos (Chory *et al*, 1996; Sasse, 1997).

A partir del aislamiento e identificación de la brasinólida del polen de la *Brassica napus* se intensificaron las investigaciones encaminadas a estudiar los efectos que este nuevo compuesto y otros relacionados provocan en las plantas. Así, ya en 1983, se informó que el tratamiento de plantas de lechuga con 22, 23, 24-triepibrasinólida incrementó el rendimiento del cultivo cuando era cultivado en un suelo no fertilizado óptimamente (Hamada, 1986).

Posteriormente, al evaluar los usos prácticos de la brasinólida, se consideró que una acción importante de este compuesto era acelerar la resistencia a varios estreses, tales como bajas temperaturas, infección por hongos, a los daños por herbicidas y a la salinidad en el suelo (Gómez, *et al*, 2000).

La baja tasa de multiplicación, ocurrencia de alta oxidación de los explantes y crecimiento lento son algunos problemas que encontrados en la micropropagación de los plátanos y en particular del híbrido FHIA-21 (AAAB). Los brasinoesteroides pueden sustituir a algunos reguladores del crecimiento empleados en el cultivo de tejidos (Gómez, *et al*, 2000).

Es así que los brasinoesteroides representan una nueva clase de productos naturales, reconocidos en la actualidad como biorreguladores vegetales capaces de influir en diferentes procesos fisiológicos en las plantas, como la elongación, división celular y el desarrollo vascular y reproductivo. En Cuba, se ha estado trabajando en la síntesis de análogos de brasinoesteroides con diferentes estructuras químicas, para la realización de estudios biológicos y probar su efectividad como biorreguladores, tanto en condiciones *in vitro* como de campo (Nuñez, 2000).

e) Antioxidantes

Son compuestos químicos que se utilizan principalmente en explantes que generan gran cantidad fenólica como medida de rechazo a la manipulación *in vitro*. Pues las plantas empiezan a auto-oxidarse produciéndose necrosis. Entre los compuestos existen moléculas que son termolábiles y otras que si resisten el autoclavado del medio, entre ellos tenemos al ácido cítrico, ácido ascórbico y cisteína como los más utilizados (Peña, 2009)

f) Agente Gelificante

El agente solidificante es el soporte de los macro y micro nutrientes, debe tener una densidad que permita que los explantes absorban los nutrientes pero que a su vez los mantenga firmes para obtener un crecimiento óptimo, existen tipos de medio que también utilizan medios sin este gel solidificante los cuales generan como mayor problema la hiperhidratación del explante Las siguientes sustancias son utilizadas como agentes gelificantes: agar, agarosa, gelatina o gomas géllicas (Phytigel de Sigma, Gelrite de Merck), los cuales como característica esencial es que no interactúan con los nutrientes del medio, poseen un pH neutro y no son digeridos normalmente por enzimas vegetales (Evans *et al.*, 2003).

1.4.4.2.3 Factores Físicos

Las tasas de crecimiento, desarrollo y muchas de las características fisiológicas y morfológicas de las plantas formadas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, y gaseoso de los recipientes (Kozai *et al.*, 1992). El ambiente *in vitro* presenta unas tasas bajas de flujo y energía (Tabla 3), debido a la existencia de un sistema semicerrado, con mínimas variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios de la concentración de CO₂ (Dióxido de carbono) en el interior de los recipientes.

La manipulación del ambiente en los recipientes de cultivo, modula las características morfo-anatómicas y fisiológicas de las plantas obtenidas a través de cultivo de tejidos (Majada *et al.*, 1998). De forma general podríamos decir que el fenotipo inducido por las condiciones de cultivo es intermedio entre plantas crecidas en ambientes herméticos no controlados y plantas aclimatadas.

Tabla 1.3 Características generales del ambiente *in vitro* en la micropropagación convencional con respecto a las variables de estado y de flujo. (Tomado de Castillo .2004)

VARIABLES DE ESTADO	VARIABLES DE FLUJO
Ambiente aéreo	Flujo de materia y energía
1. Elevada humedad relativa	1. Tasa de transpiración baja
2. Temperatura del aire	2. Tasa fotosintética baja
3. Concentración elevada de CO ₂ durante el periodo oscuro y baja durante el periodo luminoso	3. Elevada respiración en oscuridad
4. Elevada concentración de etileno	4. Flujo de radiación térmica y de fotones bajo
	5. Balance negativo de CO ₂
Ambiente en el sustrato	6. Tasa baja de absorción de agua
5. Elevada concentración de azúcar.	7. Tasa baja de absorción de azúcares
6. Elevada concentración de sales	8. Tasa baja de absorción de iones
7. Baja concentración de oxígeno, y liberación de exudados tóxicos	9. Tasa baja de absorción de componentes del medio
8. Elevadas concentraciones de reguladores	

a) Ambiente aéreo en el interior del recipiente

El tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior durante el cultivo. En recipientes de cultivo cerrados herméticamente se ha detectado una acumulación de gases (CO₂, etileno -C₂H₄-, etano, etanol y acetaldehído) que, además de influir o controlar el crecimiento, también pueden afectar a procesos de diferenciación y morfogénesis (Thomas y Murashige, 1979; Righetti *et al.*, 1990).

b) Influencia del CO₂

La concentración de CO₂ aumenta de forma constante durante el período oscuro, aunque una vez reiniciado el período luminoso, el nivel de CO₂ desciende rápidamente (Fujiwara *et al.*, 1987; Fujiwara y Kozai, 1995). En estas condiciones, la falta de CO₂ disminuye los requerimientos lumínicos de los cultivos, siendo más importante su papel en fotomorfogénesis que en fotosíntesis. Además, generalmente los gradientes de potencial hídrico y los coeficientes de difusión del aire y del medio en el recipiente son más pequeños que los existentes en el exterior, lo que genera bajas tasas de flujo de agua en el recipiente (Sallanon y Coudret, 1990).

c) Variación Somaclonal

Este fenómeno se presenta tanto en ensayos preliminares como en investigaciones con protocolos totalmente sistematizados y estandarizados, la variación somaclonal es un hecho, si bien se parte de plantas madre en donde no se tuvo recombinación genética se ha comprobado que ocurren modificaciones a nivel cromosomal en las células y tejidos cultivados con técnicas *in vitro*, muchas de las cuales se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. (Larkin y Scowcroft, 1981)

La variación somaclonal depende del tipo de explante que se trabaje y origina variabilidad genética heredable por mutaciones y variabilidad epigenética (no heredable), causada por cambios fenotípicos temporales. Cabe mencionar que la expresión de las mutaciones depende de gran manera del medio ambiente que rodee a la planta (Evans *et al.*, 2003).

1.5 Sistema de Hipótesis

La aplicación de brasinoesteroides en la fase de establecimiento del cultivo *in vitro* de tomate de árbol *Solanum betaceae* ayuda significativamente en el crecimiento y desarrollo de los explantes.

La aplicación de auxinas, citoquininas y brasinoesteroides sobre la fase de multiplicación *in vitro* de tomate de árbol (*Solanum betaceae*) mejora el crecimiento y desarrollo de las plántulas obtenidas, presentando diferencias significativas entre los tratamientos.