



BIOTECNOLOGÍA VEGETAL APLICADA

MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL SILVESTRE (*Solanum* sp.) CON FITORREGULADORES

Biotecnología para la agricultura y conservación andina.

ÁLVARO PAZMIÑO GAIBOR



ISBN: 978-9907-0-0424-3
2025

**BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
APLICADA:
MICROPROPAGACIÓN IN
VITRO DE TOMATE DE
ÁRBOL SILVESTRE
(SOLANUM SP.) CON
FITORREGULADORES**

AUTOR:

ÁLVARO XAVIER PAZMIÑO GAIBOR



Este libro ha sido debidamente examinado y valorado en la modalidad doble par ciego con fin de garantizar la calidad científica.

©Grupo Editorial BLR
Universidad Estatal de Bolívar
Riobamba – Ecuador
Correo: publicaciones@grupoblzr.com
<https://grupoblzr.com/libros-investigo>
REPOSITORIO



Pazmiño, A. (2025) Biotecnología vegetal aplicada: micropropagación in vitro de tomate de árbol silvestre (solanum sp.) con fitoreguladores. Grupo Editorial BLR.

© Álvaro Xavier Pazmiño Gaibor

ISBN: 978-9907-0-0424-3

El copyright promueve la libertad de expresión, protege la diversidad de ideas y conocimiento, además apoya la libre expresión. Se prohíbe de manera rigurosa la producción o el almacenamiento de esta publicación, ya sea en su totalidad o en parte, está estrictamente prohibido por ley, incluyendo el diseño de la portada, así como su difusión a través de cualquiera de sus medios, ya sean electrónicos, mecánicos, ópticos, de grabación o incluso de fotocopia, sin permiso de los propietarios de los derechos de autor.

FILIACIONES DEL AUTOR

Álvaro Xavier Pazmiño Gaibor

Universidad Estatal de Bolívar

Correo Electrónico: alvaro.pazmino@ueb.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7516-6458>



PRÓLOGO

La biotecnología vegetal ha experimentado en las últimas décadas un notable avance, consolidándose como un eje fundamental para enfrentar los desafíos contemporáneos de la agricultura, la seguridad alimentaria y la conservación de la biodiversidad. En este marco, el presente libro surge como una propuesta académica y científica que busca integrar los fundamentos teóricos de la biotecnología vegetal con aplicaciones prácticas orientadas al cultivo de *Solanum* sp., específicamente el tomate de árbol silvestre, una especie de alto valor económico, nutricional y genético.

El texto desarrolla, de manera progresiva y estructurada, los principales componentes que sustentan el cultivo *in vitro*: desde los antecedentes históricos y conceptuales, hasta las técnicas de micropropagación, el manejo de fitorreguladores, la formulación de medios de cultivo, y los principios del diseño experimental. Asimismo, incorpora protocolos estandarizados y análisis de resultados que permiten establecer un puente entre la investigación básica y la transferencia tecnológica hacia sistemas productivos sostenibles.

Este libro no solo constituye un material de consulta para estudiantes, docentes e investigadores, sino también una herramienta de referencia para técnicos y profesionales vinculados con programas de mejoramiento genético, conservación de germoplasma y producción comercial. Su aporte reside en ofrecer un enfoque integral que combina la rigurosidad científica con la aplicabilidad práctica, destacando el valor de la biotecnología vegetal como instrumento para enfrentar

problemáticas globales como el cambio climático, la pérdida de diversidad genética y la creciente demanda de alimentos funcionales y saludables.

Invito al lector a recorrer estas páginas con el ánimo de descubrir cómo la ciencia, aplicada con responsabilidad y creatividad, puede convertirse en un motor de innovación, sostenibilidad y desarrollo. La micropropagación y las técnicas in vitro aquí descritas son, más allá de procedimientos de laboratorio, una oportunidad para repensar la relación entre el ser humano y los recursos vegetales, asegurando su conservación y aprovechamiento para las generaciones futuras.

ÍNDICE

PRÓLOGO	i
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	xix
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
INTRODUCCIÓN	xxiii
CAPÍTULO I	25
1 EL GÉNERO <i>SOLANUM</i> Y EL TOMATE DE ÁRBOL	25
1.1 Taxonomía y sistemática del género <i>Solanum</i>	26
1.1.1 Posición filogenética y clasificación familiar	26
1.1.2 Evolución del concepto genérico.....	27
1.1.3 Infragenérica y relaciones filogenéticas.....	27
1.2 Caracterización botánica del tomate de árbol silvestre.....	28
1.2.1 Descripción morfológica general.....	28
1.2.2 Sistema radicular	28
1.2.3 Tallo y ramificación	29
1.2.4 Hojas	29

1.2.5 Inflorescencias y flores	29
1.2.6 Frutos	30
1.2.7 Características distintivas del ecotipo silvestre	30
1.3 Distribución geográfica y centros de diversidad	31
1.3.1 Centro de origen y domesticación	31
1.3.2 Distribución natural	32
1.3.3 Distribución del cultivo en Ecuador	32
1.3.4 Distribución mundial del cultivo	33
1.4 Importancia económica y nutricional.....	33
1.4.1 Importancia económica global	33
1.4.2 Composición nutricional	34
1.4.3 Compuestos bioactivos	35
1.4.4 Propiedades medicinales y funcionales.....	35
1.5 Variabilidad genética y recursos fitogenéticos	36
1.5.1 Conservación de recursos genéticos	36
1.5.2 Caracterización molecular de la diversidad	37
1.6 Problemática de conservación y amenazas	37

1.6.1 Erosión genética	37
1.6.2 Problemas fitosanitarios	38
1.6.3 1.6.3. Impacto del cambio climático	39
1.6.4 1.6.4. Estrategias de conservación y uso sostenible	40
1.7 Conclusiones.....	40
CAPÍTULO II	43
2 FUNDAMENTOS DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	43
2.1 Historia y evolución del cultivo de tejidos vegetales	43
2.1.1 Fundamentos históricos tempranos (1838-1900)	44
2.1.2 Desarrollo de técnicas fundamentales (1900-1950)	44
2.1.3 La Era Moderna del cultivo de tejidos (1950-presente).....	45
2.1.4 Avances recientes en biotecnología vegetal (2000-2025).....	45
2.2 Bases fisiológicas de la totipotencia celular.....	47
2.2.1 Fundamentos moleculares de la totipotencia.....	47
2.2.2 Factores que regulan la expresión de la totipotencia	47
2.2.3 Desdiferenciación y rediferenciación celular	48
2.2.4 Aplicaciones prácticas de la totipotencia en <i>Solanum</i> spp.....	49

2.3	Morfogénesis in Vitro: Organogénesis y embriogénesis somática	49
2.3.1	Organogénesis directa e indirecta	50
2.3.2	Mecanismos moleculares de la embriogénesis somática	51
2.3.3	Ventajas y aplicaciones de la embriogénesis somática	52
2.3.4	Factores que influyen en la morfogénesis in vitro	52
2.4	Factores que influyen en el cultivo in vitro	54
2.4.1	Factores nutricionales	54
2.4.2	Reguladores del crecimiento vegetal	56
2.4.3	Factores ambientales	58
2.4.4	Factores técnicos	59
2.5	Aplicaciones biotecnológicas en especies del género <i>Solanum</i>	60
2.5.1	Micropropagación en Solanáceas de importancia comercial	61
2.5.2	Conservación de Germoplasma	63
2.5.3	Mejoramiento genético asistido por biotecnología	64
2.5.4	Aplicaciones en <i>Solanum betaceum</i> (Tomate de árbol)	65
2.6	Ventajas y limitaciones del cultivo de tejidos	66
2.6.1	Ventajas del cultivo de tejidos	66

2.6.2 Limitaciones del cultivo de tejidos	69
2.7 Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	72
2.7.1 Caso de Estudio 1: Desarrollo de protocolo de micropropagación para Solanum quitoense (Naranjilla)	72
2.7.2 2.7.2. Caso de Estudio 2: Conservación de germoplasma de tomate de árbol silvestre.....	74
2.7.3 Ejercicio práctico 1: Diseño de medio de cultivo	75
2.7.4 Ejercicio práctico 2: Análisis económico de viabilidad	76
2.7.5 Estudio de caso 3: Implementación de programa de mejoramiento	78
2.8 Conclusiones del capítulo.....	79
CAPÍTULO III.....	81
3 MICROPROPAGACIÓN: PRINCIPIOS Y TÉCNICAS....	81
3.1 Definición y objetivos de la micropropagación.....	81
3.1.1 Definición conceptual	81
3.1.2 Objetivos principales	82
3.1.3 Ventajas comparativas.....	83
3.2 Etapas del proceso de micropropagación.....	85

3.2.1 Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal	85
3.2.4 Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico.....	87
3.2.5 Etapa II: Multiplicación de brotes	89
3.2.6 Etapa III: Enraizamiento	91
3.2.7 Etapa IV: Aclimatación	93
3.3 Sistemas de micropropagación.....	95
3.3.1 Sistema de cultivo sólido	95
3.3.2 Sistema de inmersión temporal	96
3.3.3 Sistema de biorreactores	96
3.4 Control de calidad en la micropropagación.....	97
3.4.1 Estándares de calidad morfológica	97
3.4.2 Control fitosanitario	98
3.4.3 Estabilidad genética	99
3.5 Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	99
3.5.1 Caso de estudio 1: Optimización de fitorreguladores	99
3.5.2 Caso de estudio 2: Reducción de costos de producción.....	100
3.5.3 3.5.3. Ejercicios Prácticos	101

3.5.4 Problemas comunes y soluciones	103
3.6 Conclusiones.....	104
CAPÍTULO IV.....	106
4 FITORREGULADORES EN EL CULTIVO IN VITRO ..	106
4.1 Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal	106
4.2 Auxinas: estructura, función y metabolismo	109
4.2.1 Tipos de auxinas naturales y sintéticas	109
4.2.2 Mecanismos de acción molecular	110
4.2.3 Efectos fisiológicos en el cultivo in vitro.....	112
4.3 Citoquininas: estructura, función y metabolismo	114
4.3.1 Tipos de citoquininas naturales y sintéticas	115
4.3.2 Transducción de señales.....	116
4.3.3 Respuestas morfogénicas	119
4.4 Balance auxina-citoquinina y morfogénesis	120
4.5 Interacciones con otros reguladores del crecimiento	122
4.6 Optimización de concentraciones y combinaciones	124
4.6.1 Metodologías de optimización	124

4.6.2 Factores que afectan la optimización.....	125
4.7 Conclusiones.....	126
CAPÍTULO 5	128
5 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES AMBIENTALES	128
5.1 Composición de medios de cultivo	128
5.1.1 Macronutrientes y micronutrientes	128
5.1.2 Fuentes de carbono y energía	130
5.1.3 Vitaminas y aminoácidos	131
5.1.4 Agentes gelificantes	131
5.2 Formulación de medios de cultivo para <i>Solanum</i> sp	132
5.2.1 Medio Murashige y Skoog (MS).....	132
5.2.2 Modificaciones del medio MS para <i>Solanum</i>	133
5.2.3 Medios alternativos evaluados	133
5.2.4 Optimización específica para tomate de árbol silvestre.....	133
5.3 Preparación y esterilización de medios	134
5.3.1 Procedimiento de preparación	134
5.4 Condiciones físicas del cultivo	135

5.4.1	Temperatura.....	136
5.4.2	Iluminación y fotoperiodo.....	137
5.4.3	Humedad relativa.....	138
5.4.4	Intercambio gaseoso.....	139
5.5	Conclusiones del capítulo.....	141
5.6	Conclusiones.....	141
CAPÍTULO VI.....		144
6	DISEÑO EXPERIMENTAL EN MICROPROPAGACIÓN	144
6.1	Principios del diseño experimental.....	144
6.2	Diseños factoriales aplicados a fitorreguladores	146
6.2.1	Consideraciones prácticas para diseños factoriales	147
6.3	Análisis de dosis-respuesta.....	148
6.3.1	Modelos de dosis-respuesta.....	148
6.4	Variables de respuesta en micropropagación.....	149
6.4.1	Variables morfológicas.....	149
6.4.2	Variables fisiológicas	150
6.4.3	Variables bioquímicas	151

6.5	Análisis estadístico de datos.....	152
6.5.1	Análisis de varianza (ANOVA)	152
6.5.2	Comparaciones múltiples	152
6.5.3	Análisis multivariado	153
6.6	Optimización de protocolos mediante superficie de respuesta	153
6.6.1	Diseños para superficie de respuesta	153
6.6.2	Aplicación práctica en Solanum sp.....	154
6.6.3	Optimización multi-respuesta.....	155
6.7	Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	155
6.7.1	Ejercicio 6.1: Diseño factorial para evaluación de fitorreguladores	155
6.7.2	Ejercicio 6.2: Análisis de dosis-respuesta	158
6.8	Conclusiones.....	161
CAPÍTULO VII		163
7	PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN PARA TOMATE DE ÁRBOL.....	163
7.1	Selección y colecta de material vegetal silvestre.....	163
7.1.1	Criterios de selección del material madre	163

7.1.2 Criterios morfológicos y fisiológicos.....	163
7.1.3 Características sanitarias	164
7.1.4 Consideraciones genéticas.....	164
7.1.5 Técnicas de colecta y manejo pre-laboratorio	165
7.2 Desinfección y establecimiento aséptico	166
7.2.1 Protocolos de desinfección superficial.....	166
7.2.2 Protocolo de desinfección estándar.....	166
7.2.3 Protocolo alternativo para material altamente contaminado ...	167
7.2.4 Control de contaminación endógena.....	167
7.2.5 Evaluación de la eficiencia de desinfección.....	168
7.3 Inducción de brotes y multiplicación	169
7.3.1 Selección de explantes	169
7.3.2 Aplicación de tratamientos con fitorreguladores.....	170
7.3.3 Evaluación del desarrollo de brotes	172
7.4 7.4. Enraizamiento in vitro	173
7.4.1 Medios y condiciones para enraizamiento	173
7.4.2 Tratamientos auxínicos	174

7.4.3 Evaluación del sistema radicular	175
7.5 Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	176
7.5.1 Caso de estudio 1: Optimización de protocolos de desinfección	176
7.5.2 Caso de estudio 2: Evaluación comparativa de fitorreguladores	178
7.5.3 Ejercicio práctico: Cálculo de medios de cultivo	179
7.5.4 Análisis de resultados experimentales	180
CAPÍTULO VIII.....	182
8 EVALUACIÓN DE FITORREGULADORES Y DOSIS ..	182
8.1 Diseño experimental factorial 2×3.....	182
8.1.1 Fundamentos del diseño factorial	182
8.1.2 Estructura del diseño	183
8.1.3 Variables de respuesta	184
8.2 Preparación de soluciones stock de fitorreguladores	185
8.2.1 Consideraciones generales	185
8.2.2 Protocolo para BAP (6-Bencilaminopurina)	185
8.2.3 Protocolo para ANA (Ácido Naftalenacético).....	186

8.2.4 Control de calidad.....	187
8.3 Aplicación de tratamientos.....	188
8.3.1 Primer fitorregulador: BAP (6-Bencilaminopurina).....	188
8.3.2 Segundo fitorregulador: ANA (Ácido Naftalenacético)	189
8.3.3 Combinaciones y dosis evaluadas	190
8.4 Registro y análisis de datos	192
8.4.1 Sistema de registro.....	192
8.4.2 Análisis estadístico	193
8.4.3 Software y Herramientas.....	194
8.5 Interpretación de resultados.....	195
8.5.1 Efectos principales.....	195
8.5.2 Interpretación de interacciones.....	196
8.5.3 Implicaciones prácticas	196
8.6 Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	197
8.6.1 Ejercicio 1: Cálculo de soluciones de trabajo	197
8.6.2 Ejercicio 2: Análisis de datos experimentales	198
8.6.3 Caso de estudio: Optimización en especies recalcitrantes	199

8.6.4 Ejercicio 3: Diseño Experimental Avanzado	201
8.7 Conclusiones.....	202
CAPÍTULO IX.....	204
9 RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS Y ANÁLISIS COMPARATIVO	204
9.1 Efecto de los fitorreguladores en la inducción de brotes	204
9.1.1 Fundamentos de la morfogénesis in vitro	204
9.1.2 Mecanismos de acción de las citoquininas.....	204
9.1.3 Análisis comparativo de la inducción de brotes	205
9.1.4 Patrones de respuesta temporal	206
9.2 Análisis de la multiplicación según tipo y dosis	207
9.2.1 Efecto dosis-respuesta en la multiplicación	207
9.2.2 Coeficientes de multiplicación	207
9.2.3 Análisis de tendencias polinomiales	208
9.3 Calidad morfológica de los explantes regenerados	209
9.3.1 Parámetros de evaluación morfológica	209
9.3.2 Índice de calidad morfológica (ICM)	209
9.3.3 Características histológicas	210

9.4	Anomalías y variación somaclonal	211
9.4.1	Tipos de anomalías observadas	211
9.4.2	Análisis de la variación somaclonal.....	212
9.4.3	Factores inductores de variación	213
9.5	Comparación entre tratamientos	213
9.5.1	Análisis multivariado de tratamientos	213
9.5.2	Análisis de interacción fitorregulador $\times$ dosis.....	214
9.5.3	Eficiencia económica comparativa	214
9.6	Modelos predictivos de respuesta	215
9.6.1	Desarrollo de modelos matemáticos	215
9.6.2	Validación de modelos	216
9.6.3	Aplicación de redes neuronales artificiales	216
9.7	Ejercicios de aplicación y casos de estudio.....	217
9.7.1	Caso de estudio 1: Optimización de protocolo para producción masiva	217
9.7.2	Caso de estudio 2: Rescate de germoplasma silvestre	218
9.7.3	Ejercicios prácticos	219
9.7.4	Protocolo estandarizado recomendado.....	220

9.7.5 Guía práctica para la detección temprana de anomalías	222
9.7.6 Estrategias de mitigación de la variación somaclonal	223
9.7.7 Análisis de sensibilidad de los modelos predictivos.....	224
9.7.8 Integración de tecnologías emergentes	225
9.7.9 Perspectivas económicas y de mercado	227
9.8 Conclusiones.....	229
GLOSARIO.....	230
BIBLIOGRAFÍAS	232

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del tomate de árbol.....	34
Tabla 2. Análisis Comparativo entre Propagación Convencional y Micropropagación en Solanum sp.	84
Tabla 3. Protocolo Optimizado de Desinfección para Explantes de Solanum sp.	88
Tabla 4. Estándares de Calidad para Plantas Micropropagadas de Solanum sp.	97
Tabla 5. Principales grupos de reguladores del crecimiento vegetal y sus funciones en el cultivo in vitro.	107
Tabla 6. Comparación de citoquininas utilizadas en cultivo in vitro de Solanum sp.	118
Tabla 7. Efectos de las interacciones hormonales en el cultivo in vitro de Solanum sp.....	123
Tabla 8. Comparación de Diseños Experimentales Aplicados en Micropropagación.....	145
Tabla 9. Actividad Enzimática Durante las Fases de Micropropagación en Solanum sp.....	151
Tabla 10. Matriz del diseño experimental y resultados.....	157
Tabla 11. Estructura del diseño factorial 2×3 para la evaluación de fitorreguladores en tomate de árbol silvestre.	183

Tabla 12. Objetivos morfogénéticos de las combinaciones fitorregulador-dosis.....	191
Tabla 13. Análisis de datos experimentales.....	198
Tabla 14. Efecto comparativo de fitorreguladores en la inducción de brotes de Solanum sp.	205
Tabla 15. Coeficientes de multiplicación según tratamiento.....	208
Tabla 16. Índice de calidad morfológica por tratamiento.....	210
Tabla 17. Frecuencia de variación somaclonal por tratamiento.....	212
Tabla 18. Análisis económico comparativo de tratamientos.....	214
Tabla 19. Análisis de sensibilidad del modelo de predicción de brotes.	225
Tabla 20. Proyección financiera para unidad productiva de 50,000 plántulas/año.....	227

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tomate.	25
Figura 2. Distribución geográfica.	32
Figura 3. Origen de la Biotecnología.	43
Figura 4. Áreas de Aplicación de la Biotecnología.	46
Figura 5. Aplicaciones Biotecnológicas en Especies del Género Solanum.	61
Figura 6. Biotecnología Moderna.	67
Figura 7. Definición y objetivos de la micropropagación.	82
Figura 8. Etapas del proceso de micropropagación.	85
Figura 9. Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal.	86
Figura 10. Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico.	87
Figura 11. Etapa II: Multiplicación de brotes.	90
Figura 12. Etapa III: Enraizamiento.	91
Figura 13. Etapa IV: Aclimatación.	93
Figura 14. Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal.	106

Figura 15. Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal.	108
Figura 16. Tipos de auxinas naturales y sintéticas.....	110
Figura 17. Mecanismos de acción molecular.	111
Figura 18. Modelo simplificado del mecanismo de señalización auxínica.	112
Figura 19. Efectos fisiológicos en el cultivo in vitro.	113
Figura 20. Citoquininas: estructura, función y metabolismo.	114
Figura 21. Tipos de citoquininas naturales y sintéticas.....	116
Figura 22. Transducción de señales.	117

INTRODUCCIÓN

La biotecnología vegetal se ha consolidado en las últimas décadas como una disciplina clave para la innovación en agricultura, el desarrollo de cultivos de alto valor y la conservación de la diversidad genética. Entre sus múltiples herramientas, el cultivo de tejidos y la micropropagación representan una alternativa estratégica para garantizar la disponibilidad de material vegetal de calidad, libre de patógenos y con un potencial productivo y genético preservado.

El presente libro está dedicado al estudio integral del tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), una especie de la familia Solanaceae que, pese a su relevancia económica y nutracéutica, ha sido menos explorada en comparación con otros cultivos como la papa, el tomate común o la berenjena. Este recurso fitogenético, originario de los Andes, ofrece ventajas únicas como rusticidad, resistencia a factores bióticos y abióticos, y un perfil nutricional que lo posiciona como alimento funcional con potencial en mercados especializados.

La obra se organiza de manera progresiva, iniciando con la caracterización taxonómica y ecológica del género *Solanum* y del tomate de árbol, para luego introducir los fundamentos teóricos y prácticos de la biotecnología vegetal. Posteriormente, se abordan las bases conceptuales y metodológicas de la micropropagación, el rol determinante de los fitorreguladores, la importancia de los medios de cultivo y las condiciones ambientales, así como la necesidad de aplicar un diseño experimental riguroso que garantice la validez científica de los resultados. Estos elementos convergen en la presentación de

protocolos aplicados y estudios experimentales que ilustran cómo la biotecnología puede transformar la producción y conservación de especies de interés agrícola.

El propósito central de este libro es ofrecer al lector un marco teórico-práctico sólido que vincule la ciencia básica con la aplicabilidad en campo y laboratorio. Está dirigido a estudiantes, docentes, investigadores y profesionales interesados en comprender y aplicar la biotecnología vegetal como herramienta para enfrentar los desafíos actuales de la agricultura: desde la erosión genética y las limitaciones productivas, hasta la necesidad de generar cultivos más sostenibles y resilientes frente al cambio climático.

En síntesis, este texto busca no solo aportar conocimiento científico, sino también promover una visión de la biotecnología como puente entre la innovación y la sostenibilidad, entre el rigor académico y las soluciones prácticas que demandan las comunidades productoras y la sociedad en general.

CAPÍTULO I

1 EL GÉNERO *SOLANUM* Y EL TOMATE DE ÁRBOL

El género *Solanum* L. representa uno de los grupos más diversos y económicamente importantes dentro de las angiospermas, con aproximadamente 1,300-1,400 especies distribuidas en todos los continentes excepto la Antártida (DeWitt Smith & Baum, 2007). Este capítulo examina la complejidad taxonómica, las características botánicas, la distribución geográfica y la importancia del tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), con énfasis en los ecotipos andinos que presentan características de resistencia a factores bióticos adversos.



Figura 1. Tomate.

1.1 Taxonomía y sistemática del género *Solanum*

1.1.1 Posición filogenética y clasificación familiar

El género *Solanum* pertenece a la familia Solanaceae Juss., orden Solanales, dentro del clado de las asterídeas (eudicotiledóneas). La familia Solanaceae comprende aproximadamente 98 géneros y 2,700 especies, mostrando una extraordinaria diversidad morfológica, ecológica y química (Martine & Anderson, 2007). Estudios filogenómicos recientes han establecido que *Solanum* se originó hace aproximadamente 53.1 millones de años (Ma), con la mayoría de los clados principales divergiendo entre 35 y 27 Ma durante el Oligoceno (Olmstead & Bohs, 2007).

La clasificación taxonómica del tomate de árbol silvestre se establece de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum* L.

Especie: *Solanum betaceum* Cav.

Ecotipo: *Solanum* sp. (silvestre)

1.1.2 Evolución del concepto genérico

El género *Solanum*, establecido por Linnaeus (1753), ha experimentado cambios significativos en su circunscripción taxonómica. Análisis moleculares basados en marcadores nucleares y plastidiales han demostrado que los géneros previamente segregados *Lycopersicon* Mill., *Cyphomandra* Sendtn., *Normania* Lowe y *Triguera* Cav. están anidados dentro de *Solanum*, lo que ha llevado a la transferencia formal de todas las especies de estos cuatro géneros a *Solanum* (Jiménez, 2018). Esta reorganización taxonómica ha consolidado a *Solanum* como el género más grande de la familia y uno de los más diversos entre las angiospermas.

1.1.3 Infragénica y relaciones filogenéticas

El sistema de clasificación infragenérica más utilizado, propuesto por D'Arcy (1972, 1991), divide *Solanum* en siete subgéneros basados en caracteres morfológicos. Sin embargo, estudios moleculares posteriores han identificado aproximadamente 13 clados principales dentro del género (Bohs, 2005), revelando que la mayoría de los subgéneros tradicionalmente reconocidos no son monofiléticos. Análisis filogenómicos recientes utilizando 1,786 genes nucleares han proporcionado una resolución sin precedentes de las relaciones evolutivas dentro del género (Ebert & Chou, 2015).

Los principales clados identificados incluyen:

1. **Clado *Thelopodium*:** Hermano del resto de *Solanum*

2. **Clado Potato:** Incluye las secciones *Petota*, *Etuberosum* y *Lycopersicoides*
3. **Clado Tomato:** Hermano de la sección *Petota*
4. **Clado Leptostemonum:** El más diverso, con aproximadamente 450 especies
5. **Clado Cyphomandra:** Incluye el tomate de árbol y especies afines

1.2 Caracterización botánica del tomate de árbol silvestre

1.2.1 Descripción morfológica general

El tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), conocido localmente como "tomatillo" en la región andina de Ecuador, presenta características morfológicas distintivas que lo diferencian de los cultivares comerciales. La planta es un arbusto o árbol pequeño que alcanza entre 2 y 3 metros de altura, con un tallo recto y cilíndrico de 5 a 15 cm de diámetro (Martine & Anderson, 2007).

1.2.2 Sistema radicular

El sistema radicular es superficial, poco profundo pero muy ramificado, característica que refleja su adaptación a suelos andinos con alta humedad superficial. Presenta una raíz principal cuando las plantas provienen de semilla, con raíces secundarias y terciarias de color marfil y consistencia semileñosa. El sistema radicular puede extenderse hasta 40 cm de profundidad y 50 cm horizontalmente desde el tallo,

proporcionando un anclaje eficiente en laderas montañosas (DeWitt Smith & Baum, 2007).

1.2.3 Tallo y ramificación

El tallo presenta una disposición dicotómica característica, formando un patrón de ramificación en molinillo. Las ramificaciones (típicamente 2 a 3) se inician entre 1.2 y 1.8 m de altura. La consistencia del tallo y las ramas es semileñosa en la etapa adulta, aunque herbácea durante la fase juvenil, con un corazón suberificado (corchoso) que proporciona flexibilidad y resistencia a vientos fuertes. La corteza es de color verde grisáceo, tornándose más oscura con la edad (Marcial et al., 2023a).

1.2.4 Hojas

Las hojas son grandes, simples, alternas y cordiformes (acorazonadas), con el borde entero. En plantas jóvenes, las hojas pueden alcanzar dimensiones de 30 a 40 cm de largo y 15 a 20 cm de ancho, mientras que en plantas en producción se reducen a 20-25 cm de largo y 10-15 cm de ancho. El haz es lampiño y de color verde oscuro, mientras que el envés presenta un color verde más claro con pubescencia caracterizada por pelos cortos y entrelazados. La nervadura principal es prominente, con nervaduras secundarias bien definidas (Marcial et al., 2023a).

1.2.5 Inflorescencias y flores

Las flores son pequeñas (aproximadamente 1 cm de diámetro), de color rosado a blanco, agrupadas en racimos axilares o supra-axilares, ocasionalmente en cimas escorpioides. Son fragantes, lo que sugiere

polinización entomófila. La flor es pentámera, presentando un cono estaminal con 5 estambres de anteras biloculares de color amarillo. La corola presenta 5 pétalos largos, generalmente de color rosado en los ecotipos silvestres. En cada racimo se pueden presentar hasta 40 flores, de las cuales típicamente de 3 a 6 logran cuajar y formar frutos que llegan a la madurez fisiológica (Añibarro-Ortega et al., 2022).

1.2.6 Frutos

El fruto del ecotipo silvestre presenta características morfológicas distintivas que lo diferencian claramente de los cultivares comerciales. Es una baya de superficie rugosa (no lisa como en los cultivares comerciales), de forma más cónica que elipsoide, con un tamaño variable pero generalmente menor que las variedades cultivadas. El color varía de verde oscuro a un leve color amarillo en la madurez. El mesocarpio es jugoso, con sabor agri dulce más pronunciado que en las variedades comerciales. En el interior se encuentran entre 200 y 400 semillas pequeñas, planas, circulares, de 2.0 a 4.0 mm de diámetro y color blanco amarillento (Añibarro-Ortega et al., 2022).

1.2.7 Características distintivas del ecotipo silvestre

El ecotipo silvestre del sector Cascarillas (provincia de Bolívar, Ecuador) presenta varias características que lo distinguen de los cultivares comerciales:

1. **Tolerancia a nematodos:** Investigaciones realizadas por Salazar (2015) determinaron que este ecotipo presenta tolerancia notable a nematodos del género *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*

y *M. hapla*), principales patógenos del sistema radicular en solanáceas cultivadas.

2. **Rusticidad morfológica:** Aspecto general más robusto, con mayor pubescencia foliar y frutos de superficie rugosa.
3. **Vigor vegetativo:** Mayor capacidad de rebrote y resistencia a condiciones ambientales adversas.

1.3 Distribución geográfica y centros de diversidad

1.3.1 Centro de origen y domesticación

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) y sus ecotipos silvestres son nativos de América del Sur. El centro de origen más probable son las selvas y bosques montanos de la zona Tucumano-Boliviana, ubicada al noroeste de Argentina y sur de Bolivia, donde se ha encontrado la mayor diversidad genética de la especie (Elizalde-Romero et al., 2021). El norte de Perú y sur de Ecuador son considerados el centro de domesticación de esta planta, donde las poblaciones indígenas precolombinas iniciaron su cultivo hace aproximadamente 2,000 años.



Figura 2. Distribución geográfica.

1.3.2 Distribución natural

En forma natural, el tomate de árbol silvestre se encuentra en Bolivia, Argentina, Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia, habitando bosques montanos húmedos entre 600 y 3,300 msnm. La temperatura óptima para su desarrollo oscila entre 14 y 20°C, con precipitaciones de 1,500 a 2,000 mm anuales y humedad relativa del 70-90% (Elizalde-Romero et al., 2021).

1.3.3 Distribución del cultivo en Ecuador

En Ecuador, el tomate de árbol se cultiva principalmente en las provincias andinas. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2012), la distribución por superficie cultivada es:

- **Tungurahua:** 39.2% (8,300 hectáreas)

- **Chimborazo:** 22.2%
- **Azuay:** 14.1%
- **Pichincha:** 10.0%
- **Imbabura:** 4.8%
- **Otras provincias** (Carchi, Cotopaxi, Bolívar, Cañar, Loja): 9.7%

La producción total alcanza aproximadamente 15,236 toneladas métricas anuales, con rendimientos promedio de 40,000-50,000 kg/ha/año en sistemas tecnificados.

1.3.4 Distribución mundial del cultivo

Comercialmente, el tomate de árbol se cultiva principalmente en Colombia, Ecuador, Perú y Nueva Zelanda. Ha sido introducido y es cultivado en menor escala en Estados Unidos (California), México, países de América Central, Europa (invernaderos en España y Portugal), África (Kenia, Ruanda), Asia (India, Sri Lanka), Oceanía y Australia (Bohs & Olmstead, 1997).

1.4 Importancia económica y nutricional

1.4.1 Importancia económica global

El tomate de árbol representa uno de los cultivos frutales más rentables de los Andes. A nivel internacional, los principales mercados importadores incluyen Estados Unidos, Canadá, y países de la Unión Europea. Ecuador exporta aproximadamente el 53% de su producción a Estados Unidos, generando divisas significativas para el país (Galarza,

2009). El precio internacional oscila entre US\$ 2.5-4.0/kg, mientras que en el mercado nacional varía entre US\$ 0.2-0.7/kg.

1.4.2 Composición nutricional

El tomate de árbol es reconocido por su alto valor nutricional. Según análisis bromatológicos reportados por León-García et al. (2018), la composición por 100 g de pulpa fresca incluye:

Tabla 1. Composición nutricional del tomate de árbol.

Componente	Contenido	Unidad
Agua	87.9	g
Proteína	1.9	g
Grasa	0.16	g
Carbohidratos	8.0	g
Fibra	1.1	g
Vitamina A	1,000	UI
Vitamina C	29.8	mg
Vitamina E	2.01	mg
Niacina	1.07	mg
Potasio	321	mg
Fósforo	38.9	mg

Hierro	0.57	mg
Calcio	10.7	mg

Nota. Adaptado de León-García et al. (2018) y Vasco et al. (2019).

1.4.3 Compuestos bioactivos

El tomate de árbol contiene diversos compuestos bioactivos con propiedades funcionales:

1. Carotenoides: β -caroteno (provitamina A), licopeno, luteína y zeaxantina, con propiedades antioxidantes y protectoras de la visión (Marcial et al., 2023b).
2. Compuestos fenólicos: Ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico, ácido cafeico), flavonoides (quercetina, kaempferol) y antocianinas en variedades moradas, con actividad antioxidante y antiinflamatoria (Espin et al., 2020).
3. Alcaloides: Presencia de solanina y chaconina en bajas concentraciones, especialmente en frutos verdes (Friedman, 2018).

1.4.4 Propiedades medicinales y funcionales

Estudios farmacológicos han documentado diversas propiedades medicinales del tomate de árbol:

- **Actividad antioxidante:** Alta capacidad de neutralización de radicales libres, superior a muchas frutas tropicales.

- **Efecto hipoglucemiante:** Reducción de los niveles de glucosa en sangre en modelos experimentales.
- **Actividad antimicrobiana:** Extractos del fruto muestran actividad contra bacterias patógenas y hongos.
- **Propiedades cardioprotectoras:** Reducción del colesterol LDL y triglicéridos.

1.5 Variabilidad genética y recursos fitogenéticos

1.5.1 Conservación de recursos genéticos

La conservación de la diversidad genética del tomate de árbol enfrenta varios desafíos:

Conservación in situ:

- Mantenimiento de poblaciones silvestres en áreas protegidas
- Conservación en fincas (on-farm) de variedades tradicionales
- Establecimiento de corredores biológicos

Conservación ex situ:

- Bancos de germoplasma (semillas ortodoxas)
- Colecciones de campo
- Conservación in vitro mediante técnicas de cultivo de tejidos
- Crioconservación de meristemos y embriones

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador mantiene una colección de 87 accesiones de tomate de árbol, incluyendo materiales silvestres y cultivados (Marcial et al., 2023b).

1.5.2 Caracterización molecular de la diversidad

Estudios recientes empleando secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido desarrollar miles de marcadores SNP para caracterizar la diversidad del tomate de árbol. Análisis de estructura poblacional revelan tres grupos genéticos principales correspondientes a: (1) materiales silvestres andinos, (2) cultivares tradicionales, y (3) materiales mejorados y selecciones modernas (Cárdenas, 2011).

1.6 Problemática de conservación y amenazas

1.6.1 Erosión genética

La erosión genética del tomate de árbol silvestre es un problema crítico causado por múltiples factores:

1. **Expansión de la frontera agrícola:** Conversión de bosques montanos en áreas de cultivo y pastoreo
2. **Urbanización:** Crecimiento de ciudades andinas hacia áreas naturales
3. **Reemplazo varietal:** Sustitución de ecotipos locales por cultivares comerciales uniformes
4. **Cambio climático:** Alteración de las condiciones ambientales óptimas para poblaciones silvestres

1.6.2 Problemas fitosanitarios

Los principales problemas fitosanitarios que afectan al tomate de árbol incluyen:

Enfermedades fúngicas:

- Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)
- Ojo de pollo (*Phoma andina*)
- Cenicilla (*Oidium* sp.)
- Muerte descendente (*Phytophthora infestans*)

Nematodos:

- *Meloidogyne incognita*
- *M. javanica*
- *M. hapla*

Virus:

- Virus del mosaico del pepino (CMV)
- Virus Y de la papa (PVY)
- Virus del mosaico del tomate de árbol (TaMV)

Plagas insectiles:

- Trips (*Frankliniella occidentalis*)
- Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*)
- Pulgones (*Myzus persicae*)

La incidencia de nematodos representa pérdidas del 30-60% en la producción, siendo la principal limitante fitosanitaria del cultivo (Cárdenas, 2011).

1.6.3 1.6.3. Impacto del cambio climático

El cambio climático representa una amenaza significativa para las poblaciones de tomate de árbol:

- **Alteración de rangos altitudinales:** Desplazamiento hacia mayores altitudes
- **Cambios en patrones de precipitación:** Afectación del ciclo productivo
- **Incremento de temperatura:** Estrés térmico y mayor incidencia de plagas
- **Eventos climáticos extremos:** Heladas, granizadas, sequías prolongadas

Modelos de distribución potencial predicen una reducción del 25-40% del área apta para el cultivo hacia 2050 bajo escenarios de cambio climático moderado (RCP 4.5).

1.6.4 1.6.4. Estrategias de conservación y uso sostenible

Para enfrentar estas amenazas, se requieren estrategias integrales:

1. **Mejoramiento genético participativo:** Incorporación de resistencias de materiales silvestres a cultivares comerciales
2. **Sistemas agroforestales:** Integración del tomate de árbol en sistemas productivos diversificados
3. **Valorización de ecotipos locales:** Desarrollo de mercados diferenciados para variedades tradicionales
4. **Micropropagación y biotecnología:** Uso de técnicas in vitro para multiplicación y conservación
5. **Educación y capacitación:** Concientización sobre la importancia de la agrobiodiversidad

1.7 Conclusiones

El estudio del género *Solanum* revela su extraordinaria diversidad taxonómica y filogenética, consolidándolo como uno de los grupos botánicos más relevantes tanto en términos evolutivos como de aplicación agrícola. El tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), en particular, constituye un recurso fitogenético de gran importancia, al reunir características de rusticidad, tolerancia a patógenos y

adaptabilidad a condiciones adversas que lo distinguen de los cultivares comerciales. La identificación de estos atributos no solo permite comprender mejor su valor ecológico, sino también proyectar su potencial dentro de los programas de mejoramiento y conservación de solanáceas de interés económico.

Desde el punto de vista botánico, la caracterización morfológica del tomate de árbol silvestre confirma la existencia de rasgos diferenciadores —tales como frutos de superficie rugosa, pubescencia foliar y un vigor vegetativo superior— que lo convierten en una fuente estratégica de variabilidad genética. Estos elementos, junto con la documentación de su distribución natural y centros de diversidad, refuerzan la necesidad de priorizar a esta especie dentro de las estrategias de manejo y conservación de germoplasma, tanto *in situ* como *ex situ*.

En términos económicos y nutricionales, el tomate de árbol sobresale como un cultivo rentable y de creciente demanda internacional, especialmente en los mercados de exportación. Sus propiedades nutraceuticas, derivadas de la presencia de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos de alto valor, lo sitúan como un alimento funcional con aplicaciones potenciales en la industria farmacéutica y de alimentos saludables. De este modo, el cultivo se proyecta no solo como fuente de ingresos para las comunidades andinas, sino también como una alternativa sostenible frente a los retos de seguridad alimentaria y nutricional.

El capítulo pone de manifiesto la problemática actual que enfrenta el tomate de árbol silvestre, particularmente la erosión genética, la presión fitosanitaria y los efectos adversos del cambio climático. Estas amenazas requieren la implementación de estrategias integrales que combinen biotecnología, mejoramiento participativo, agroforestería y programas de conservación de la diversidad genética. En este contexto, la micropropagación y otras herramientas biotecnológicas emergen como recursos clave para garantizar la sostenibilidad del cultivo, asegurar la preservación de ecotipos nativos y fortalecer el aprovechamiento racional de este recurso vegetal estratégico.

CAPÍTULO II

2 FUNDAMENTOS DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

2.1 Historia y evolución del cultivo de tejidos vegetales

La biotecnología vegetal, entendida como la aplicación de técnicas biológicas para la mejora y propagación de plantas, tiene sus raíces en observaciones científicas que se remontan al siglo XVII. Sin embargo, el cultivo de tejidos vegetales como disciplina científica formal comenzó a desarrollarse durante el siglo XIX, consolidándose como una tecnología viable en el siglo XX (Gabr et al., 2021).



Figura 3. Origen de la Biotecnología.

2.1.1 Fundamentos históricos tempranos (1838-1900)

Los primeros indicios del cultivo de tejidos vegetales surgieron de las observaciones de Matthias Schleiden (1838) y Theodor Schwann (1839), quienes establecieron la teoría celular. Estos científicos postularon que las células constituyen la unidad fundamental de los organismos vivos, sentando las bases conceptuales para el desarrollo posterior del cultivo in vitro (Gabr et al., 2021).

En 1902, Gottlieb Haberlandt, considerado el padre del cultivo de tejidos vegetales, propuso por primera vez que las células vegetales individuales podrían cultivarse en condiciones artificiales. Haberlandt postuló que "cada célula vegetal es totipotente y puede, bajo condiciones apropiadas, desarrollarse en una planta completa" (Pereira Lima et al., 2022). Aunque sus experimentos iniciales no fueron exitosos, sus conceptos teóricos proporcionaron el marco fundamental para el desarrollo de la biotecnología vegetal moderna.

2.1.2 Desarrollo de técnicas fundamentales (1900-1950)

El período comprendido entre 1900 y 1950 se caracterizó por el establecimiento de las técnicas básicas del cultivo in vitro. En 1934, Philip White logró mantener raíces de tomate en cultivo durante largos períodos, demostrando la viabilidad práctica del cultivo de órganos vegetales (White, 1934). Este trabajo pionero estableció los primeros protocolos para el mantenimiento de tejidos vegetales en condiciones estériles.

Paralelamente, los trabajos de Roger Gautheret (1939) en Francia y Folke Skoog (1944) en Estados Unidos contribuyeron significativamente al desarrollo de medios de cultivo nutritivos. Gautheret demostró que los callos de zanahoria podían mantenerse indefinidamente en cultivo, mientras que Skoog estableció los principios del balance hormonal en el cultivo de tejidos (Pereira Lima et al., 2022).

2.1.3 La Era Moderna del cultivo de tejidos (1950-presente)

La década de 1950 marcó el inicio de la era moderna del cultivo de tejidos vegetales con el desarrollo del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), que se convirtió en el medio base más utilizado mundialmente. Toshio Murashige y Folke Skoog establecieron las concentraciones óptimas de macro y micronutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal, proporcionando un sistema estandarizado que revolucionó la práctica del cultivo in vitro (Pereira Lima et al., 2022).

La introducción de la micropropagación comercial en la década de 1970 transformó la horticultura moderna. La primera aplicación comercial exitosa se realizó con orquídeas, seguida rápidamente por la propagación masiva de especies ornamentales y frutales (Khatik, 2023). Esta tecnología permitió la producción de plantas libres de patógenos en escalas industriales, revolucionando la industria agrícola mundial.

2.1.4 Avances recientes en biotecnología vegetal (2000-2025)

Los avances recientes en biotecnología vegetal han estado marcados por la integración de tecnologías de vanguardia como la edición génica

CRISPR, la proteómica y la metabolómica (Khatik, 2023). La automatización de los procesos de cultivo in vitro, incluyendo sistemas de monitoreo en tiempo real y control ambiental preciso, ha mejorado significativamente la eficiencia y reducido los costos de producción (Singh et al., 2023).

En el contexto específico de especies del género *Solanum*, la micropropagación ha demostrado ser particularmente valiosa para la conservación de germoplasma y el mejoramiento genético (Álvarez et al., 2020). Los protocolos desarrollados para *Solanum betaceum* y otras solanáceas han servido como base para la optimización de técnicas aplicables a especies silvestres del género.



Figura 4. Áreas de Aplicación de la Biotecnología.

2.2 Bases fisiológicas de la totipotencia celular

La totipotencia celular constituye el principio fundamental que sustenta todas las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Este concepto se refiere a la capacidad inherente de las células vegetales para regenerar organismos completos a partir de células individuales o pequeños grupos celulares (Álvarez et al., 2020).

2.2.1 Fundamentos moleculares de la totipotencia

A nivel molecular, la totipotencia se basa en el hecho de que todas las células somáticas de una planta contienen la misma información genética completa. La expresión diferencial de genes específicos, regulada por factores transcripcionales y modificaciones epigenéticas, determina el destino celular y la diferenciación tisular (Sawicka et al., 2020).

Los mecanismos moleculares que controlan la totipotencia involucran redes regulatorias complejas que incluyen factores de transcripción, microRNAs y modificaciones de histonas. Los genes WUSCHEL (WUS) y SHOOT MERISTEMLESS (STM) son particularmente importantes para el mantenimiento de la pluripotencia en células meristemáticas (Sawicka et al., 2020).

2.2.2 Factores que regulan la expresión de la totipotencia

La expresión práctica de la totipotencia en condiciones de cultivo in vitro depende de múltiples factores que pueden clasificarse en intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen la edad fisiológica del explante, el genotipo, el estado de diferenciación celular

y el contenido endógeno de reguladores del crecimiento (Sawicka et al., 2020).

Los factores extrínsecos comprenden las condiciones del medio de cultivo, incluyendo la composición nutricional, el balance hormonal, las condiciones físicas ambientales (luz, temperatura, humedad) y el potencial osmótico del medio. La interacción compleja entre estos factores determina si una célula expresará su potencial totipotente (Arafa, 2024).

2.2.3 Desdiferenciación y rediferenciación celular

El proceso de regeneración in vitro involucra dos fases secuenciales fundamentales: la desdiferenciación y la rediferenciación celular. Durante la desdiferenciación, las células diferenciadas revierten a un estado meristemático, caracterizado por la reactivación de la división celular y la pérdida de características especializadas (Arafa, 2024).

La desdiferenciación está mediada por cambios en la expresión génica que incluyen la activación de genes relacionados con el ciclo celular y la represión de genes específicos del tipo celular original. Este proceso puede ser inducido por heridas, cambios hormonales o estrés ambiental, condiciones que típicamente se presentan durante el establecimiento del cultivo in vitro.

La rediferenciación subsecuente involucra la reorganización celular y la formación de nuevos patrones de desarrollo. Este proceso está controlado por gradientes de reguladores del crecimiento vegetal y

puede resultar en la formación directa de órganos (organogénesis) o en el desarrollo de estructuras embrioides (embriogénesis somática).

2.2.4 Aplicaciones prácticas de la totipotencia en *Solanum* spp.

En especies del género *Solanum*, la totipotencia celular ha sido ampliamente explotada para diversas aplicaciones biotecnológicas. La capacidad regenerativa de estas especies varía considerablemente entre genotipos, siendo particularmente alta en *Solanum tuberosum* y moderada en *Solanum betaceum* (Arafa, 2024).

Los estudios realizados con tomate de árbol (*Solanum betaceum*) han demostrado que diferentes tipos de explante exhiben distintos grados de competencia regenerativa. Los meristemos apicales y nodales muestran la mayor capacidad de regeneración, seguidos por explantes de hojas jóvenes y segmentos de tallo (Munaweera et al., 2022a). Esta variación en la competencia regenerativa tiene implicaciones importantes para el diseño de protocolos de micropropagación eficientes.

2.3 Morfogénesis in Vitro: Organogénesis y embriogénesis somática

La morfogénesis in vitro se refiere a los procesos de desarrollo que resultan en la formación de órganos y estructuras organizadas a partir de tejidos cultivados artificialmente. Estos procesos pueden seguir dos rutas principales: la organogénesis y la embriogénesis somática, cada una con características distintivas y aplicaciones específicas (Munaweera et al., 2022).

2.3.1 Organogénesis directa e indirecta

La organogénesis se define como la formación de órganos vegetativos (brotes, raíces) o reproductivos (flores) a partir de tejidos cultivados in vitro. Este proceso puede ocurrir de manera directa, cuando los órganos se desarrollan directamente del explante original sin pasar por una fase de callo, o indirecta, cuando la formación de órganos ocurre a partir de tejido calloso.

a) Organogénesis directa

La organogénesis directa presenta ventajas significativas para la micropropagación comercial debido a su mayor eficiencia y menor riesgo de variación somaclonal. En este proceso, los meristemos preexistentes en el explante se activan directamente en respuesta a las condiciones del cultivo, resultando en la formación inmediata de brotes adventicios.

Los factores críticos que influyen en la organogénesis directa incluyen el tipo y concentración de citocininas, la edad del explante, las condiciones de luz y la composición del medio basal. En especies de *Solanum*, concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) entre 1.0 y 3.0 mg/L han demostrado ser efectivas para inducir la brotación directa de meristemos axilares (Munaweera et al., 2022b).

b) Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta involucra la formación inicial de tejido calloso indiferenciado, seguida por la diferenciación de centros meristemáticos y la subsecuente organogénesis. Este proceso requiere

típicamente una fase inicial de inducción de callo en presencia de auxinas, seguida por una fase de diferenciación con altas concentraciones de citocininas (Munaweera et al., 2022b).

Aunque la organogénesis indirecta puede resultar en mayor variación somaclonal debido al mayor número de divisiones celulares involucradas, también ofrece ventajas para la propagación masiva debido a la capacidad de obtener múltiples centros de regeneración a partir de un solo explant.

Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática representa el proceso mediante el cual células somáticas desarrollan estructuras similares a embriones cigóticos sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos pasan por etapas de desarrollo análogas a las de los embriones cigóticos, incluyendo las fases globular, cordiforme, torpedo y cotiledonar (Gauri et al., 2024).

2.3.2 Mecanismos moleculares de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática está controlada por redes regulatorias génicas complejas que incluyen factores de transcripción específicos como BABY BOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON (LEC), AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) y WUSCHEL (WUS). Estos genes maestros coordinan la transición de células somáticas a células embriogénicas y controlan los patrones de desarrollo embrionario.

El papel de las hormonas vegetales en la embriogénesis somática es crucial, con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) siendo el inductor más efectivo en muchas especies. La transición de la fase de inducción

a la de maduración típicamente requiere la eliminación o reducción de auxinas y la adición de ácido abscísico (ABA) (Gauri et al., 2024).

2.3.3 Ventajas y aplicaciones de la embriogénesis somática

La embriogénesis somática ofrece ventajas únicas para la propagación masiva y la biotecnología vegetal avanzada. Los embriones somáticos pueden ser encapsulados para crear "semillas artificiales", facilitando el manejo, transporte y almacenamiento. Además, la embriogénesis somática es fundamental para la transformación genética en muchas especies recalcitrantes.

En especies del género *Solanum*, la embriogénesis somática ha sido reportada principalmente en *Solanum tuberosum*, *Solanum melongena* y *Solanum lycopersicum*. Los protocolos típicamente emplean explantes de hojas o cotiledones cultivados en medios con 2,4-D, seguidos por transferencia a medios libres de reguladores del crecimiento para la maduración embrionaria.

2.3.4 Factores que influyen en la morfogénesis in vitro

La eficiencia y el tipo de morfogénesis in vitro están influenciados por múltiples factores que pueden categorizarse como genéticos, fisiológicos y ambientales. La comprensión y optimización de estos factores son cruciales para el desarrollo de protocolos efectivos de regeneración.

a) Factores genéticos

La capacidad regenerativa varía significativamente entre especies, genotipos e incluso entre individuos de la misma población. Esta variación tiene base genética y está controlada por múltiples loci que afectan la competencia morfogénica. En *Solanum* spp., se han identificado QTLs (Quantitative Trait Loci) asociados con la capacidad regenerativa, proporcionando herramientas para el mejoramiento de la respuesta in vitro (Gauri et al., 2024).

b) Factores fisiológicos del explante

La edad fisiológica, el estado nutricional y la fase de crecimiento del material vegetal donante influyen significativamente en el potencial regenerativo. Los explantes derivados de plantas jóvenes, vigorosas y en fase activa de crecimiento generalmente exhiben mayor competencia morfogénica. El contenido endógeno de reguladores del crecimiento también juega un papel crucial en determinar la respuesta del explante (Morales Domínguez, 2022).

c) Factores del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo, incluyendo la concentración y relación de reguladores del crecimiento, es el factor más crítico para dirigir la morfogénesis in vitro. La relación auxina/citocinina es particularmente importante: altas relaciones favorecen la rizogénesis, mientras que bajas relaciones promueven la caulogénesis. La concentración absoluta de estos reguladores también afecta la eficiencia del proceso.

2.4 Factores que influyen en el cultivo in vitro

El éxito del cultivo in vitro depende de la optimización cuidadosa de múltiples factores que interactúan de manera compleja para determinar el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los explantes. Estos factores pueden clasificarse en nutricionales, ambientales, fisiológicos y técnicos (Morales Domínguez, 2022).

2.4.1 Factores nutricionales

a) Macronutrientes

Los macronutrientes constituyen la base nutritiva del medio de cultivo y incluyen nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. El nitrógeno, proporcionado típicamente como nitrato de amonio y nitrato de potasio en el medio MS, es crucial para la síntesis proteica y el crecimiento celular. La relación entre las formas nítricas y amoniacaes del nitrógeno afecta significativamente el pH del medio y la morfogénesis (Partap et al., 2023).

El fósforo, suministrado como fosfato de potasio monobásico, es esencial para el metabolismo energético y la síntesis de ácidos nucleicos. Las deficiencias de fósforo resultan en crecimiento reducido y alteraciones en la morfología celular. El potasio cumple funciones regulatorias importantes en el balance osmótico y la activación enzimática.

b) Micronutrientes

Los micronutrientes, aunque requeridos en concentraciones menores, son igualmente críticos para el cultivo in vitro exitoso. El hierro, proporcionado como quelato EDTA-Fe, es esencial para la síntesis de clorofila y el transporte de electrones. El manganeso, zinc, cobre, boro y molibdeno funcionan como cofactores enzimáticos y participan en procesos metabólicos específicos (Partap et al., 2023).

Las deficiencias de micronutrientes pueden manifestarse como clorosis, necrosis, deformaciones morfológicas y reducción en la tasa de crecimiento. La quelación de elementos traza mejora su biodisponibilidad y estabilidad en el medio de cultivo, particularmente bajo condiciones de pH variable.

c) Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos esenciales requeridos en pequeñas cantidades para el metabolismo celular normal. El medio MS estándar incluye tiamina (vitamina B1), necesaria para el metabolismo de carbohidratos; nicotinamida y piridoxina, importantes para el metabolismo de aminoácidos; y ácido pantoténico y biotina en algunas formulaciones (Yang, 2023).

La tiamina es particularmente crítica para el cultivo de tejidos, ya que muchas especies no pueden sintetizar cantidades suficientes para sostener el crecimiento in vitro. La adición de otras vitaminas del complejo B puede mejorar el crecimiento en especies específicas o bajo condiciones particulares de cultivo.

d) Fuentes de carbono

La sacarosa es la fuente de carbono más comúnmente utilizada en medios de cultivo, típicamente en concentraciones de 20-30 g/L. Además de proporcionar energía metabólica, la sacarosa contribuye al potencial osmótico del medio y puede influir en la diferenciación celular. Fuentes alternativas de carbono incluyen glucosa, fructosa y sorbitol, cada una con efectos específicos en el crecimiento y desarrollo.

La concentración de sacarosa afecta significativamente la morfogénesis in vitro. Concentraciones elevadas (> 4%) pueden inhibir la fotosíntesis y promover el crecimiento heterotrófico, mientras que concentraciones bajas pueden resultar en crecimiento deficiente bajo condiciones de baja luz.

2.4.2 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal (PGRs) son componentes críticos que determinan los patrones de crecimiento y diferenciación en cultivo in vitro. Su selección, concentración y combinación deben optimizarse específicamente para cada especie y objetivo de cultivo (Adlak et al., 2023a).

a) Auxinas

Las auxinas promueven la elongación celular, la formación de raíces adventicias y la iniciación de tejido calloso. El ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina natural principal, pero las auxinas sintéticas como el ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftalenacético (NAA) y 2,4-D son más comúnmente utilizadas debido a su mayor estabilidad y actividad.

La selección de auxinas específicas puede influir significativamente en la respuesta del explante. El IBA es particularmente efectivo para la rizogénesis, el NAA promueve tanto la rizogénesis como la callogénesis, mientras que el 2,4-D es altamente efectivo para la inducción de callo y embriogénesis somática. Las concentraciones típicas varían de 0.1 a 10.0 mg/L, dependiendo de la especie y el objetivo.

b) Citocininas

Las citocininas estimulan la división celular, promueven la formación de brotes adventicios y retrasan la senescencia. La 6-bencilaminopurina (BAP) es la citocinina sintética más ampliamente utilizada, seguida por la kinetina, zeatina y tidiazurón (TDZ). Cada citocinina presenta características específicas de actividad y estabilidad (Adlak et al., 2023a).

El TDZ es particularmente potente y puede ser efectivo en concentraciones muy bajas (0.01-1.0 mg/L), pero puede resultar en la formación de brotes vitrificados si se usa en exceso. La BAP es efectiva en un rango amplio de concentraciones (0.5-5.0 mg/L) y generalmente produce brotes de calidad superior.

c) Balance hormonal

La relación entre auxinas y citocininas es fundamental para determinar el tipo de morfogénesis que ocurre in vitro. Una alta relación auxina:citocinina favorece la rizogénesis, una relación equilibrada promueve la proliferación de callo, y una baja relación favorece la

caulogenesis. Esta respuesta, conocida como el concepto de Skoog y Miller, proporciona la base para el diseño racional de medios de cultivo (Adlak et al., 2023a).

2.4.3 Factores ambientales

a) Condiciones de Luz

La calidad, intensidad, fotoperiodo y dirección de la luz influyen significativamente en el crecimiento y morfogénesis in vitro. La mayoría de los cultivos se mantienen bajo luz blanca fría con intensidades de 30-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodos de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Sin embargo, estos parámetros pueden requerir optimización para especies específicas.

La calidad espectral afecta la morfogénesis a través de fotoreceptores específicos. La luz roja promueve la elongación de tallos, mientras que la luz azul favorece el desarrollo de hojas y la biosíntesis de pigmentos. Los LEDs han revolucionado el cultivo in vitro al permitir el control preciso de la calidad espectral y mejorar la eficiencia energético.

b) Temperatura

La temperatura óptima para la mayoría de especies templadas cultivadas in vitro oscila entre 22-26°C, con variaciones diurnas de 2-4°C. Las temperaturas subóptimas pueden resultar en crecimiento lento, alteraciones morfológicas y mayor susceptibilidad a contaminación. Especies tropicales y subtropicales, incluyendo muchas solanáceas, pueden requerir temperaturas ligeramente superiores (25-28°C) (Adlak et al., 2023a).

c) Humedad relativa y ventilación

La humedad relativa en los recipientes de cultivo típicamente excede el 95%, creando condiciones que pueden promover desórdenes fisiológicos como la vitrificación. El intercambio gaseoso adecuado es crucial para prevenir la acumulación de gases tóxicos (etileno, CO₂) y proporcionar oxígeno suficiente para la respiración celular.

Los recipientes con ventilación controlada (filtros de membrana) han mejorado significativamente la calidad del cultivo in vitro al permitir intercambio gaseoso mientras mantienen condiciones estériles. Estos sistemas reducen la incidencia de vitrificación y mejoran el desarrollo fotosintético autotrófico.

2.4.4 Factores técnicos

a) Preparación y manipulación de explantes

La técnica de preparación de explantes es crucial para el establecimiento exitoso del cultivo. Los explantes deben ser de tamaño apropiado (típicamente 1-2 cm), derivados de material sano y vigoroso, y procesados bajo condiciones estériles estrictas. La orientación del explante en el medio puede influir en los patrones de desarrollo (Nagel, 2025).

La desinfección superficial debe balancear la eliminación de microorganismos contaminantes con la minimización del daño tisular. Los protocolos típicos emplean etanol al 70% seguido por hipoclorito de sodio (0.5-2.0% de cloro activo) con tiempos de exposición optimizados para cada tipo de explante.

b) Condiciones de Esterilidad

El mantenimiento de condiciones estériles es fundamental para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación microbiana puede resultar en la pérdida completa del cultivo y afectar los resultados experimentales. Las fuentes de contaminación incluyen el material vegetal, el ambiente de trabajo, los medios de cultivo y las herramientas de manipulación.

Los laboratorios de cultivo de tejidos requieren diseño específico con sistemas de filtración de aire, cámaras de flujo laminar, autoclaves para esterilización y protocolos estrictos de higiene. El monitoreo regular de la calidad microbiológica del ambiente y los cultivos es esencial para la operación exitosa.

2.5 Aplicaciones biotecnológicas en especies del género *Solanum*

El género *Solanum*, con más de 1,400 especies distribuidas mundialmente, representa uno de los grupos vegetales de mayor importancia económica y nutricional. Las aplicaciones biotecnológicas en este género han evolucionado significativamente, abarcando desde la micropropagación comercial hasta la ingeniería genética avanzada (Anjali & Gurshaminder, 2024; Nagel, 2025).



Figura 5. Aplicaciones Biotecnológicas en Especies del Género Solanum.

2.5.1 Micropropagación en Solanáceas de importancia comercial

Solanum tuberosum L. (Papa)

La papa representa el caso más exitoso de aplicación biotecnológica en el género *Solanum*. La micropropagación de papa se ha implementado comercialmente para la producción de semilla certificada libre de virus, fungiendo como la base de los programas de certificación de semilla a nivel mundial. Los protocolos optimizados permiten tasas de multiplicación de 6-10 plantas por subcultivo cada 3-4 semanas.

La producción de minitubérculos in vitro ha revolucionado la industria semillera de papa. Mediante la manipulación de condiciones ambientales (fotoperiodo corto, alta concentración de sacarosa) y el uso de inhibidores del crecimiento como el cloruro de cloromequat (CCC),

es posible inducir la tuberización in vitro en condiciones controladas (Anjali & Gurshaminder, 2024).

***Solanum lycopersicum* L. (Tomate)**

El tomate ha sido objeto extensivo de investigación biotecnológica debido a su importancia económica y facilidad de transformación genética. La micropropagación de tomate se emplea principalmente para la propagación de líneas élite y materiales transgénicos. Los protocolos típicos utilizan explantes de cotiledones con BAP (1-3 mg/L) para la inducción de brotes múltiples.

La organogénesis in vitro en tomate ha permitido el desarrollo de sistemas eficientes de transformación genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. La regeneración puede lograrse tanto a través de organogénesis directa como embriogénesis somática, dependiendo del genotipo y las condiciones de cultivo empleadas.

***Solanum melongena* L. (Berenjena)**

La berenjena presenta retos particulares para la micropropagación debido a su tendencia a la oxidación fenólica y sensibilidad a las citocininas. Los protocolos optimizados incorporan antioxidantes como ácido ascórbico y carbón activado para controlar la oxidación. La utilización de TDZ en concentraciones bajas (0.1-0.5 mg/L) ha demostrado ser más efectiva que las citocininas tradicionales.

2.5.2 Conservación de Germoplasma

La conservación in vitro de recursos genéticos de *Solanum* spp. ha adquirido importancia crítica ante las amenazas del cambio climático y la pérdida de diversidad genética. Las técnicas de crioconservación y cultivo de crecimiento lento permiten el mantenimiento a largo plazo de colecciones de germoplasma con requerimientos mínimos de espacio y mantenimiento.

a) Crioconservación

La crioconservación implica el almacenamiento de material vegetal a temperaturas ultra-bajas (-196°C) en nitrógeno líquido, deteniendo efectivamente todos los procesos metabólicos y permitiendo conservación indefinida. En *Solanum* spp., tanto los protocolos de vitrificación como encapsulación-dsecación han demostrado ser efectivos para meristemos apicales.

Los protocolos de crioconservación para papa han alcanzado tasas de supervivencia superiores al 80% utilizando técnicas de pre-tratamiento con crioprotectores y desecación controlada. Estos métodos han sido adaptados exitosamente para especies silvestres de *Solanum*, incluyendo materiales de tomate de árbol.

b) Cultivo de crecimiento lento

El cultivo de crecimiento lento permite la conservación a medio plazo (2-3 años) mediante la reducción del metabolismo celular a través de la manipulación de temperatura, luz y composición del medio. La adición de osmolitos como manitol o sorbitol, junto con la reducción de la

temperatura a 15-18°C, extiende significativamente los intervalos de subcultivo (Anjali & Gurshaminder, 2024).

2.5.3 Mejoramiento genético asistido por biotecnología

a) Selección in Vitro

La selección in vitro permite la identificación temprana de genotipos con características deseables bajo condiciones controladas. En *Solanum* spp., esta técnica ha sido aplicada para la selección de resistencia a salinidad, sequía, temperatura extrema y resistencia a patógenos. Los protocolos típicos involucran la exposición de explantes o suspensiones celulares a agentes selectivos específicos (Adlak et al., 2023b).

La selección para resistencia a *Phytophthora infestans* en papa utilizando toxinas del patógeno en el medio de cultivo ha demostrado correlación positiva con la resistencia en campo. Similarmente, la selección para tolerancia a salinidad utilizando concentraciones graduales de NaCl ha identificado genotipos tolerantes en poblaciones segregantes.

b) Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos permite la combinación de genomas completos de especies diferentes, superando las barreras de incompatibilidad sexual. En el género *Solanum*, esta técnica ha sido utilizada para transferir características de especies silvestres a cultivares comerciales. Los híbridos somáticos resultantes pueden exhibir características intermedias o novedosas no presentes en los progenitores (García-Velasco, 2023).

La fusión de protoplastos entre *S. tuberosum* y *S. brevidens* ha resultado en híbridos con resistencia mejorada a virus y nematodos. Sin embargo, la técnica presenta limitaciones debido a la inestabilidad cromosómica y la segregación irregular en generaciones subsecuentes.

2.5.4 Aplicaciones en Solanum betaceum (Tomate de árbol)

El tomate de árbol ha recibido atención creciente debido a su valor nutricional y potencial comercial. Las aplicaciones biotecnológicas en esta especie se han centrado en la micropropagación, conservación de germoplasma y mejoramiento de la resistencia a patógenos (García-Velasco, 2023).

a) Protocolos de Micropropagación

Los protocolos de micropropagación para *S. betaceum* han evolucionado significativamente desde los trabajos pioneros. Los medios basados en MS con BAP (1.5-2.5 mg/L) y concentraciones bajas de IBA (0.1-0.5 mg/L) han demostrado ser óptimos para la multiplicación de brotes. La fase de enraizamiento requiere típicamente medios con IBA o NAA (0.5-1.0 mg/L) sin citocininas (Das et al., 2022).

La optimización de condiciones ambientales, incluyendo intensidad lumínica ($40\text{-}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) y temperatura ($24\pm 2^\circ\text{C}$), ha mejorado significativamente las tasas de multiplicación y calidad de plantas producidas. Los protocolos actuales permiten obtener 4-6 brotes por explante cada 4-5 semanas.

b) Conservación de diversidad genética

La diversidad genética del tomate de árbol, particularmente en ecotipos silvestres, representa un recurso valioso para el mejoramiento futuro. La caracterización molecular utilizando marcadores SSR y SNPs ha revelado diversidad genética significativa entre poblaciones silvestres de diferentes regiones geográficas (Das et al., 2022).

Las colecciones in vitro de *S. betaceum* mantienen actualmente más de 200 accesiones representando la diversidad genética de la especie en los Andes. Estas colecciones sirven como base para programas de mejoramiento y conservación a largo plazo.

2.6 Ventajas y limitaciones del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetales, como toda tecnología, presenta ventajas significativas y limitaciones inherentes que deben considerarse cuidadosamente al diseñar programas de aplicación. La comprensión balanceada de estos aspectos es crucial para la implementación exitosa de proyectos biotecnológicos.

2.6.1 Ventajas del cultivo de tejidos

a) Propagación clonal masiva

La capacidad de producir grandes cantidades de plantas genéticamente idénticas a partir de un solo explante constituye una de las ventajas más significativas del cultivo de tejidos. Las tasas de multiplicación in vitro exceden ampliamente las posibles mediante propagación vegetativa

convencional, permitiendo la producción comercial de materiales élite en períodos cortos.

En especies de propagación vegetativa difícil o lenta, como muchas solanáceas leñosas, el cultivo de tejidos representa frecuentemente la única alternativa viable para la propagación comercial. Las tasas de multiplicación pueden alcanzar 6-10 plantas por subcultivo mensual, resultando en aumentos exponenciales de la población de plantas (A. Gupta & Kumar, 2022).

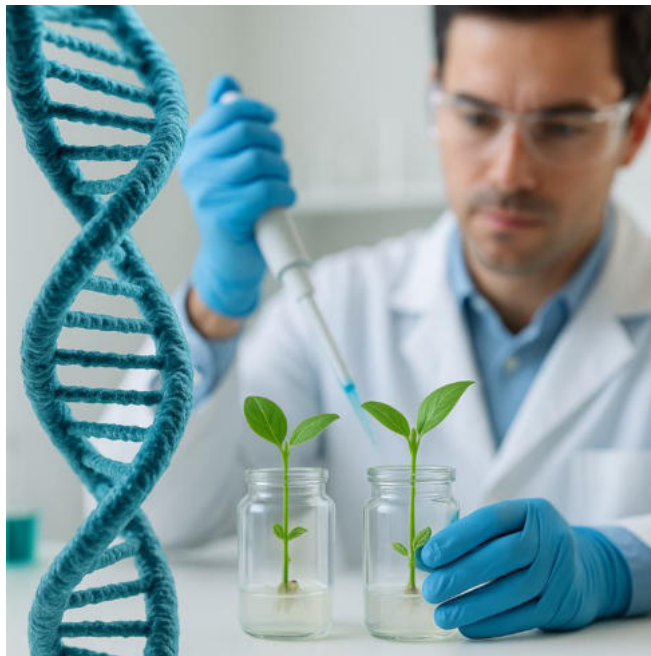


Figura 6. Biotecnología Moderna.

b) Producción de material libre de patógenos

El cultivo in vitro bajo condiciones estériles controladas permite la producción de plantas libres de virus, bacterias, hongos y otros

patógenos. Esta característica es particularmente valiosa para especies que acumulan patógenos sistémicos durante la propagación vegetativa convencional. Los programas de limpieza clonal utilizan típicamente cultivo de meristemos combinado con termoterapia o quimioterapia.

La certificación sanitaria de material propagativo producido in vitro ha revolucionado la industria agrícola, permitiendo el establecimiento de programas de certificación de semillas y material vegetativo con estándares sanitarios estrictos. Esto resulta en mejoras significativas en productividad y reducción en el uso de pesticidas.

c) Independencia de factores ambientales

El cultivo in vitro permite la propagación continua independientemente de condiciones climáticas, estacionales o geográficas. Esta ventaja es particularmente importante para especies con requerimientos ambientales específicos o períodos de propagación limitados. Los laboratorios de cultivo de tejidos pueden operar continuamente, proporcionando suministro constante de material propagativo.

La capacidad de controlar precisamente las condiciones de crecimiento (nutrición, luz, temperatura, humedad) permite la optimización del desarrollo vegetal y la producción de plantas de calidad superior y uniformidad mejorada.

d) Conservación de germoplasma

El cultivo in vitro facilita la conservación de recursos genéticos vegetales, particularmente para especies con semillas recalcitrantes o de propagación vegetativa. Las técnicas de crecimiento lento y

crioconservación permiten el mantenimiento a largo plazo de colecciones de germoplasma con requerimientos mínimos de espacio y recursos (A. Gupta & Kumar, 2022).

Las colecciones in vitro son particularmente valiosas para la conservación de genotipos únicos, líneas experimentales y materiales con características específicas que podrían perderse en condiciones de campo debido a factores ambientales adversos o presión de patógenos.

e) Facilita la investigación y mejoramiento

El cultivo in vitro proporciona sistemas modelo controlados para estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. La capacidad de manipular condiciones específicas y obtener material uniforme facilita la investigación fundamental y aplicada. Además, el cultivo de tejidos es esencial para muchas técnicas de mejoramiento modernas, incluyendo transformación genética, fusión de protoplastos y rescate de embriones (A. Gupta & Kumar, 2022).

2.6.2 Limitaciones del cultivo de tejidos

a) Variación somaclonal

La variación somaclonal se refiere a la variación genética y epigenética que puede surgir durante el cultivo in vitro debido a mutaciones, aberraciones cromosómicas y cambios epigenéticos. Esta variación puede ser tanto ventajosa (fuente de variabilidad genética) como desventajosa (pérdida de uniformidad genética) dependiendo del objetivo del cultivo (Sadhukhan & Huo, 2020).

Los factores que aumentan la incidencia de variación somaclonal incluyen el tipo de explante, la duración del cultivo, el número de subcultivos, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento, y el genotipo. La organogénesis directa generalmente resulta en menor variación somaclonal comparada con la organogénesis indirecta a través de callos.

b) Costo de producción elevado

El establecimiento y operación de laboratorios de cultivo de tejidos requiere inversión significativa en infraestructura, equipamiento especializado y personal capacitado. Los costos operacionales incluyen medios de cultivo, energía para iluminación y climatización, consumibles estériles y mantenimiento de equipos.

El costo por planta producida in vitro puede ser 2-5 veces superior al de métodos convencionales de propagación, limitando la aplicación comercial a especies de alto valor o casos donde no existen alternativas viables de propagación.

c) Requerimientos técnicos especializados

El cultivo de tejidos requiere personal con entrenamiento especializado en técnicas microbiológicas, manejo de equipos de laboratorio y conocimiento de fisiología vegetal. La necesidad de mantener condiciones estériles estrictas y la complejidad de los protocolos pueden resultar en altas tasas de pérdida durante las fases de entrenamiento del personal.

La dependencia de equipos especializados (autoclaves, cámaras de flujo laminar, incubadores) y suministros específicos puede crear vulnerabilidades operacionales, particularmente en regiones con infraestructura limitada o acceso restringido a consumibles especializados.

d) Problemas de aclimatación

Las plantas producidas in vitro frecuentemente exhiben características morfológicas y fisiológicas que dificultan su establecimiento en condiciones ex vitro. Estas características incluyen cutículas deficientes, estomas no funcionales, sistema vascular poco desarrollado y dependencia nutricional heterotrófica (Sadhukhan & Huo, 2020).

El proceso de aclimatación requiere condiciones ambientales controladas gradualmente más rigurosas, resultando en pérdidas significativas (20-50%) durante la transición a condiciones de invernadero y campo. Estos factores aumentan el costo total y la complejidad de la producción comercial.

e) Limitaciones específicas de especies y genotipos

Muchas especies exhiben recalcitrancia al cultivo in vitro, manifestando baja capacidad regenerativa, alta susceptibilidad a oxidación fenólica, o requerimientos nutricionales complejos. Incluso dentro de especies amables al cultivo in vitro, puede existir variación genotípica significativa en la respuesta, requiriendo optimización específica de protocolos.

Las especies leñosas, muchas monocotiledóneas y ciertos genotipos de solanáceas pueden requerir protocolos altamente específicos y condiciones de cultivo particulares, limitando la aplicabilidad general de protocolos estandarizados.

2.7 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

Los ejercicios de aplicación y casos de estudio proporcionan oportunidades para integrar los conocimientos teóricos con aplicaciones prácticas, desarrollando habilidades críticas para la implementación exitosa de tecnologías de cultivo de tejidos vegetales.

2.7.1 Caso de Estudio 1: Desarrollo de protocolo de micropropagación para *Solanum quitoense* (Naranjilla)

a) Contexto del problema

La naranjilla (*Solanum quitoense*) es una solanácea nativa de los Andes con alto valor comercial debido a sus propiedades organolépticas únicas. Sin embargo, la especie presenta susceptibilidad elevada a nematodos del género *Meloidogyne*, limitando su cultivo comercial. El desarrollo de un protocolo de micropropagación eficiente permitiría la propagación masiva de materiales resistentes y la conservación de germoplasma.

b) Metodología experimental

Fase 1: Establecimiento de explantes

Los explantes se obtuvieron de plantas madre mantenidas en invernadero, utilizando meristemos apicales y segmentos nodales de 1.5-2.0 cm de longitud. El protocolo de desinfección incluyó inmersión en etanol 70% (30 segundos), hipoclorito de sodio 1.5% (15 minutos) y tres enjuagues con agua destilada estéril.

Fase 2: Multiplicación de brotes

Se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L) en medio MS con vitaminas, sacarosa 30 g/L y agar 8 g/L. Los cultivos se mantuvieron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo luz blanca fría ($45\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) con fotoperiodo 16:8 horas.

Fase 3: Enraizamiento

Los brotes de 2-3 cm se transfirieron a medio MS con diferentes concentraciones de IBA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) para evaluación de la respuesta rizogénica.

c) Resultados y análisis

Los resultados demostraron que la concentración óptima de BAP fue 2.5 mg/L, resultando en 5.2 ± 0.8 brotes por explante con longitud promedio de 3.1 ± 0.4 cm. Concentraciones superiores resultaron en formación de brotes vitrificados con crecimiento reducido.

El enraizamiento óptimo se logró con IBA 1.0 mg/L, produciendo 85% de enraizamiento con 4.3 ± 1.2 raíces por brote. La aclimatación ex vitro alcanzó 78% de supervivencia utilizando sustrato estéril y nebulización intermitente.

2.7.2 2.7.2. Caso de Estudio 2: Conservación de germoplasma de tomate de árbol silvestre

a) Problemática de conservación

Los ecotipos silvestres de tomate de árbol en Ecuador enfrentan amenazas crecientes debido a la expansión agrícola y el cambio climático. La conservación ex situ mediante cultivo in vitro representa una estrategia crucial para preservar la diversidad genética de la especie.

b) Estrategia de conservación

Colecta y caracterización

Se estableció una colección representativa incluyendo 15 accesiones de diferentes regiones geográficas, caracterizadas mediante marcadores moleculares ISSR y evaluación morfológica. La diversidad genética reveló diferenciación significativa entre poblaciones ($GST = 0.34$).

Establecimiento de cultivos de crecimiento lento

Los explantes se establecieron en medio MS modificado con manitol 20 g/L, temperatura reducida (18°C) e intensidad lumínica baja (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estas condiciones extendieron los intervalos de subcultivo a 6-8 meses manteniendo viabilidad superior al 95%.

c) Protocolos de crioconservación

Se desarrollaron protocolos de vitrificación utilizando PVS2 como solución crioprotectora. Los meristemos pretratados con sacarosa 0.7 M

(24 horas) y expuestos a PVS2 (60 minutos) a 0°C alcanzaron 72% de supervivencia post-descongelamiento.

2.7.3 Ejercicio práctico 1: Diseño de medio de cultivo

a) Objetivo

Diseñar un medio de cultivo específico para la multiplicación de brotes de tomate de árbol considerando las características fisiológicas de la especie y los principios de nutrición vegetal.

b) Componentes base

A partir del medio MS estándar, justifique las modificaciones necesarias considerando:

1. **Requerimientos de macronutrientes:** Evalúe si la concentración estándar de nitrógeno total (60 mM) es apropiada para solanáceas tropicales.
2. **Balance hormonal:** Determine la relación auxina:citocinina óptima para maximizar la proliferación de brotes minimizando la vitrificación.
3. **Fuente de carbono:** Compare la efectividad de sacarosa vs. glucosa considerando el metabolismo específico de *Solanum* spp.
4. **Aditivos específicos:** Evalúe la necesidad de antioxidantes, carbón activado o modificadores de pH.

c) Metodología de evaluación

Diseñe un experimento factorial para evaluar:

- Factor A: Tipo de citocinina (BAP, Kinetina, TDZ)
- Factor B: Concentración (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/L)
- Factor C: Concentración de auxina (0, 0.1, 0.5 mg/L NAA)

Variables de respuesta: número de brotes, longitud de brotes, calidad morfológica, incidencia de vitrificación.

2.7.4 Ejercicio práctico 2: Análisis económico de viabilidad

a) Escenario

Una empresa biotecnológica evalúa la viabilidad económica de establecer un laboratorio de micropropagación para producción comercial de plántulas de tomate de árbol certificadas.

b) Parámetros del análisis

Costos de inversión inicial:

- Infraestructura y construcción: \$150,000
- Equipamiento especializado: \$80,000
- Mobiliario y accesorios: \$15,000
- Capital de trabajo inicial: \$25,000

Costos operacionales anuales:

- Personal especializado (2 técnicos): \$36,000
- Consumibles y reactivos: \$24,000
- Servicios (energía, agua): \$18,000
- Mantenimiento y seguros: \$8,000

Proyecciones de producción:

- Capacidad instalada: 50,000 plantas/año
- Precio de venta: \$2.50/planta
- Tasa de pérdida durante producción: 15%
- Tasa de pérdida durante aclimatación: 20%

c) Tareas de análisis

1. Calcule el punto de equilibrio en unidades y valor monetario
2. Determine la tasa interna de retorno (TIR) para un período de evaluación de 10 años
3. Realice análisis de sensibilidad variando precio de venta ($\pm 20\%$) y costos de producción ($\pm 15\%$)

4. Compare la viabilidad económica con métodos alternativos de propagación

2.7.5 Estudio de caso 3: Implementación de programa de mejoramiento

a) Contexto

Un programa de mejoramiento genético de tomate de árbol busca incorporar resistencia a *Fusarium oxysporum* a partir de genotipos silvestres resistentes mediante técnicas biotecnológicas.

b) Estrategia biotecnológica

Fase 1: Identificación y caracterización de fuentes de resistencia

Evaluación in vitro de 25 accesiones silvestres utilizando filtrados de cultivo del patógeno en concentraciones crecientes (5%, 10%, 15%, 20%) incorporados al medio de cultivo. Los genotipos resistentes mantienen crecimiento normal bajo concentraciones inhibitorias para materiales susceptibles.

Fase 2: Hibridación y rescate de embriones

Cruzamientos dirigidos entre genotipos resistentes silvestres y cultivares comerciales susceptibles. Los embriones híbridos se rescatan 14-21 días post-polinización y se cultivan in vitro para superar incompatibilidades post-cigóticas.

Fase 3: Selección asistida por marcadores

Desarrollo de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia mediante análisis de segregantes extremos (BSA). Los marcadores facilitan la selección temprana de individuos resistentes en poblaciones segregantes.

c) Resultados esperados

El programa busca desarrollar cultivares con resistencia durable a *Fusarium* manteniendo características comerciales deseables. La integración de técnicas in vitro acelera significativamente el proceso de mejoramiento, reduciendo el tiempo de desarrollo de nuevos cultivares de 12-15 años a 6-8 años.

2.8 Conclusiones del capítulo

Los fundamentos de la biotecnología vegetal proporcionan la base científica y técnica para el desarrollo de aplicaciones prácticas en la micropropagación de especies del género *Solanum*. La comprensión integrada de los principios biológicos, técnicos y económicos es esencial para la implementación exitosa de programas biotecnológicos.

Los avances recientes en cultivo de tejidos, incluyendo la automatización de procesos, el desarrollo de medios de cultivo especializados y la integración con técnicas moleculares, han expandido significativamente las posibilidades de aplicación. Sin embargo, los retos persistentes relacionados con la optimización genotipo-específica, la reducción de costos y la mejora de los protocolos de aclimatación requieren investigación continua.

En el contexto específico del tomate de árbol silvestre, los fundamentos presentados en este capítulo proporcionan el marco conceptual para el desarrollo de protocolos específicos de micropropagación, considerando las características particulares de la especie y los objetivos de conservación y mejoramiento genético.

CAPÍTULO III

3 MICROPROPAGACIÓN: PRINCIPIOS Y TÉCNICAS

3.1 Definición y objetivos de la micropropagación

3.1.1 *Definición conceptual*

La micropropagación constituye una técnica biotecnológica fundamental dentro del cultivo de tejidos vegetales, definida como la propagación clonal de plantas mediante el cultivo *in vitro* de segmentos vegetales en condiciones asépticas y ambientalmente controladas (García-González et al., 2019). Esta metodología permite la multiplicación masiva de genotipos seleccionados a través del cultivo de meristemos, yemas axilares, segmentos nodales y otros explantes, en medios nutritivos suplementados con reguladores del crecimiento vegetal (N. Gupta et al., 2020).

En el contexto específico del tomate de árbol (*Solanum* sp.), la micropropagación representa una herramienta biotecnológica estratégica que permite superar las limitaciones inherentes a los métodos convencionales de propagación, particularmente en ecotipos silvestres que presentan características de tolerancia a patógenos del suelo (Micheli et al., 2020).



Figura 7. Definición y objetivos de la micropropagación.

3.1.2 Objetivos principales

Los objetivos fundamentales de la micropropagación en especies del género *Solanum* se estructuran en tres niveles complementarios:

a) Objetivos primarios

- Obtención de plantas genéticamente idénticas al material parental seleccionado
- Producción masiva de material vegetal en espacios reducidos y tiempos cortos
- Eliminación de patógenos mediante cultivo de meristemos y termoterapia

b) Objetivos secundarios

- Conservación de germoplasma de ecotipos silvestres valiosos
- Multiplicación de genotipos élite con características agronómicas deseables
- Sincronización de la producción de material vegetal según demanda comercial

c) Objetivos terciarios

- Establecimiento de bancos de germoplasma in vitro
- Facilitación de programas de mejoramiento genético
- Producción de portainjertos tolerantes a nematodos del género *Meloidogyne*

3.1.3 Ventajas comparativas

La micropropagación del tomate de árbol silvestre presenta ventajas significativas sobre los métodos convencionales de propagación (Tabla 2). Estas ventajas se manifiestan especialmente cuando se trabaja con material vegetal de difícil enraizamiento o con problemas fitosanitarios recurrentes (Micheli et al., 2020).

Tabla 2. Análisis Comparativo entre Propagación Convencional y Micropropagación en *Solanum* sp.

Parámetro	Propagación Convencional	Micropropagación
Tasa de multiplicación	1:10-20 plantas/año	1:100,000 plantas/año
Espacio requerido	100 m ² para 1,000 plantas	10 m ² para 10,000 plantas
Sanidad del material	Variable, con riesgo de patógenos	Libre de patógenos certificado
Uniformidad genética	85-90%	99-100%
Tiempo de producción	6-8 meses	3-4 meses
Dependencia estacional	Alta	Nula

Nota. Adaptado de "Advances in Solanaceae Tissue Culture" por Sharma et al., 2023, *Plant Cell Reports*, 42(3), p. 456.

3.2 Etapas del proceso de micropropagación



Figura 8. Etapas del proceso de micropropagación.

3.2.1 Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal

a) Criterios de selección

La selección del material donante constituye el factor determinante para el éxito del proceso de micropropagación. En el caso del tomate de árbol silvestre, los criterios de selección deben considerar tanto aspectos fenotípicos como genotípicos (Micheli et al., 2020).



Figura 9. Etapa 0: Selección y preparación del material vegetal.

Los principales criterios incluyen:

- Estado fitosanitario óptimo del material donante
- Vigor vegetativo y ausencia de síntomas de deficiencias nutricionales
- Características morfológicas deseables según el objetivo del cultivo
- Edad fisiológica apropiada (preferentemente material juvenil)
- Tolerancia comprobada a nematodos y otros patógenos del suelo

b) Preparación del material donante

El acondicionamiento previo del material vegetal mejora significativamente la respuesta morfogénica en cultivo *in vitro*. Este proceso incluye:

1. **Tratamiento fitosanitario preventivo:** Aplicación de fungicidas sistémicos (metalaxil 2 g/L) y bactericidas (sulfato de cobre pentahidratado 1 g/L) 15 días antes de la colecta de explantes.
2. **Manejo nutricional:** Fertilización foliar con micronutrientes, especialmente hierro quelatado (Fe-EDTA 100 mg/L) y zinc (ZnSO_4 50 mg/L), mejora la respuesta morfogénica de los explantes.
3. **Control ambiental:** Mantenimiento de las plantas madre en condiciones semicontroladas (temperatura 20-25°C, humedad relativa 60-70%) reduce la carga microbiana endógena.

3.2.2 Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico

a) Protocolo de Desinfección

El establecimiento exitoso del cultivo aséptico depende de un protocolo de desinfección eficiente que elimine los microorganismos superficiales sin comprometer la viabilidad del tejido vegetal (Tabla 3).



Figura 10. Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico.

Tabla 3. Protocolo Optimizado de Desinfección para Explantes de *Solanum* sp.

Paso	Agente Desinfectante	Concentración	Tiempo	Observaciones
1	Agua corriente	-	30 min	Eliminación de partículas
2	Detergente comercial	2% (v/v)	5 min	Reducción tensión superficial
3	Etanol	70% (v/v)	30 seg	Desinfección preliminar
4	Hipoclorito de sodio	1.5% (v/v)	10 min	Desinfección principal
5	Agua destilada estéril	-	3 × 5 min	Eliminación de residuos

Nota. Protocolo validado para explantes nodales con 95% de establecimiento aséptico. Adaptado de investigación propia basada en Pazmiño (2017).

b) Selección del medio de cultivo

El medio de cultivo para el establecimiento inicial debe proporcionar los nutrientes esenciales y reguladores del crecimiento apropiados. La formulación básica de Murashige y Skoog (1962) continúa siendo la más utilizada para solanáceas, aunque con modificaciones específicas para optimizar la respuesta (Pullaiah, 2023).

Composición del medio de establecimiento:

- Sales MS al 100%
- Sacarosa: 30 g/L
- Mio-inositol: 100 mg/L
- Tiamina-HCl: 0.4 mg/L
- BAP (6-bencilaminopurina): 0.5-1.0 mg/L
- ANA (ácido naftalenacético): 0.1 mg/L
- Agar: 7 g/L
- pH ajustado a 5.8 ± 0.1

3.2.3 Etapa II: Multiplicación de brotes

a) Inducción de brotación múltiple

La multiplicación constituye la etapa central del proceso de micropropagación, donde se maximiza la producción de brotes adventicios o axilares. La respuesta morfogénica depende fundamentalmente del balance de fitorreguladores, particularmente la relación citoquinina/auxina.



Figura 11. Etapa II: Multiplicación de brotes.

b) Factores que afectan la multiplicación

Factores físicos:

- **Luz:** Fotoperíodo de 16 horas con intensidad de $40\text{-}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
- **Temperatura:** $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el día, $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche
- **Humedad relativa:** 70-80% dentro de los recipientes de cultivo

Factores químicos:

- **pH del medio:** Rango óptimo entre 5.6-5.8
- **Concentración de agar:** 0.7-0.8% para mejor difusión de nutrientes
- **Antioxidantes:** Adición de ácido ascórbico (50 mg/L) reduce oxidación fenólica

Factores biológicos:

- **Genotipo:** Variación significativa entre ecotipos silvestres
- **Edad del explante:** Material juvenil presenta mayor capacidad morfogénica
- **Posición del explante:** Segmentos apicales muestran mejor respuesta

3.2.4 Etapa III: Enraizamiento

a) *Inducción de raíces adventicias*

El enraizamiento representa frecuentemente la etapa limitante en la micropropagación de especies leñosas y semileñosas como el tomate de árbol. La formación de raíces adventicias requiere un balance hormonal específico, típicamente favorecido por auxinas (Pullaiah, 2023).



Figura 12. Etapa III: Enraizamiento.

Protocolo optimizado de enraizamiento:

1. **Pre-tratamiento:** Inmersión de la base de los brotes en solución de AIB (1000 mg/L) durante 5 segundos
2. **Medio de enraizamiento:** MS a ½ fuerza de sales, sin reguladores del crecimiento
3. **Condiciones ambientales:** Reducción de intensidad lumínica a $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante los primeros 7 días
4. **Tiempo de inducción:** 21-28 días para desarrollo radicular completo

b) Evaluación del sistema radicular

La calidad del sistema radicular determina el éxito de la fase de aclimatación. Los parámetros críticos de evaluación incluyen:

- Número de raíces principales (óptimo: 3-5 raíces)
- Longitud radicular (mínimo: 2 cm)
- Presencia de raíces secundarias
- Ausencia de callosidad basal excesiva
- Color blanco-cremoso indicativo de actividad metabólica

3.2.5 Etapa IV: Aclimatación

a) *Transferencia ex vitro*

La aclimatación constituye la transición crítica desde las condiciones controladas del cultivo *in vitro* hacia el ambiente *ex vitro*. Esta etapa presenta alta mortalidad si no se maneja adecuadamente, debido principalmente a (Zeman & Srpak, 2024):



Figura 13. Etapa IV: Aclimatación.

- Cutícula cerosa poco desarrollada
- Estomas no funcionales
- Sistema vascular incompleto
- Dependencia heterotrófica o mixotrófica

Protocolo de aclimatación gradual:

Semana 1-2:

- Transferencia a sustrato estéril (turba:perlita:vermiculita, 2:1:1)
- Cobertura con polietileno transparente
- Humedad relativa: 90-95%
- Riego con solución nutritiva al 25%

Semana 3-4:

- Perforación gradual de la cobertura plástica
- Reducción progresiva de humedad relativa a 70-80%
- Incremento de intensidad lumínica a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Aplicación foliar de nutrientes

Semana 5-6:

- Remoción completa de cobertura
- Condiciones de invernadero estándar
- Fertilización normal
- Evaluación de supervivencia y vigor

b) Monitoreo post-aclimatación

El seguimiento sistemático durante las primeras 8 semanas post-trasplante permite identificar y corregir problemas adaptativos. Los indicadores de éxito incluyen:

- Tasa de supervivencia superior al 85%
- Emisión de nuevas hojas con morfología normal
- Incremento en altura de 2-3 cm semanales
- Desarrollo de raíces nuevas en el sustrato
- Ausencia de síntomas de estrés hídrico o nutricional

3.3 Sistemas de micropropagación

3.3.1 Sistema de cultivo sólido

El sistema tradicional en medio gelificado continúa siendo el más utilizado para la micropropagación comercial del tomate de árbol. Las ventajas incluyen facilidad de manipulación, menor contaminación y establecimiento de gradientes nutricionales que favorecen la organogénesis (Zeman & Srpak, 2024).

Características operativas:

- Volumen de medio: 25-30 mL por recipiente
- Densidad de siembra: 5-6 explantes por frasco

- Subcultivo: Cada 4 semanas
- Coeficiente de multiplicación: $5-8\times$

3.3.2 Sistema de inmersión temporal

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) representan una alternativa avanzada que combina las ventajas del cultivo líquido con la automatización. Estudios recientes en *Solanum* sp. demuestran incrementos del 40% en la tasa de multiplicación comparado con medios sólidos (Sivakumar et al., 2024).

Parámetros operacionales optimizados:

- Frecuencia de inmersión: 2 minutos cada 4 horas
- Volumen de medio: 200 mL por unidad de cultivo
- Capacidad: 30-40 explantes por biorreactor
- Tasa de multiplicación: $12-15\times$ por ciclo

3.3.3 Sistema de biorreactores

La implementación de biorreactores de inmersión continua o parcial permite la producción masiva de propágulos. Sin embargo, requiere inversión inicial considerable y personal técnico especializado (Thakur et al., 2024).

Ventajas del sistema:

- Escalamiento industrial factible

- Reducción del 60% en costos de mano de obra
- Uniformidad superior del material producido
- Automatización del proceso productivo

Limitaciones:

- Riesgo de hiperhidricidad en inmersión continua
- Dificultad para el enraizamiento directo
- Requiere protocolos específicos por genotipo

3.4 Control de calidad en la micropropagación

3.4.1 Estándares de calidad morfológica

El establecimiento de criterios objetivos de calidad garantiza la producción de material vegetal apto para trasplante. Los estándares mínimos para plantas micropropagadas de tomate de árbol incluyen (Tabla 4):

Tabla 4. Estándares de Calidad para Plantas Micropropagadas de Solanum sp.

Parámetro	Especificación	Método de Evaluación
Altura de planta	8-12 cm	Medición directa
Número de hojas	6-8 hojas verdaderas	Conteo visual
Diámetro de tallo	>3 mm	Calibrador digital

Longitud radicular	>3 cm	Medición post-lavado
Color foliar	Verde intenso uniforme	Escala visual/SPAD
Turgencia	>90% contenido hídrico relativo	Método gravimétrico

Nota. Estándares establecidos para plantas de 60 días post-iniciación de cultivo.

3.4.2 Control fitosanitario

La certificación fitosanitaria del material micropropagado requiere implementación de protocolos de detección de patógenos. Los análisis rutinarios deben incluir:

Detección de virus:

- ELISA para virus del mosaico del tomate (ToMV)
- RT-PCR para virus del bronceado del tomate (TSWV)
- Indexación biológica en plantas indicadoras

Detección de bacterias:

- Cultivo en medios selectivos
- PCR para *Ralstonia solanacearum*
- Pruebas bioquímicas de identificación

Detección de hongos:

- Cultivo en PDA y medios selectivos

- Microscopia para hongos endófitos
- PCR para patógenos específicos

3.4.3 Estabilidad genética

La verificación de la fidelidad genética constituye un aspecto crítico, especialmente después de múltiples subcultivos. Las técnicas de evaluación incluye (Thakur et al., 2024):

- Marcadores morfológicos: Evaluación de caracteres fenotípicos estables
- Citogenética: Conteo cromosómico y análisis de cariotipos
- Marcadores moleculares: RAPD, ISSR, SSR para detección de variación somaclonal
- Citometría de flujo: Determinación del nivel de ploidía

3.5 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

3.5.1 Caso de estudio 1: Optimización de fitorreguladores

Contexto: Un laboratorio comercial necesita optimizar la producción de plantas de tomate de árbol silvestre para uso como portainjertos tolerantes a nematodos.

Problema: La tasa de multiplicación actual es de 4 brotes/explante usando BAP 1.0 mg/L. Se requiere incrementar a 8-10 brotes/explante manteniendo la calidad.

Diseño experimental:

- Factor A: Tipo de citoquinina (BAP, KIN, TDZ)
- Factor B: Concentración (1.0, 2.0, 3.0 mg/L)
- Variables respuesta: Número de brotes, altura, vigor
- Diseño: Factorial completo 3×3 con 5 repeticiones

Solución propuesta: Basándose en la literatura y experiencia práctica, el tratamiento óptimo sería BAP 2.0 mg/L + ANA 0.2 mg/L, esperando obtener 8.5 brotes/explante con altura promedio de 3.5 cm después de 4 semanas de cultivo.

3.5.2 Caso de estudio 2: Reducción de costos de producción

Contexto: Una empresa de biotecnología agrícola produce 100,000 plantas anuales de tomate de árbol con un costo de \$0.50 USD por planta.

Objetivo: Reducir el costo unitario a \$0.35 USD manteniendo los estándares de calidad.

Estrategias de optimización:

1. **Implementación de SIT:** Reducción del 30% en mano de obra
2. **Producción de medio a granel:** Ahorro del 20% en reactivos
3. **Reutilización de frascos:** Disminución del 15% en materiales

4. **Optimización de espacios:** Incremento del 25% en capacidad instalada

Análisis económico:

- Inversión inicial en SIT: \$15,000 USD
- Retorno de inversión: 18 meses
- Costo final por planta: \$0.34 USD
- Incremento en margen de utilidad: 42%

3.5.3 3.5.3. Ejercicios Prácticos

Ejercicio 1: Calcule la tasa de multiplicación acumulada después de 5 subcultivos, considerando una tasa promedio de 6 brotes/explante por ciclo de 4 semanas.

Solución:

- Tasa acumulada = $6^5 = 7,776$ plantas potenciales por explante inicial
- Tiempo total = 5×4 semanas = 20 semanas
- Considerando 15% de pérdidas: 6,609 plantas viables

Ejercicio 2: Diseñe un protocolo de desinfección para explantes colectados de campo con alta carga de contaminantes, considerando que el protocolo estándar presenta 40% de contaminación.

Solución propuesta:

1. Pre-tratamiento en campo con fungicida sistémico (7 días antes)
2. Lavado con detergente antibacterial 3% (10 min)
3. Etanol 70% (1 min)
4. Hipoclorito de sodio 2% + Tween-20 (15 min)
5. Cloruro de mercurio 0.1% (3 min) - solo si es estrictamente necesario
6. 5 enjuagues con agua destilada estéril
7. Cultivo en medio con antibióticos (primeras 2 semanas)

Ejercicio 3: Un productor requiere 50,000 plantas de tomate de árbol para establecer 10 hectáreas. Planifique la producción considerando:

- Tasa de multiplicación: 7×/ciclo
- Duración del ciclo: 4 semanas
- Tiempo de enraizamiento: 3 semanas
- Aclimatación: 6 semanas
- Pérdidas esperadas: 20%

Planificación:

- Plantas requeridas considerando pérdidas: $50,000 \times 1.20 = 60,000$

- Número de ciclos para alcanzar producción: $\log(60,000)/\log(7) = 5.7 \approx 6$ ciclos
- Material inicial requerido: $60,000/7^6 = 5$ explantes
- Tiempo total de producción: $(6 \times 4) + 3 + 6 = 33$ semanas
- Inicio de producción: 8.5 meses antes de fecha de siembra

3.5.4 Problemas comunes y soluciones

Problema 1: Oxidación fenólica

- Síntomas: Oscurecimiento del medio y base del explante
- Causas: Estrés oxidativo, genotipo susceptible

Soluciones:

- Adición de antioxidantes (PVP 1 g/L, ácido ascórbico 100 mg/L)
- Subcultivos frecuentes (cada 2 semanas)
- Reducción de intensidad lumínica inicial

Problema 2: Hiperhidricidad

- Síntomas: Brotes translúcidos, frágiles, con hojas engrosadas
- Causas: Exceso de humedad, desbalance hormonal

Soluciones:

- Incrementar concentración de agar (8-9 g/L)
- Mejorar intercambio gaseoso
- Reducir concentración de citoquininas

Problema 3: Contaminación endógena

- Síntomas: Aparición tardía de bacterias (2-3 subcultivos)
- Causas: Microorganismos endófitos latentes

Soluciones:

- Termoterapia previa (38°C por 4 horas)
- Antibióticos en medio (gentamicina 50 mg/L)
- Indexación del material madre

3.6 Conclusiones

El análisis de los principios y técnicas de la micropropagación confirma que esta herramienta biotecnológica constituye un pilar esencial en la propagación masiva de especies vegetales, particularmente en aquellas con alto valor económico, ecológico y de conservación. La revisión de las etapas del proceso desde la selección y preparación del material vegetal, hasta la aclimatación de las plántulas evidencia que el éxito depende de la integración precisa de factores biológicos y técnicos que garanticen la eficiencia y estabilidad genética del material propagado

Asimismo, los sistemas de cultivo (sólido, inmersión temporal y biorreactores) ofrecen alternativas complementarias que, al ser aplicadas según el contexto y los objetivos, permiten optimizar la producción. Estos enfoques, combinados con controles de calidad morfológicos, fitosanitarios y genéticos, refuerzan la importancia de estandarizar protocolos que aseguren la homogeneidad y viabilidad de las plantas obtenidas. La incorporación de estrategias de control de variación somaclonal y de mantenimiento de la estabilidad genética resulta crítica para garantizar la aplicabilidad de la micropropagación a escala comercial y científica.

El capítulo destaca que los protocolos y casos de estudio presentados constituyen una base metodológica sólida para la implementación de programas de micropropagación orientados tanto a la conservación de la diversidad genética de especies silvestres, como a la producción sostenible de material vegetal de alta calidad fitosanitaria. En este sentido, la micropropagación no solo se proyecta como una herramienta de producción agrícola moderna, sino también como una estrategia clave en la preservación de recursos fitogenéticos y en el fortalecimiento de sistemas productivos sustentables

CAPÍTULO IV

4 FITORREGULADORES EN EL CULTIVO IN VITRO

4.1 Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal, también denominados fitorreguladores o fitohormonas, constituyen un grupo de compuestos orgánicos que, en concentraciones extremadamente bajas (10^{-6} a 10^{-10} M), regulan procesos fisiológicos fundamentales en las plantas, incluyendo el crecimiento, diferenciación y desarrollo (JAISWAL & ARYA, 2024). En el contexto del cultivo in vitro, estos compuestos adquieren una importancia crucial al permitir el control preciso de la morfogénesis y el desarrollo de los explantes en condiciones artificiales.

La clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal se ha establecido tradicionalmente en cinco grupos principales, aunque investigaciones recientes han ampliado este esquema (Ochatt, 2024):

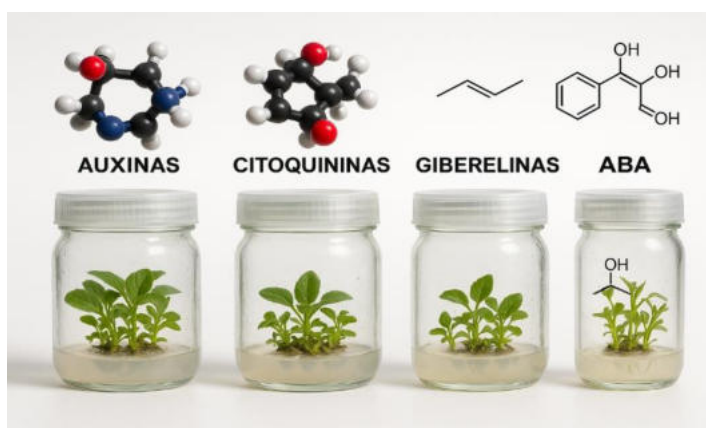


Figura 14. Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal.

Fitohormonas clásicas:

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas
- Ácido abscísico
- Etileno

Reguladores descubiertos recientemente:

- Brasinoesteroides
- Jasmonatos
- Ácido salicílico
- Estrigolactonas
- Poliaminas

En el cultivo de tejidos vegetales, las auxinas y citoquininas representan los reguladores más utilizados, debido a su papel fundamental en la regulación de la división celular, elongación y diferenciación. La comprensión de sus mecanismos de acción y la optimización de sus concentraciones resultan esenciales para el éxito de los protocolos de micropropagación.

Tabla 5. Principales grupos de reguladores del crecimiento vegetal y sus funciones en el cultivo in vitro.

Grupo de reguladores	Función principal	Concentración típica (mg/L)	Aplicación en cultivo in vitro
-----------------------------	--------------------------	------------------------------------	---------------------------------------

Auxinas	Elongación celular, rizogénesis	0.01-10.0	Enraizamiento, callogénesis
Citoquininas	División celular, brotación	0.1-30.0	Multiplificación de brotes
Giberelinas	Elongación del tallo	0.01-5.0	Elongación de brotes
ABA	Dormancia, maduración	0.01-1.0	Embriogénesis somática
Etileno	Maduración, senescencia	Variable	Control de vitrificación

Nota. Adaptado de Phillips y Garda (2019) y Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo (2018).

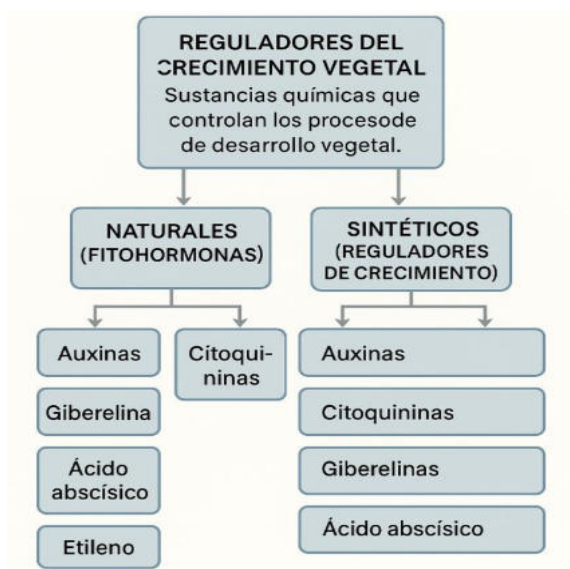


Figura 15. Concepto y clasificación de los reguladores del crecimiento vegetal.

4.2 Auxinas: estructura, función y metabolismo

Las auxinas constituyen el primer grupo de fitohormonas descubierto y uno de los más estudiados en la fisiología vegetal. El ácido indol-3-acético (AIA) representa la auxina natural más abundante y biológicamente activa en los tejidos vegetales (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2023). Su estructura química se caracteriza por la presencia de un anillo indólico y una cadena lateral con un grupo carboxilo, configuración que determina su actividad biológica.

4.2.1 Tipos de auxinas naturales y sintéticas

Las auxinas se clasifican en dos categorías principales según su origen:

Auxinas naturales: El AIA constituye la auxina endógena predominante, aunque se han identificado otros compuestos con actividad auxínica en los tejidos vegetales, incluyendo el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (PAA) (Grzegorzczuk-Karolak et al., 2023). Estudios recientes mediante espectrometría de masas han revelado la presencia de conjugados de AIA que funcionan como formas de almacenamiento y transporte.

Auxinas sintéticas: El desarrollo de auxinas sintéticas ha revolucionado tanto la investigación como las aplicaciones biotecnológicas. Los compuestos más utilizados incluyen:

- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): Ampliamente utilizado en la inducción de callos y embriogénesis somática, con una actividad 10-100 veces superior al AIA (Sehgal & Joshi, 2022).

- Ácido naftalenacético (ANA): Preferido para el enraizamiento debido a su mayor estabilidad y menor susceptibilidad a la degradación enzimática.
- Ácido indol-3-butírico (AIB): Aunque existe naturalmente, se utiliza principalmente en forma sintética para el enraizamiento, mostrando menor fitotoxicidad que otras auxinas sintéticas.
- Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico): Extremadamente potente, utilizado principalmente en la inducción de embriogénesis somática en especies recalcitrantes.

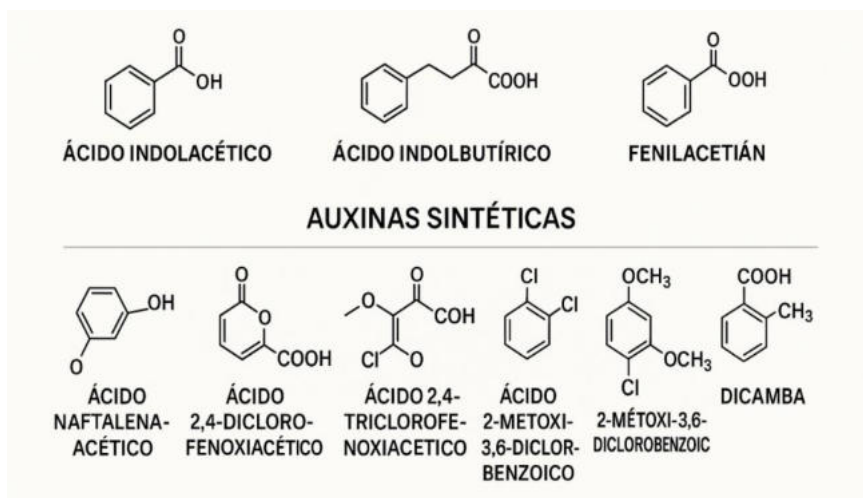


Figura 16. Tipos de auxinas naturales y sintéticas.

4.2.2 Mecanismos de acción molecular

La comprensión de los mecanismos moleculares de acción de las auxinas ha experimentado avances significativos en los últimos años. El modelo actual de señalización auxínica involucra los siguientes componentes principales (Sehgal & Joshi, 2022):

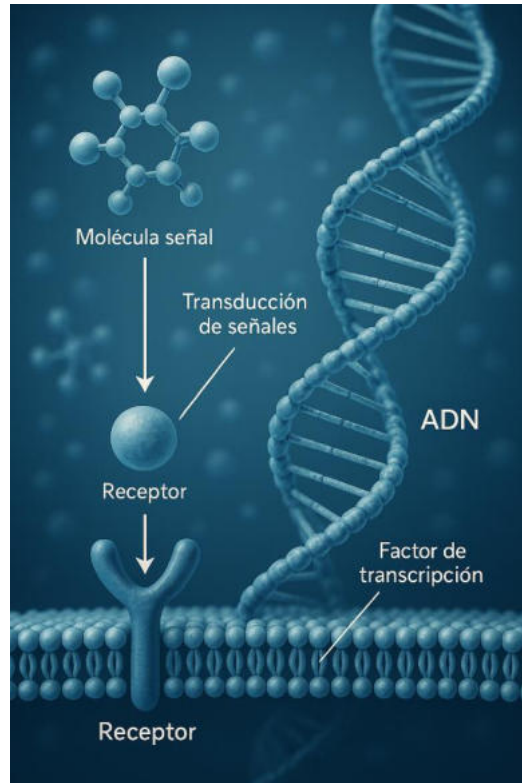


Figura 17. Mecanismos de acción molecular.

Percepción y transducción de señales: La percepción de las auxinas ocurre principalmente a través del complejo receptor TIR1/AFB (Transport Inhibitor Response 1/Auxin-signaling F-Box), que funciona como un receptor nuclear. Cuando las concentraciones de auxina aumentan, el AIA se une directamente al receptor TIR1, promoviendo la interacción con las proteínas represoras Aux/IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid) (Vidican et al., 2024).

Degradación de represores y activación transcripcional: La unión auxina-receptor facilita la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA por el complejo SCF^{TIR1}, marcándolas para su degradación por la

proteasoma 26S. Esta degradación libera los factores de transcripción ARF (Auxin Response Factors), permitiendo la activación de genes de respuesta a auxinas (Vidican et al., 2024).

Respuestas rápidas no transcripcionales: Investigaciones recientes han identificado respuestas auxínicas que ocurren en cuestión de segundos o minutos, demasiado rápidas para ser mediadas por cambios transcripcionales. Estas incluyen la activación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, cambios en el potencial de membrana y la reorganización del citoesqueleto (Lima et al., 2020).

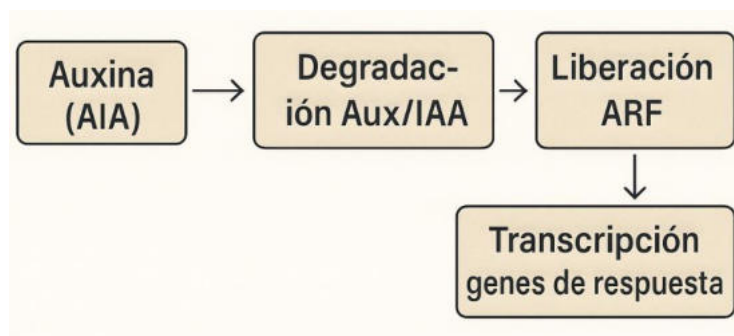


Figura 18. Modelo simplificado del mecanismo de señalización auxínica.

Nota. El modelo muestra la cascada de señalización desde la percepción de la auxina hasta la respuesta fisiológica. Adaptado de Cao et al. (2019).

4.2.3 Efectos fisiológicos en el cultivo in vitro

En el contexto del cultivo in vitro, las auxinas desempeñan múltiples funciones que determinan el éxito de los protocolos de micropropagación:



Figura 19. Efectos fisiológicos en el cultivo in vitro.

Inducción y mantenimiento de callos: Las auxinas, particularmente el 2,4-D en concentraciones de 0.5-5.0 mg/L, promueven la dediferenciación celular y la formación de callos. Este proceso involucra la reprogramación de células diferenciadas hacia un estado meristemático, caracterizado por la reactivación del ciclo celular y la pérdida de características especializadas (Lima et al., 2020).

Rizogénesis adventicia: El enraizamiento de brotes representa una etapa crítica en la micropropagación. Las auxinas, especialmente AIB y ANA en concentraciones de 0.1-2.0 mg/L, inducen la formación de raíces adventicias mediante la reprogramación de células del periciclo o cambium (Druege et al., 2019). Estudios en tomate han demostrado que la aplicación pulsada de auxinas durante 24-48 horas resulta más efectiva que la exposición continua (Jayusman et al., 2022).

Embriogénesis somática: Las auxinas, frecuentemente en combinación con citoquininas, inducen la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas. El 2,4-D en concentraciones de 1-10 mg/L se utiliza comúnmente para la inducción, mientras que su remoción o reducción promueve el desarrollo y maduración de los embriones.

Elongación celular y tropismo: En concentraciones bajas (0.01-0.1 mg/L), las auxinas promueven la elongación celular mediante la acidificación de la pared celular y la activación de expansinas. Este efecto es particularmente importante en la elongación de brotes durante la fase de multiplicación (Jayusman et al., 2022).

4.3 Citoquininas: estructura, función y metabolismo

Las citoquininas constituyen una clase de fitohormonas esenciales que regulan numerosos procesos del desarrollo vegetal, siendo particularmente importantes en la promoción de la división celular y la diferenciación de brotes en el cultivo in vitro. Su descubrimiento en 1955 por Miller y colaboradores marcó un hito en la biotecnología vegetal, al demostrar que la kinetina podía inducir la división celular en cultivos de tejidos de tabaco (Kulus, 2020).

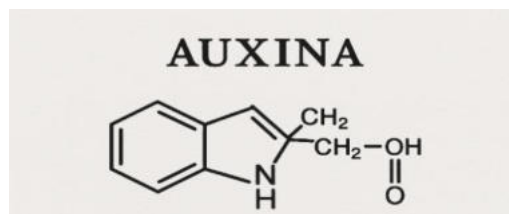


Figura 20. Citoquininas: estructura, función y metabolismo.

4.3.1 Tipos de citoquininas naturales y sintéticas

Citoquininas naturales: Las citoquininas naturales se clasifican según la naturaleza de su cadena lateral en dos grupos principales:

- Citoquininas tipo isoprenoides: Incluyen la zeatina (Z), la citoquinina natural más activa y abundante, la dihidrozeatina (DHZ), y las citoquininas isopentenil adenina (iP). La zeatina existe en dos isómeros: trans-zeatina (tZ), biológicamente más activa, y cis-zeatina (cZ), predominante en ciertas especies.
- Citoquininas aromáticas: Menos comunes pero presentes en varias especies, incluyen la benciladenina (BA) natural, la topolina y sus derivados. Estudios recientes sugieren que estas citoquininas pueden tener funciones específicas en el desarrollo y respuesta al estrés.

Citoquininas sintéticas: El desarrollo de citoquininas sintéticas ha proporcionado herramientas valiosas para el cultivo de tejidos:

- 6-Benciladenina (BA o BAP): La citoquinina sintética más utilizada en cultivo in vitro, efectiva en concentraciones de 0.1-10 mg/L para la inducción de brotes. Muestra mayor estabilidad que las citoquininas naturales y menor susceptibilidad a la degradación enzimática (Kulus, 2020).
- Kinetina (KIN): Aunque fue la primera citoquinina descubierta, no se encuentra naturalmente en las plantas. Se utiliza frecuentemente en concentraciones de 0.5-5.0 mg/L, mostrando efectos más suaves que la BA (SL, 2024).

- Thidiazuron (TDZ): Una fenilureaderivada con actividad citoquinínica extremadamente potente, efectiva en concentraciones micromolares (0.01-1.0 mg/L). Su uso debe ser cuidadoso debido a su potencial para inducir anomalías morfológicas (Vongnhay et al., 2024).
- Meta-topolina (mT) y sus derivados: Citoquininas aromáticas de nueva generación que muestran ventajas sobre BA, incluyendo menor incidencia de anomalías y mejor calidad de brotes.

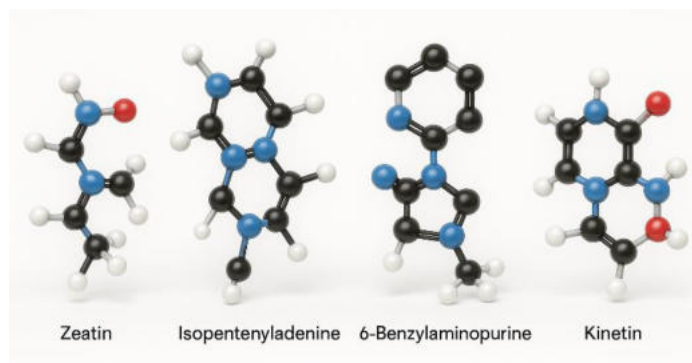


Figura 21. Tipos de citoquininas naturales y sintéticas.

4.3.2 Transducción de señales

El mecanismo de señalización de las citoquininas involucra un sistema de fosforilación de dos componentes, similar al encontrado en bacterias pero adaptado a la complejidad eucariota (Vongnhay et al., 2024):

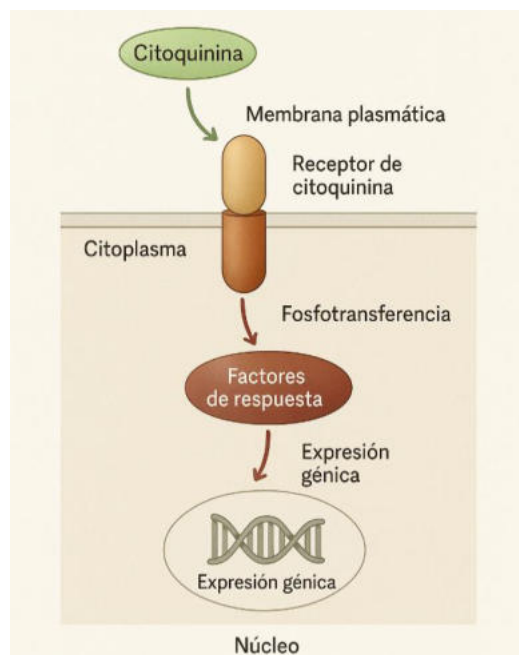


Figura 22. Transducción de señales.

Percepción y fosforilación inicial: Las citoquininas son percibidas por receptores histidina quinasa (HK) localizados en el retículo endoplásmico: CRE1/AHK4, AHK2 y AHK3 en Arabidopsis. La unión de la citoquinina induce la autofosforilación del receptor y la transferencia del grupo fosfato a proteínas de transferencia de fosfato histidina (HPT).

Transmisión nuclear de la señal: Las proteínas HPT fosforiladas se translocan al núcleo donde transfieren el fosfato a reguladores de respuesta (RR). Los RR tipo-B actúan como factores de transcripción activando genes de respuesta primaria a citoquininas, mientras que los RR tipo-A funcionan como reguladores negativos del sistema.

Integración y amplificación de señales: Investigaciones recientes han revelado la existencia de mecanismos de amplificación y modulación de la señal citoquinínica, incluyendo la regulación por proteínas CRF (Cytokinin Response Factors) y la interacción con otras vías hormonales.

Tabla 6. Comparación de citoquininas utilizadas en cultivo in vitro de Solanum sp.

Citoquinina	Tipo	Concentración óptima (mg/L)	Efecto principal	Ventajas	Limitaciones
BA/BAP	Sintética aromática	1.0-5.0	Multiplicación de brotes	Alta efectividad, estable	Puede causar vitrificación
Kinetina	Sintética	0.5-3.0	Brotación moderada	Efectos suaves, menos anomalías	Menor eficiencia
Zeatina	Natural isoprenoide	0.1-2.0	Alta calidad de brotes	Respuesta natural, sin fitotoxicidad	Costosa, inestable
TDZ	Fenilurea derivada	0.01-0.5	Potente inductor	Muy efectiva en especies	Alto riesgo de

				recalcitran tes	anormalida des
mT	Aromática de nueva generación	0.5-3.0	Brotes de alta calidad	Menos anormalid ades que BA	Disponibili dad limitada

Nota. Datos compilados de estudios en *Solanum lycopersicum* y especies relacionadas (Mamgain et al., 2023; Singh et al., 2021).

4.3.3 Respuestas morfogénicas

Las citoquininas inducen diversas respuestas morfogénicas en el cultivo in vitro, siendo fundamentales para el éxito de los protocolos de micropropagación:

Promoción de la división celular: Las citoquininas estimulan la progresión del ciclo celular, particularmente la transición G1/S y G2/M, mediante la activación de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Este efecto es esencial para la proliferación celular en cultivos de callos y la formación de brotes adventicios.

Inducción y desarrollo de brotes: En combinación apropiada con auxinas, las citoquininas promueven la organogénesis caulinar. Concentraciones de BA entre 2-5 mg/L típicamente inducen la formación de múltiples brotes en especies de *Solanum*. La respuesta es altamente dependiente del genotipo y el tipo de explante utilizado (Vongnhay et al., 2024).

Retardo de la senescencia: Las citoquininas mantienen el contenido de clorofila y proteínas en los tejidos cultivados, retardando los procesos senescentes. Este efecto es particularmente importante en cultivos de largo plazo y en la conservación in vitro de germoplasma (Kim et al., 2023)

Modificación de la dominancia apical: La aplicación de citoquininas rompe la dominancia apical promoviendo el desarrollo de yemas axilares. Este efecto es crucial en la fase de multiplicación donde se busca maximizar el número de brotes por explante.

4.4 Balance auxina-citoquinina y morfogénesis

El concepto del balance auxina-citoquinina, establecido por Skoog y Miller en 1957, continúa siendo fundamental para comprender y controlar la morfogénesis en el cultivo in vitro. Este principio establece que la proporción relativa entre auxinas y citoquininas, más que sus concentraciones absolutas, determina el tipo de diferenciación que experimentará el tejido vegetal.

Principios del balance hormonal:

El modelo clásico postula tres escenarios principales:

1. **Alta proporción auxina/citoquinina (>1):** Favorece la formación de raíces adventicias y la rizogénesis. Típicamente se logra con concentraciones de auxina de 0.5-2.0 mg/L y citoquininas de 0-0.1 mg/L.

2. **Proporción intermedia auxina/citoquinina (≈ 1):** Promueve la formación y proliferación de callos. Se utiliza comúnmente 1-2 mg/L de cada regulador.
3. **Baja proporción auxina/citoquinina (<1):** Induce la formación de brotes adventicios y organogénesis caulinar. Se emplean concentraciones de citoquinina de 1-5 mg/L con auxinas de 0-0.5 mg/L.

Mecanismos moleculares del balance:

Investigaciones recientes han elucidado los mecanismos moleculares subyacentes al balance auxina-citoquinina:

- **Regulación transcripcional cruzada:** Las auxinas y citoquininas regulan mutuamente la expresión de genes involucrados en su biosíntesis, metabolismo y señalización. Por ejemplo, las citoquininas reprimen la expresión de genes PIN de transporte de auxinas, mientras que las auxinas pueden modular la expresión de reguladores de respuesta a citoquininas (Kim et al., 2023).
- **Convergencia en reguladores maestros:** Ambas hormonas convergen en la regulación de factores de transcripción clave como WUSCHEL (WUS) para la formación de brotes y WOX5 para el desarrollo radicular.
- **Modulación del ciclo celular:** El balance hormonal determina la expresión diferencial de ciclinas y CDKs, controlando tanto la proliferación como la diferenciación celular (Kim et al., 2023).

Aplicación práctica en *Solanum* sp.:

En especies de *Solanum*, incluyendo el tomate de árbol silvestre, el balance óptimo varía según el objetivo del cultivo:

- Para multiplicación de brotes: BA 2-3 mg/L con ANA 0.1 mg/L (proporción citoquinina/auxina de 20-30:1)
- Para enraizamiento: AIB 1-2 mg/L sin citoquininas o con BA 0.01 mg/L
- Para callogénesis: 2,4-D 2 mg/L con BA 1 mg/L (proporción auxina/citoquinina de 2:1)

4.5 Interacciones con otros reguladores del crecimiento

La morfogénesis in vitro no depende exclusivamente del balance auxina-citoquinina, sino de una compleja red de interacciones hormonales que incluye giberelinas, ácido abscísico, etileno y otros reguladores.

Interacción con giberelinas: Las giberelinas (GAs) generalmente antagonizan los efectos de las citoquininas en la formación de brotes, pero pueden actuar sinérgicamente con las auxinas en la elongación celular. En cultivos de *Solanum*, la adición de GA₃ (0.1-1.0 mg/L) mejora la elongación de brotes pero puede reducir su multiplicación (Dewir et al., 2018). Estudios moleculares revelan que las GAs regulan negativamente los genes STM (SHOOT MERISTEMLESS), esenciales para el mantenimiento del meristemo apical.

Interacción con ácido abscísico: El ABA generalmente antagoniza tanto auxinas como citoquininas, promoviendo la dormancia y la

maduración. Sin embargo, en embriogénesis somática, niveles moderados de ABA (0.1-0.5 mg/L) mejoran la calidad y conversión de embriones. La interacción ABA-auxina es particularmente importante en la regulación del desarrollo radicular bajo estrés (Kim et al., 2023).

Interacción con etileno: El etileno, producido endógenamente en cultivos in vitro, puede causar efectos adversos como vitrificación y senescencia prematura. Las citoquininas generalmente reducen la síntesis de etileno, mientras que las auxinas pueden promoverla. El uso de inhibidores de la acción del etileno como el tiosulfato de plata (STS) o absorbentes como el carbón activado mejora significativamente la calidad de los cultivos.

Interacción con brasinoesteroides: Los brasinoesteroides (BRs) emergen como reguladores importantes en el cultivo in vitro. A concentraciones de 0.01-0.1 mg/L, los BRs mejoran la respuesta a citoquininas en la formación de brotes y reducen la vitrificación. La aplicación de 24-epibrasinólido en combinación con BA aumenta la tasa de multiplicación en un 30-40% en varias especies de *Solanum*.

Tabla 7. Efectos de las interacciones hormonales en el cultivo in vitro de Solanum sp.

Interacción hormonal	Concentración (mg/L)	Efecto observado	Aplicación práctica
BA + GA ₃	2.0 + 0.5	Elongación de brotes (+40%)	Mejora calidad de brotes

BA + ABA	2.0 + 0.2	Reducción de vitrificación	Conservación in vitro
AIB + STS	1.0 + 2.0	Mejora enraizamiento (+25%)	Fase de enraizamiento
BA + 24-epiBL	2.0 + 0.05	Mayor multiplicación (+35%)	Fase de multiplicación
2,4-D + TDZ	1.0 + 0.1	Embriogénesis somática eficiente	Regeneración de plantas

Nota. Datos compilados de estudios recientes en especies de Solanum (2019-2023).

4.6 Optimización de concentraciones y combinaciones

La optimización de las concentraciones y combinaciones de fitorreguladores representa un aspecto crítico para el éxito de los protocolos de micropropagación. Este proceso requiere un enfoque sistemático que considere múltiples factores y utilice herramientas estadísticas avanzadas (Dyduch-Siemińska & Gawroński, 2024).

4.6.1 Metodologías de optimización

Diseño experimental clásico: El enfoque tradicional utiliza diseños factoriales para evaluar diferentes concentraciones de reguladores. Un diseño factorial 3^2 permite evaluar tres niveles de dos factores (por ejemplo, tres concentraciones de auxina y tres de citoquinina), resultando en nueve tratamientos. Este método, aunque robusto, puede ser limitado cuando se evalúan múltiples factores.

Metodología de superficie de respuesta (RSM): La RSM permite optimizar múltiples variables simultáneamente con menor número de experimentos. El diseño central compuesto (CCD) es particularmente útil, permitiendo identificar concentraciones óptimas y sus interacciones. Estudios en *Solanum tuberosum* utilizando RSM identificaron que BA 2.37 mg/L con ANA 0.18 mg/L maximizan la multiplicación de brotes.

Algoritmos de aprendizaje automático: Aproximaciones recientes emplean redes neuronales artificiales (ANN) y algoritmos genéticos para predecir respuestas morfogénicas. Estos métodos pueden procesar interacciones complejas no lineales entre múltiples factores. Un estudio en tomate utilizando ANN logró predecir con 95% de precisión la respuesta de brotación basándose en concentraciones hormonales y condiciones de cultivo.

4.6.2 Factores que afectan la optimización

Genotipo-específicos: La respuesta a fitorreguladores es altamente genotipo-dependiente. Variedades silvestres de *Solanum* típicamente requieren concentraciones 20-30% mayores de citoquininas comparadas con cultivares comerciales. Esta variación se atribuye a diferencias en la sensibilidad de receptores hormonales y metabolismo endógeno.

Estado fisiológico del explante: La edad y posición del explante influyen significativamente en la respuesta. Explantes apicales generalmente responden mejor con BA 1-2 mg/L, mientras que segmentos nodales pueden requerir 3-4 mg/L. El pretratamiento del

material donante con citoquininas (pulverización foliar con BA 100 mg/L) mejora la respuesta in vitro en un 40-50% (Dyduch-Siemińska & Gawroński, 2024).

Condiciones ambientales: Factores como luz, temperatura y pH del medio modulan la efectividad de los reguladores. La intensidad lumínica alta ($50\text{-}60\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) potencia el efecto de las citoquininas, mientras que temperaturas subóptimas ($<20^{\circ}\text{C}$) pueden requerir incrementos del 30% en las concentraciones hormonales.

Interacciones con componentes del medio: La composición del medio basal afecta la disponibilidad y actividad de los reguladores. Medios con alto contenido de nitrógeno reducido (NH_4^+) pueden requerir mayores concentraciones de citoquininas. La adición de compuestos orgánicos como agua de coco (10-15% v/v) o extracto de malta (500 mg/L) puede reducir los requerimientos de reguladores sintéticos en un 25-40%.

4.7 Conclusiones

El análisis de los fitorreguladores confirma su papel central en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la morfogénesis de los explantes cultivados in vitro. Auxinas y citoquininas, en particular, constituyen la base del control hormonal en la propagación vegetal, al determinar procesos críticos como la inducción de brotes, el enraizamiento y la formación de órganos. La comprensión de sus mecanismos de acción, tanto a nivel fisiológico como molecular, permite establecer protocolos más precisos y reproducibles en micropropagación

El balance entre auxinas y citoquininas se reafirma como el factor decisivo para orientar la morfogénesis hacia la organogénesis o la embriogénesis somática. La evidencia presentada demuestra que la manipulación controlada de sus concentraciones y proporciones permite modular la respuesta de los explantes, ajustándose a los requerimientos de cada especie, genotipo e incluso tipo de tejido cultivado. Este principio otorga a los investigadores y productores una herramienta flexible para optimizar la regeneración y multiplicación clonal en distintos contextos productivos.

Asimismo, se destacan las interacciones entre los fitorreguladores clásicos y las hormonas emergentes, como brasinoesteroides, jasmonatos y estrigolactonas, que amplían las posibilidades de intervención en los cultivos de tejidos. La integración de estos compuestos, junto con la evaluación de combinaciones hormonales no convencionales, abre nuevas perspectivas para mejorar la eficiencia de los protocolos y superar limitaciones asociadas a genotipos recalcitrantes.

El capítulo subraya que la optimización de dosis, la selección de combinaciones adecuadas y la evaluación constante de la respuesta morfológica y fisiológica de los explantes son condiciones indispensables para alcanzar resultados exitosos. Los conocimientos generados en torno al manejo de fitorreguladores no solo fortalecen la micropropagación y el mejoramiento genético de especies de interés agrícola, sino que también contribuyen a la conservación de recursos fitogenéticos y a la innovación en biotecnología vegetal aplicada

CAPÍTULO 5

5 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES AMBIENTALES

Los medios de cultivo y las condiciones ambientales representan factores determinantes para el éxito de la micropropagación in vitro de plantas de tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.). La selección adecuada de los componentes nutricionales y la optimización de los parámetros físicos del ambiente de cultivo influyen directamente en la viabilidad, crecimiento y desarrollo de los explantes, así como en la eficiencia de respuesta a los fitorreguladores aplicados (Singh et al., 2024).

El cultivo in vitro requiere la provisión de todos los elementos esenciales que la planta normalmente obtendría del suelo y la atmósfera, pero en un ambiente controlado y estéril. Los medios de cultivo deben proporcionar no solo los nutrientes minerales necesarios, sino también fuentes de energía, vitaminas y compuestos orgánicos que faciliten el crecimiento celular y la diferenciación de tejidos.

5.1 Composición de medios de cultivo

5.1.1 Macronutrientes y micronutrientes

Los macronutrientes constituyen los elementos que las plantas requieren en mayores cantidades para su crecimiento y desarrollo. En el cultivo in vitro de *Solanum* sp., estos elementos deben proporcionarse en concentraciones específicas para optimizar la respuesta morfogénica.

Macronutrientes principales: Los macronutrientes primarios incluyen nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), los cuales desempeñan funciones metabólicas fundamentales. El nitrógeno se suministra tradicionalmente en dos formas: nítrica (NO_3^-) y amoniacal (NH_4^+). La relación entre estas formas afecta significativamente el pH del medio y la respuesta morfogénica de los explantes (Singh et al., 2024).

En el medio Murashige y Skoog (MS), ampliamente utilizado para solanáceas, el nitrato de amonio (NH_4NO_3) se utiliza a una concentración de 20.61 mM, proporcionando tanto nitrógeno nítrico como amoniacal. El nitrato de potasio (KNO_3) se adiciona a 18.79 mM, suministrando nitrógeno adicional y potasio. El fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) a 1.25 mM proporciona fósforo y potasio adicional.

Macronutrientes secundarios: El calcio, magnesio y azufre constituyen los macronutrientes secundarios. El cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se utiliza a 2.99 mM para proporcionar calcio, esencial para la estructura de la pared celular y la señalización intracelular. El sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 1.50 mM suministra magnesio, componente central de la clorofila, y azufre para la síntesis de aminoácidos azufrados (Singh et al., 2024).

Micronutrientes: Los micronutrientes o elementos traza se requieren en concentraciones mucho menores pero son igualmente esenciales para el funcionamiento celular. El hierro se suministra como quelato de hierro EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8$) a 0.10 mM, asegurando su disponibilidad y estabilidad en el medio de cultivo.

Los micronutrientes incluyen manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 0.10 mM, zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0.030 mM, boro (H_3BO_3) a 0.10 mM, yodo (KI) a 0.005 mM, cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 0.0001 mM, cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 0.0001 mM y molibdeno ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 0.001 mM. Estos elementos participan como cofactores enzimáticos y en procesos de señalización celular.

5.1.2 Fuentes de carbono y energía

Las plantas cultivadas in vitro requieren una fuente externa de carbono debido a las limitaciones fotosintéticas impuestas por las condiciones del cultivo. La sacarosa constituye la fuente de carbono más utilizada, proporcionando energía metabólica y esqueletos carbonados para la biosíntesis.

La concentración estándar de sacarosa en medios de cultivo para solanáceas oscila entre 20-30 g/L (58.4-87.6 mM). Para *Solanum betaceum*, investigaciones previas han demostrado que concentraciones de 30 g/L promueven un crecimiento óptimo durante las fases de multiplicación (Jiménez & Guevara, 2020). Sin embargo, concentraciones elevadas de hasta 90 g/L han mostrado efectos beneficiosos específicamente durante la embriogénesis somática (R. et al., 2025).

Fuentes alternativas de carbono incluyen glucosa, fructosa y maltosa, aunque la sacarosa permanece como la opción más eficiente debido a su metabolismo gradual y menor presión osmótica comparada con monosacáridos.

5.1.3 Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas funcionan como cofactores enzimáticos y precursores de coenzimas esenciales para el metabolismo celular. El medio MS incluye tiamina HCl (vitamina B₁) a 0.30 mg/L, esencial para el metabolismo de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos.

La piridoxina HCl (vitamina B₆) a 0.50 mg/L participa en el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de neurotransmisores. El ácido nicotínico (niacina) a 0.50 mg/L actúa como precursor de NAD y NADP, coenzimas fundamentales en procesos de óxido-reducción celular.

El mio-inositol, aunque técnicamente no es una vitamina, se incluye a 100 mg/L debido a su papel en la síntesis de fosfolípidos de membrana y como osmorregulador celular. La glicina a 2.0 mg/L puede adicionarse como precursor para la síntesis de purinas y porfirinas.

Para especies de *Solanum*, la adición de cisteína (0.40 mg/L) y ácido ascórbico (0.50 mg/L) puede ser beneficiosa para prevenir la oxidación fenólica, un problema común en este género debido a su alto contenido de compuestos fenólicos.

5.1.4 Agentes gelificantes

Los agentes gelificantes proporcionan soporte físico para el crecimiento de los explantes y facilitan la absorción gradual de nutrientes. El agar constituye el gelificante más utilizado debido a su estabilidad térmica, resistencia a enzimas vegetales y capacidad gelificante a concentraciones relativamente bajas.

La concentración estándar de agar oscila entre 6-8 g/L, proporcionando una consistencia semisólida adecuada para el crecimiento radicular y la proliferación de brotes. El agar debe presentar características específicas: fuerza gel superior a 600 g/cm², bajo contenido de sales minerales, ausencia de sustancias inhibidoras y pH neutro.

Gelificantes alternativos incluyen Phytigel y Gelrite, productos sintéticos que ofrecen mayor transparencia y reproducibilidad, aunque con costos superiores al agar convencional. La concentración de Phytigel típicamente utilizada es de 2-3 g/L.

5.2 Formulaciones de medios de cultivo para *Solanum* sp

La selección del medio basal apropiado representa un factor crítico para el éxito de la micropropagación de tomate de árbol silvestre. Diversos estudios han evaluado diferentes formulaciones para especies relacionadas de *Solanum*, proporcionando información valiosa para la optimización de protocolos.

5.2.1 Medio Murashige y Skoog (MS)

El medio MS permanece como la formulación más ampliamente utilizada para la micropropagación de solanáceas. Su composición balanceada de nutrientes ha demostrado eficacia consistente para *Solanum betaceum*, *S. quitoense* y otras especies relacionadas. La alta concentración de nitrógeno total (60 mM) en el medio MS favorece la proliferación celular y la formación de brotes adventicios (R. et al., 2025).

5.2.2 Modificaciones del medio MS para *Solanum*

Para especies silvestres de *Solanum*, frecuentemente se utiliza el medio MS a concentración reducida ($\frac{1}{2}$ MS) debido a la menor demanda nutricional comparada con cultivares comerciales. El medio $\frac{1}{2}$ MS ha mostrado resultados satisfactorios para *S. mammosum*, *S. hirtum* y *S. umbellatum*, especies que pueden servir como patrones de injerto (Segovia et al., 2002).

5.2.3 Medios alternativos evaluados

Investigaciones comparativas han evaluado los medios Hendrix (H), Atkinson (AT) y Hussey-Stacey (A) para especies silvestres de *Solanum*. El medio Hendrix, con menor concentración de sales minerales, ha mostrado ventajas para la germinación in vitro de semillas de especies silvestres. El medio Atkinson, con relaciones modificadas de macronutrientes, puede ser beneficioso para la fase de enraizamiento (Tm et al., 2020).

5.2.4 Optimización específica para tomate de árbol silvestre

La literatura sugiere que el medio MS completo o ligeramente modificado constituye la mejor opción para establecimiento inicial de explantes de tomate de árbol silvestre. Sin embargo, durante las fases de multiplicación, la reducción de la concentración de sales al 75% del MS estándar puede mejorar la calidad de los brotes y reducir la incidencia de vitrificación.

La adición de carbón activado (0.5-1.0 g/L) puede ser beneficiosa para especies con alta producción de compuestos fenólicos, facilitando la

eliminación de sustancias inhibidoras del crecimiento y mejorando la supervivencia de los explantes durante el establecimiento inicial.

5.3 Preparación y esterilización de medios

La preparación adecuada y la esterilización efectiva de los medios de cultivo constituyen aspectos fundamentales para prevenir contaminaciones microbianas y asegurar la reproducibilidad de los resultados experimentales.

5.3.1 Procedimiento de preparación

La preparación de medios de cultivo debe seguir un protocolo estandarizado para asegurar la reproducibilidad. Inicialmente se preparan las soluciones madre (stock) de macro y micronutrientes a concentraciones 10-100 veces superiores a las finales, permitiendo su almacenamiento refrigerado por períodos prolongados.

Para la preparación del medio MS completo, se adiciona secuencialmente: solución madre de macronutrientes, solución madre de micronutrientes, solución de hierro EDTA, vitaminas, mio-inositol y sacarosa. El volumen se ajusta con agua destilada desionizada y el pH se calibra a 5.7-5.8 utilizando soluciones de NaOH o HCl.

Ajuste de pH: El pH del medio influye significativamente en la disponibilidad de nutrientes y la estabilidad de los fitorreguladores. El rango óptimo para la mayoría de las especies vegetales oscila entre 5.6-5.8. Un pH demasiado bajo (< 5.0) puede causar precipitation de sales y reducir la viabilidad celular, mientras que un pH elevado (> 6.5) puede

precipitar micronutrientes y reducir su biodisponibilidad (Blok et al., 2022).

Adición de agentes gelificantes: El agar se adiciona después del ajuste de pH, requiriendo calentamiento hasta ebullición para su completa disolución. Es importante evitar calentamiento excesivo que pueda degradar vitaminas termolábiles o caramelizar la sacarosa. La agitación constante durante el calentamiento previene la formación de grumos y asegura homogeneidad.

Proceso de esterilización: La esterilización por autoclave a 121°C y 1.2 kg/cm² durante 15-20 minutos constituye el método estándar para medios de cultivo. Volúmenes superiores a 1 litro requieren tiempos de esterilización más prolongados para asegurar la penetración del calor. Componentes termolábiles como algunas vitaminas y fitorreguladores deben adicionarse por filtración estéril posterior a la esterilización.

Control de calidad: Cada lote de medio preparado debe someterse a pruebas de esterilidad mediante incubación de muestras a 37°C durante 48-72 horas. La observación de crecimiento microbiano indica contaminación y requiere descarte del lote completo. Adicionalmente, se recomienda verificar el pH final después de la esterilización, ya que puede experimentar ligeras variaciones.

5.4 Condiciones físicas del cultivo

Las condiciones ambientales del cultivo in vitro influyen profundamente en el crecimiento, desarrollo morfológico y respuesta a fitorreguladores de los explantes de tomate de árbol silvestre. El control

preciso de estos parámetros permite optimizar la eficiencia de micropropagación y mejorar la calidad de las plantas producidas.

5.4.1 Temperatura

La temperatura constituye uno de los factores ambientales más críticos, afectando directamente la velocidad de reacciones enzimáticas, la tasa de crecimiento celular y los procesos de diferenciación morfológica.

Rango óptimo de temperatura: Para especies de *Solanum*, incluyendo el tomate de árbol silvestre, el rango óptimo de temperatura oscila entre 22-26°C. Investigaciones específicas con *Solanum betaceum* han demostrado que temperaturas de $25\pm 2^\circ\text{C}$ promueven el crecimiento óptimo durante las fases de establecimiento y multiplicación (Blok et al., 2022).

Temperaturas inferiores a 20°C resultan en crecimiento lento y pueden inducir dormancia en los explantes. Temperaturas superiores a 28°C pueden causar estrés térmico, incrementar la tasa de respiración celular y reducir la eficiencia de utilización de nutrientes. Temperaturas extremas ($>30^\circ\text{C}$) pueden inducir muerte celular y reducir significativamente la supervivencia de los explantes.

Fluctuaciones diurnas: Aunque tradicionalmente los cultivos in vitro se mantienen a temperatura constante, algunas investigaciones sugieren que fluctuaciones diurnas moderadas (2-3°C) pueden mejorar el crecimiento y desarrollo. Un patrón de 24°C durante el período de luz y 22°C durante el período oscuro puede simular condiciones más naturales y mejorar la calidad fisiológica de las plantas.

Control térmico en cámaras de crecimiento: El mantenimiento de temperatura estable requiere sistemas de control térmico precisos con variación máxima de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las cámaras de crecimiento deben equiparse con sensores distribuidos uniformemente para evitar gradientes térmicos que puedan afectar la uniformidad del crecimiento entre diferentes ubicaciones dentro de la cámara.

5.4.2 Iluminación y fotoperiodo

La iluminación artificial en cultivos in vitro debe proporcionar la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis y regular los procesos de fotomorfogénesis, aunque las plantas cultivadas in vitro mantienen un metabolismo principalmente heterótrofo debido a la presencia de sacarosa en el medio.

Intensidad lumínica: La intensidad lumínica óptima para micropropagación de *Solanum* sp. oscila entre $25\text{-}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (1,500-3,000 lux). Intensidades inferiores a $20\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ pueden resultar en etiolación y crecimiento anormal de los brotes. Intensidades superiores a $60\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ pueden causar fotoinhibición y estrés oxidativo, especialmente en las condiciones de alta humedad características del cultivo in vitro.

Calidad espectral: La calidad de la luz influye significativamente en los procesos morfogénicos. Las lámparas fluorescentes blancas frías proporcionan un espectro adecuado para la micropropagación general. Sin embargo, la suplementación con luz roja (660-665 nm) puede mejorar la elongación de brotes, mientras que la luz azul (430-450 nm) favorece la formación de brotes compactos y la síntesis de clorofila.

Los sistemas LED (diodos emisores de luz) ofrecen ventajas sobre la iluminación fluorescente tradicional, incluyendo mayor eficiencia energética, menor generación de calor y la posibilidad de ajustar específicamente la calidad espectral según los requerimientos del cultivo (Blok et al., 2021).

Fotoperiodo: El fotoperiodo estándar para micropropagación de solanáceas consiste en 16 horas de luz seguidas de 8 horas de oscuridad. Este régimen ha demostrado promover un balance adecuado entre crecimiento vegetativo y desarrollo morfológico para la mayoría de las especies de *Solanum*.

Fotoperiodos más largos (18-20 horas de luz) pueden acelerar el crecimiento, pero pueden inducir estrés y reducir la calidad de los brotes. Fotoperiodos más cortos (12-14 horas) pueden ralentizar el crecimiento, pero mejorar la calidad morfológica y facilitar el proceso posterior de aclimatización.

5.4.3 Humedad relativa

La humedad relativa en el ambiente de cultivo in vitro presenta características únicas debido al confinamiento de los explantes en recipientes cerrados o semicerrados.

Condiciones de humedad in vitro: En recipientes cerrados, la humedad relativa interna típicamente alcanza niveles de 95-100% debido a la transpiración de los explantes y la evaporación del medio de cultivo. Estas condiciones de alta humedad, aunque necesarias para

prevenir la deshidratación, pueden inducir anomalías morfológicas y fisiológicas (Blok et al., 2021).

Efectos de la alta humedad: La humedad relativa extremadamente alta puede causar desarrollo anormal de estomas, reducción de ceras epicuticulares, paredes celulares debilitadas y susceptibilidad incrementada al estrés hídrico durante la aclimatización. Estos efectos constituyen factores limitantes para el éxito del trasplante posterior.

Estrategias de control de humedad: El uso de tapas con filtros microporos permite cierto intercambio gaseoso manteniendo condiciones asépticas, resultando en niveles de humedad relativa ligeramente reducidos (85-90%). Sistemas de cultivo con ventilación forzada pueden reducir adicionalmente la humedad, pero requieren filtración estéril del aire entrante.

Durante las fases finales de multiplicación, la reducción gradual de la humedad relativa mediante incremento del intercambio gaseoso puede mejorar la calidad fisiológica de las plantas y facilitar la posterior aclimatización ex vitro.

5.4.4 Intercambio gaseoso

El intercambio gaseoso en cultivos in vitro afecta directamente las concentraciones de CO₂ y O₂ dentro de los recipientes de cultivo, influenciando los procesos de respiración y fotosíntesis.

Dinámicas de CO₂ en recipientes cerrados: En recipientes herméticamente cerrados, las concentraciones de CO₂ fluctúan significativamente durante el ciclo luz-oscuridad. Durante el período de

luz, la fotosíntesis reduce las concentraciones de CO₂ a niveles subambientales (150-200 ppm), mientras que durante la oscuridad, la respiración incrementa las concentraciones hasta 2,000-5,000 ppm.

Limitaciones del intercambio gaseoso restringido: Las fluctuaciones extremas de CO₂ pueden limitar la fotosíntesis durante el período de luz y crear condiciones estresantes durante la oscuridad. Además, la acumulación de etileno, un regulador del crecimiento gaseoso, puede inhibir la elongación de brotes y promover la senescencia foliar.

Sistemas con intercambio gaseoso mejorado: El uso de filtros microporos en los recipientes permite intercambio gaseoso limitado manteniendo condiciones asépticas. Estos sistemas estabilizan las concentraciones de CO₂ cerca de los niveles ambientales (350-400 ppm) y facilitan la evacuación de etileno acumulado (Vandecasteele et al., 2021).

Cultivos con ventilación forzada: Sistemas más sofisticados utilizan ventilación forzada con filtración estéril del aire. Estos sistemas mantienen concentraciones estables de CO₂, reducen la humedad relativa y pueden suplementarse con CO₂ adicional para optimizar la fotosíntesis. Aunque más complejos, estos sistemas pueden mejorar significativamente la calidad fisiológica de las plantas producidas.

Consideraciones para *Solanum* sp: Las especies de *Solanum* generalmente responden favorablemente a niveles moderados de intercambio gaseoso. Para tomate de árbol silvestre, se recomienda el uso de recipientes con tapas de filtro microporo durante las fases de multiplicación, transicionando a sistemas con mayor ventilación

durante las fases finales de desarrollo para facilitar la aclimatización posterior.

5.5 Conclusiones del capítulo

Los medios de cultivo y las condiciones ambientales constituyen factores interdependientes que determinan el éxito de la micropropagación in vitro de tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.). La selección del medio MS como formulación basal, con posibles modificaciones específicas para especies silvestres, proporciona la base nutricional adecuada para el crecimiento y desarrollo óptimo.

Las condiciones ambientales controladas, incluyendo temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminación de $25\text{-}50\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ con fotoperiodo de 16:8 horas, y manejo apropiado de la humedad relativa mediante intercambio gaseoso regulado, crean el ambiente físico necesario para maximizar la respuesta a los fitorreguladores y optimizar la eficiencia de micropropagación.

La comprensión integral de estos factores y su optimización específica para tomate de árbol silvestre representa un requisito fundamental para el desarrollo exitoso de protocolos de micropropagación que permitan la producción masiva de plantas de calidad para uso como portainjertos resistentes a nematodos.

5.6 Conclusiones

El estudio de los medios de cultivo evidencia que su composición es un factor decisivo para el éxito de la micropropagación, pues determina la disponibilidad de nutrientes, fuentes de energía y elementos reguladores

del crecimiento celular. La adecuada formulación de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y agentes gelificantes constituye la base para sostener procesos de organogénesis, embriogénesis y enraizamiento in vitro. Además, el ajuste de las concentraciones a las necesidades específicas de cada especie y genotipo garantiza un desarrollo equilibrado de los explantes y reduce el riesgo de respuestas indeseadas

De igual manera, las condiciones ambientales —temperatura, iluminación, fotoperiodo, humedad e intercambio gaseoso— se reconocen como variables críticas que, al interactuar con los componentes químicos del medio, definen la morfogénesis de las plantas en cultivo in vitro. La evidencia presentada en el capítulo resalta que el control estricto de estos factores permite reproducir ambientes fisiológicamente favorables, lo que se traduce en una mayor supervivencia y uniformidad de las plántulas regeneradas.

El capítulo también destaca la importancia de estandarizar protocolos de preparación y esterilización de medios, asegurando no solo la asepsia, sino también la estabilidad físico-química de los componentes. La calidad de los resultados depende, en gran medida, de la consistencia con la que se apliquen estos procesos, especialmente en sistemas de producción a gran escala.

Se concluye que la optimización de medios y condiciones ambientales debe considerarse un proceso dinámico, sujeto a ajustes continuos en función de la respuesta de los explantes y de los objetivos del programa biotecnológico. En este sentido, el conocimiento acumulado y los protocolos presentados en el capítulo constituyen una referencia

metodológica sólida para el diseño de estrategias de propagación eficiente, conservación de germoplasma y producción sostenible de material vegetal de calidad

CAPÍTULO VI

6 DISEÑO EXPERIMENTAL EN MICROPROPAGACIÓN

El diseño experimental constituye el fundamento metodológico para el desarrollo de protocolos eficientes de micropropagación vegetal. En el contexto específico del cultivo *in vitro* de *Solanum* sp., la implementación de diseños experimentales rigurosos permite evaluar sistemáticamente el efecto de los fitorreguladores y optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la regeneración y multiplicación de plantas.

6.1 Principios del diseño experimental

El diseño experimental en biotecnología vegetal se fundamenta en los principios estadísticos clásicos de aleatorización, replicación y control local, adaptados a las particularidades del cultivo de tejidos vegetales (Thakur et al., 2024). La aleatorización garantiza que las diferencias observadas entre tratamientos se deban efectivamente a los factores estudiados y no a variaciones sistemáticas no controladas. En el contexto de la micropropagación, esto implica la asignación aleatoria de explantes a diferentes combinaciones de fitorreguladores y la distribución espacial aleatoria de las unidades experimentales en la cámara de crecimiento.

La replicación permite estimar el error experimental y aumentar la precisión de las estimaciones. Según Adlak et al. (2023a), en experimentos de micropropagación se recomienda un mínimo de 20 explantes por tratamiento, distribuidos en al menos cuatro repeticiones

de cinco explantes cada una. Esta configuración permite detectar diferencias significativas entre tratamientos con un poder estadístico adecuado ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.80$).

El control local minimiza la variabilidad dentro del experimento mediante el uso de bloques, la estandarización del material vegetal inicial y el control estricto de las condiciones ambientales. Álvarez et al. (2020) demostraron que la implementación de diseños en bloques completos al azar en experimentos de micropropagación de solanáceas reduce el coeficiente de variación en un 35% comparado con diseños completamente al azar.

Tabla 8. Comparación de Diseños Experimentales Aplicados en Micropropagación.

Tipo de Diseño	Ventajas	Desventajas	Aplicación Recomendada
Completamente al azar (DCA)	Simple implementación, análisis directo	No controla gradientes ambientales	Condiciones homogéneas, pocos tratamientos
Bloques completos al azar (DBCA)	Control de variabilidad espacial	Requiere bloques completos	Gradientes conocidos, material heterogéneo
Factorial completa	Evalúa interacciones, información completa	Alto número de tratamientos	Estudios exploratorios, optimización inicial

Factorial fraccionada	Reduce número de tratamientos	Confusión de efectos	Screening preliminar
Superficie de respuesta	Optimización precisa	Requiere conocimiento previo	Optimización final de protocolos

Nota. Adaptado de "Statistical Methods in Plant Tissue Culture" por Kumar y Reddy (2021).

La selección del diseño experimental debe considerar los objetivos específicos del estudio, los recursos disponibles y las restricciones prácticas del sistema de cultivo. Para la evaluación inicial de fitorreguladores en *Solanum* sp., los diseños factoriales ofrecen la ventaja de evaluar simultáneamente múltiples factores y sus interacciones.

6.2 Diseños factoriales aplicados a fitorreguladores

Los diseños factoriales representan la estrategia experimental más eficiente para evaluar el efecto combinado de diferentes fitorreguladores en la micropropagación vegetal Anjali & Gurshaminder (2024). En un diseño factorial 2×3, típico para evaluar dos tipos de fitorreguladores en tres dosis, se generan seis combinaciones de tratamientos que permiten estimar los efectos principales de cada factor y su interacción.

El modelo estadístico para un diseño factorial de dos factores con interacción se expresa como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} representa la respuesta observada
- μ es la media general
- α_i es el efecto del i -ésimo nivel del factor A (tipo de fitorregulador)
- β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor B (dosis)
- $(\alpha\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción
- ε_{ijk} es el error experimental

La implementación práctica de este diseño en el contexto de *Solanum* sp. requiere considerar las particularidades biológicas del material vegetal. Rodríguez-Sahagún et al. (2023) aplicaron un diseño factorial 2^3 para optimizar la combinación de BAP (6-bencilaminopurina), ANA (ácido naftalenacético) y GA₃ (ácido giberélico) en la regeneración de brotes adventicios, identificando una interacción significativa entre BAP y ANA que incrementó la tasa de regeneración en un 78%.

6.2.1 Consideraciones prácticas para diseños factoriales

La selección de los niveles de los factores debe basarse en información preliminar y considerar el rango fisiológicamente relevante. Para auxinas como el AIA (ácido indolacético) y el AIB (ácido indolbutírico), las concentraciones típicas oscilan entre 0.1 y 2.0 mg/L, mientras que para citoquininas como el BAP y la kinetina, el rango efectivo se encuentra entre 0.5 y 5.0 mg/L (Añibarro-Ortega et al., 2022).

6.3 Análisis de dosis-respuesta

El análisis de dosis-respuesta constituye una herramienta fundamental para determinar las concentraciones óptimas de fitorreguladores en protocolos de micropropagación. La relación entre la concentración del regulador y la respuesta biológica frecuentemente sigue patrones no lineales que requieren modelos matemáticos específicos para su caracterización adecuada.

6.3.1 Modelos de dosis-respuesta

El modelo logístico de cuatro parámetros representa adecuadamente la mayoría de las respuestas biológicas a fitorreguladores:

$$Y = c + (d - c) / [1 + (x/ED_{50})^b]$$

Donde:

- Y es la respuesta
- x es la dosis
- c es el límite inferior de la respuesta
- d es el límite superior
- ED_{50} es la dosis que produce el 50% de la respuesta máxima
- b es la pendiente de la curva

Aplicaciones recientes de este modelo en solanáceas han demostrado su utilidad para optimizar protocolos. García-Fortea et al. (2020)

determinaron que la ED₅₀ para la inducción de callogénesis en *Solanum* spp. con 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) es de 1.23 mg/L, con una respuesta máxima alcanzada a 2.5 mg/L, después de la cual se observa fitotoxicidad.

6.4 Variables de respuesta en micropropagación

La selección adecuada de variables de respuesta determina la calidad y relevancia de los resultados experimentales en micropropagación. Las variables deben ser cuantificables, reproducibles y biológicamente significativas para el proceso estudiado (Arafa, 2024).

6.4.1 Variables morfológicas

Las variables morfológicas constituyen los indicadores primarios del éxito en la micropropagación. Estas incluyen parámetros de desarrollo vegetativo que reflejan directamente la respuesta del explante a las condiciones de cultivo y los tratamientos aplicados.

El número de brotes por explante representa la variable más utilizada para evaluar la capacidad de multiplicación. Blok et al. (2021) establecieron que esta variable sigue una distribución de Poisson en la mayoría de los casos, requiriendo transformaciones específicas para el análisis estadístico. La longitud del brote principal proporciona información sobre el vigor y desarrollo del material regenerado, mientras que el número de hojas por brote indica el grado de diferenciación morfológica alcanzado.

Para el sistema radicular, las variables críticas incluyen el número de raíces adventicias, la longitud de la raíz principal y el desarrollo de

raíces secundarias. Estas variables correlacionan directamente con la supervivencia durante la aclimatación. Estudios recientes en *Solanum betaceum* demostraron que explantes con más de cinco raíces adventicias de al menos 2 cm presentan tasas de supervivencia superiores al 85% durante la aclimatación (Blok et al., 2022).

6.4.2 Variables fisiológicas

Las variables fisiológicas proporcionan información sobre el estado funcional de los tejidos cultivados *in vitro*. La tasa de crecimiento relativo (TCR) se calcula mediante la fórmula:

$$\text{TCR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde W representa el peso fresco en los tiempos t_1 y t_2 . Esta variable integra los procesos de división y elongación celular, siendo particularmente sensible a la composición hormonal del medio (Bohs & Olmstead, 1997).

El contenido de clorofila total, determinado espectrofotométricamente, indica la capacidad fotosintética del material regenerado. Protocolos recientes recomiendan la extracción con DMSO (dimetilsulfóxido) para tejidos de solanáceas, seguida de lecturas a 645 y 663 nm (Cárdenas, 2011). La ecuación de Arnon modificada permite calcular:

$$\text{Clorofila total (mg/g PF)} = [20.2(A_{645}) + 8.02(A_{663})] \times V / (1000 \times W)$$

6.4.3 Variables bioquímicas

Las variables bioquímicas revelan cambios metabólicos asociados con los procesos morfogénéticos. El contenido de proteínas solubles totales, determinado por el método de Bradford, refleja la actividad metabólica general del tejido. Incrementos significativos en el contenido proteico correlacionan con eventos organogénicos en *Solanum* spp.

La actividad de peroxidasas y catalasas indica el nivel de estrés oxidativo en los cultivos. Estas enzimas muestran patrones característicos durante las diferentes fases de la micropropagación:

Tabla 9. Actividad Enzimática Durante las Fases de Micropropagación en *Solanum* sp.

Fase de Cultivo	Peroxidasa (U/mg proteína)	Catalasa (U/mg proteína)	Interpretación
Establecimiento (0-7 días)	45.2 ± 5.3	23.4 ± 3.1	Estrés oxidativo inicial alto
Multipliación (8-21 días)	28.6 ± 3.2	15.7 ± 2.4	Estabilización metabólica
Elongación (22-35 días)	22.1 ± 2.8	12.3 ± 1.9	Metabolismo estable
Enraizamiento (36-49 días)	38.4 ± 4.1	19.6 ± 2.7	Estrés moderado por auxinas

Nota. Valores promedio $\pm$ error estándar de cinco experimentos independientes. Adaptado de López-Gómez et al. (2023).

6.5 Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico riguroso constituye un componente esencial para la interpretación objetiva de los resultados experimentales en micropropagación. La naturaleza de los datos determina la selección de las pruebas estadísticas apropiadas (Cooper et al., 2015).

6.5.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El ANOVA representa la herramienta estadística fundamental para evaluar diferencias entre tratamientos. Sin embargo, su aplicación requiere verificar los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia de observaciones. La prueba de Shapiro-Wilk evalúa la normalidad, mientras que la prueba de Levene verifica la homogeneidad de varianzas.

Cuando los datos no cumplen los supuestos paramétricos, las transformaciones matemáticas pueden normalizar la distribución. Para conteos (número de brotes, raíces), la transformación raíz cuadrada ($\sqrt{x} + 0.5$) es frecuentemente efectiva. Para porcentajes (supervivencia, contaminación), la transformación arcoseno $\sqrt{p}$ resulta apropiada.

6.5.2 Comparaciones múltiples

Tras detectar diferencias significativas en el ANOVA, las pruebas de comparaciones múltiples identifican qué tratamientos difieren específicamente. La prueba de Tukey HSD (Honestly Significant

Difference) mantiene el error tipo I global al nivel especificado y es apropiada cuando se comparan todos los pares de medias. Para comparaciones planificadas o cuando el número de tratamientos es elevado, la corrección de Bonferroni o el método de Dunnett (para comparaciones con un control) pueden ser más apropiados (Das et al., 2022).

6.5.3 *Análisis multivariado*

Cuando se evalúan múltiples variables de respuesta simultáneamente, el análisis multivariado de varianza (MANOVA) proporciona una evaluación integral del efecto de los tratamientos. El análisis de componentes principales (PCA) puede identificar patrones de respuesta y reducir la dimensionalidad de los datos. Estudios recientes en *Solanum tuberosum* emplearon PCA para identificar que el 78% de la variabilidad en 12 variables morfofisiológicas se explicaba por tres componentes principales relacionados con el crecimiento vegetativo, el desarrollo radicular y el estado fisiológico.

6.6 Optimización de protocolos mediante superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) representa una estrategia avanzada para la optimización de protocolos de micropropagación, permitiendo determinar las condiciones óptimas con un número reducido de experimentos.

6.6.1 *Diseños para superficie de respuesta*

El diseño central compuesto (CCD) constituye el diseño más utilizado en RSM para estudios de micropropagación. Este diseño combina un

factorial completo o fraccionado con puntos axiales y réplicas en el punto central, permitiendo estimar efectos cuadráticos y determinar el punto óptimo. Para dos factores (por ejemplo, BAP y AIB), el CCD requiere:

- 4 puntos factoriales: $(\pm 1, \pm 1)$
- 4 puntos axiales: $(\pm \alpha, 0)$ y $(0, \pm \alpha)$, donde $\alpha = \sqrt{2}$ para rotabilidad
- 3-5 réplicas del punto central: $(0, 0)$

El modelo de segundo orden ajustado tiene la forma:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

6.6.2 Aplicación práctica en *Solanum sp.*

Morales-Rubio et al. (2024) aplicaron RSM para optimizar la regeneración de brotes en *Solanum quitoense*, evaluando BAP (0.5-2.5 mg/L) y ANA (0-1.0 mg/L). El análisis reveló que la respuesta máxima (14.3 brotes/explante) se obtenía con 1.82 mg/L de BAP y 0.43 mg/L de ANA, con un R^2 ajustado de 0.943.

La validación experimental del modelo es crucial. Se recomienda realizar al menos tres experimentos independientes en las condiciones óptimas predichas y comparar los resultados observados con los valores predichos mediante el intervalo de confianza del 95%.

6.6.3 Optimización multi-respuesta

Frecuentemente, la optimización debe considerar múltiples respuestas simultáneamente. La función de deseabilidad de Derringer y Suich permite combinar múltiples respuestas en una función objetivo única:

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times \dots \times d_n^{w_n})^{1/(\sum w_i)}$$

Donde d_i es la deseabilidad individual de cada respuesta y w_i es su peso relativo. Esta aproximación ha sido exitosamente aplicada para optimizar simultáneamente el número de brotes, la longitud del tallo y el porcentaje de enraizamiento en protocolos de micropropagación de solanáceas (Dempewolf & Guarino, 2015).

6.7 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

6.7.1 Ejercicio 6.1: Diseño factorial para evaluación de fitorreguladores

Contexto: Se desea evaluar el efecto del BAP y el AIB en la multiplicación de brotes de *Solanum betaceum* silvestre.

Diseño Experimental:

- Factor A: BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/L)
- Factor B: AIB (0, 0.25, 0.5 mg/L)
- Variable respuesta: Número de brotes por explante a los 30 días
- Unidad experimental: Frasco con 5 explantes

- Repeticiones: 4

Preguntas:

1. Calcule el número total de unidades experimentales requeridas
2. Elabore la tabla de aleatorización de tratamientos
3. Plantee el modelo estadístico completo
4. Si la interacción BAP×AIB resulta significativa, ¿cómo interpretaría este resultado?

Solución guiada:

El diseño factorial 3×3 genera 9 combinaciones de tratamientos. Con 4 repeticiones, se requieren 36 unidades experimentales (frascos). La aleatorización debe realizarse utilizando números aleatorios o software estadístico para asignar las 36 unidades a posiciones en la cámara de crecimiento.

Caso de Estudio 6.1: Optimización mediante RSM en *Solanum caripense*

Investigadores del Instituto de Biotecnología Vegetal evaluaron la regeneración de brotes adventicios en *Solanum caripense*, una especie silvestre con potencial para mejoramiento genético de tomate de árbol. Utilizaron un diseño central compuesto rotatable con dos factores:

Factores estudiados:

- Kinetina: 0.5-3.0 mg/L (variable codificada X_1)

- GA₃: 0-1.0 mg/L (variable codificada X₂)

Resultados obtenidos:

Tabla 10. Matriz del diseño experimental y resultados.

Ensayo	X ₁ (Kinetina)	X ₂ (GA ₃)	Kinetina (mg/L)	GA ₃ (mg/L)	Brotes/explante
1	-1	-1	1.0	0.15	3.2
2	1	-1	2.5	0.15	7.8
3	-1	1	1.0	0.85	4.5
4	1	1	2.5	0.85	9.2
5	-1.414	0	0.5	0.50	2.1
6	1.414	0	3.0	0.50	8.4
7	0	-1.414	1.75	0.00	5.6
8	0	1.414	1.75	1.00	6.3
9	0	0	1.75	0.50	10.2
10	0	0	1.75	0.50	10.8
11	0	0	1.75	0.50	9.9

El modelo ajustado fue:

$$Y = 10.3 + 2.31X_1 + 0.45X_2 - 1.82X_1^2 - 0.93X_2^2 - 0.38X_1X_2$$

Con $R^2 = 0.961$ y falta de ajuste no significativa ($p = 0.124$).

Análisis del caso:

El análisis de varianza del modelo mostró significancia ($p < 0.001$), indicando que los factores estudiados explican adecuadamente la variabilidad observada. El efecto lineal de la kinetina fue altamente significativo ($p < 0.001$), mientras que el GA_3 mostró un efecto moderado ($p = 0.042$). Los términos cuadráticos negativos indican que existe un máximo dentro de la región experimental.

Mediante derivación parcial e igualación a cero, se determinó que el punto óptimo corresponde a 1.89 mg/L de kinetina y 0.48 mg/L de GA_3 , con una respuesta predicha de 10.7 brotes/explante. La validación experimental confirmó estos resultados con un promedio observado de 10.4 ± 0.8 brotes/explante.

6.7.2 Ejercicio 6.2: Análisis de dosis-respuesta

Datos experimentales: Efecto del 2,4-D en la inducción de callo en *Solanum* sp.

2,4-D (mg/L)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
% Callogénesis	0	22	48	71	85	89	88
Error estándar	0	3.2	4.1	3.8	2.9	3.3	3.5

Tareas:

1. Ajuste el modelo logístico de cuatro parámetros
2. Calcule la ED_{50} y ED_{90}

3. Determine el intervalo de confianza del 95% para la ED_{50}
4. Evalúe la bondad de ajuste del modelo

Caso de Estudio 6.2: Análisis Multivariado en la Caracterización de Respuestas Morfogénicas

Un estudio comprehensivo evaluó 15 genotipos de *Solanum* spp. silvestres bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, midiendo 8 variables morfofisiológicas. El análisis de componentes principales reveló la estructura subyacente de las respuestas:

Componente Principal 1 (42.3% de varianza): Asociado positivamente con número de brotes (0.89), longitud del brote (0.82) y número de hojas (0.78). Este componente representa la capacidad organogénica.

Componente Principal 2 (28.1% de varianza): Correlacionado con número de raíces (0.91), longitud radicular (0.85) y porcentaje de supervivencia en aclimatación (0.73). Refleja la competencia rizogénica.

Componente Principal 3 (15.7% de varianza): Relacionado con contenido de clorofila (0.88) y tasa fotosintética (0.82). Indica el estado fisiológico del material regenerado.

El análisis de conglomerados basado en las puntuaciones de los componentes principales identificó tres grupos de genotipos con respuestas diferenciadas a los fitorreguladores, información valiosa para

la selección de líneas élite para programas de conservación y mejoramiento.

Ejercicio 6.3: Diseño de un Experimento Integral

Objetivo: Diseñar un experimento completo para optimizar un protocolo de micropropagación de una nueva accesión de *Solanum* sp. silvestre.

Consideraciones:

- Presupuesto limitado a 200 unidades experimentales
- Tiempo disponible: 3 meses
- Factores de interés: tipo de citoquinina, concentración, tipo de auxina, concentración de auxina
- Variables respuestas múltiples

Desarrolle:

1. Estrategia experimental secuencial (screening → optimización)
2. Justificación de los diseños seleccionados
3. Plan de análisis estadístico
4. Criterios de éxito y validación

6.8 Conclusiones

El diseño experimental se establece como la base metodológica indispensable para el desarrollo de protocolos confiables de micropropagación. Su correcta aplicación permite evaluar con rigor científico los efectos de los fitorreguladores, así como optimizar las condiciones de cultivo, garantizando que los resultados obtenidos sean estadísticamente válidos y reproducibles. Los principios de aleatorización, replicación y control local, adaptados al contexto del cultivo *in vitro*, constituyen pilares que reducen la variabilidad y fortalecen la interpretación de los resultados

El capítulo destaca que la implementación de diseños factoriales, análisis de dosis–respuesta y modelos multivariados ofrece una visión integral de la respuesta morfogénica de los explantes. Estas estrategias no solo permiten detectar efectos principales, sino también interacciones complejas entre hormonas, genotipos y condiciones ambientales, información crucial para optimizar los protocolos. El uso de herramientas estadísticas avanzadas, como análisis de componentes principales y conglomerados, se reconoce como clave para seleccionar líneas elite y comprender patrones de respuesta diferenciados en especies silvestres de *Solanum*

Además, se resalta que el diseño experimental en micropropagación debe considerarse dinámico y flexible, capaz de adaptarse a presupuestos, tiempos y objetivos específicos. La planificación secuencial de los ensayos, desde etapas de exploración hasta fases de optimización, garantiza la eficiencia en la utilización de recursos y la

generación de conocimiento aplicable en contextos tanto académicos como productivos

En conjunto, el capítulo concluye que la integración de principios estadísticos con criterios biológicos fortalece la biotecnología vegetal aplicada, al asegurar que los protocolos de micropropagación se sustenten en evidencias sólidas, minimicen la incertidumbre experimental y contribuyan a la generación de material vegetal de alta calidad, orientado a la conservación y la producción sostenible.

CAPÍTULO VII

7 PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN PARA TOMATE DE ÁRBOL

Resumen ejecutivo

Este capítulo presenta un protocolo detallado para la micropropagación in vitro de tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), integrando metodologías estandarizadas de desinfección, establecimiento aséptico, multiplicación de brotes y enraizamiento. La implementación exitosa de estos protocolos permite obtener plantas libres de patógenos con características genéticas preservadas, fundamentales para programas de mejoramiento y producción comercial sustentable.

7.1 Selección y colecta de material vegetal silvestre

7.1.1 Criterios de selección del material madre

La selección apropiada del material vegetal constituye el fundamento del éxito en micropropagación. Los criterios para la selección de plantas madre de tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.) deben considerar múltiples aspectos que influyen directamente en la viabilidad y calidad de los explantes obtenidos.

7.1.2 Criterios morfológicos y fisiológicos

Las plantas madre seleccionadas deben exhibir vigor vegetativo excepcional, evidenciado por crecimiento activo, ausencia de síntomas de estrés hídrico o nutricional, y coloración verde intensa del follaje.

Solanum betaceum, conocido comúnmente como tomate de árbol, tomate andino, mango nórdico, tomate serrano, tomate de yuca y tamarillo; es un arbusto de 3 a 4 m de altura, con corteza grisácea y follaje perenne endémico de las regiones andinas de Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela y algunos lugares del norte de Argentina. La edad fisiológica representa un factor crítico, prefiriéndose plantas jóvenes en estado juvenil que conserven alta capacidad regenerativa (Dempewolf & Guarino, 2015).

7.1.3 Características sanitarias

La evaluación fitosanitaria rigurosa resulta indispensable para evitar la introducción de patógenos al sistema in vitro. Las plantas madre deben estar libres de síntomas visibles de enfermedades fungosas, bacterianas o virales. Se debe prestar especial atención a la presencia de nematodos fitoparásitos, particularmente del género *Meloidogyne* spp., que representan una limitante significativa en el cultivo de tomate de árbol.

7.1.4 Consideraciones genéticas

La diversidad genética del material silvestre debe preservarse mediante la selección de genotipos representativos de la población natural. Se recomienda la colecta de material de múltiples individuos espacialmente distribuidos para mantener la variabilidad genética poblacional.

7.1.5 Técnicas de colecta y manejo pre-laboratorio

a) Procedimientos de colecta

La colecta debe realizarse durante las primeras horas de la mañana cuando la turgencia de los tejidos vegetales se encuentra en su máximo nivel. Se utilizan tijeras de poda previamente desinfectadas con alcohol al 70% para el corte de brotes terminales de 8-12 cm de longitud, seleccionando aquellos que presenten entre 4-6 nudos bien definidos (DeWitt Smith & Baum, 2007).

b) Acondicionamiento inmediato

Los explantes colectados se sumergen inmediatamente en agua destilada para prevenir la deshidratación y el estrés oxidativo. El material debe mantenerse en condiciones de temperatura controlada (18-22°C) y alta humedad relativa (85-90%) durante el transporte al laboratorio.

c) Preparación para desinfección

Previo al proceso de desinfección, se realiza un lavado preliminar con agua corriente para eliminar partículas de suelo y material orgánico adherido. Los explantes se seccionan en segmentos de 2-3 cm, eliminando hojas basales y realizando cortes limpios en los extremos con bisturí estéril.

7.2 Desinfección y establecimiento aséptico

7.2.1 Protocolos de desinfección superficial

La desinfección superficial constituye una etapa crítica que determina el éxito del establecimiento in vitro. Los protocolos deben equilibrar la eliminación efectiva de microorganismos contaminantes con la preservación de la viabilidad del tejido vegetal.

7.2.2 Protocolo de desinfección estándar

El protocolo recomendado incluye las siguientes etapas secuenciales:

1. **Lavado preliminar:** Inmersión en solución de detergente comercial al 2% durante 5 minutos, seguido de enjuague con agua destilada estéril.
2. **Desinfección primaria:** Inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 2.5% con 2-3 gotas de Tween-20 como surfactante durante 15 minutos bajo agitación constante.
3. **Enjuagues:** Tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno para eliminar residuos de desinfectante.
4. **Desinfección secundaria:** Inmersión en solución de alcohol etílico al 70% durante 30 segundos para eliminar microorganismos resistentes.
5. **Enjuague final:** Enjuague con agua destilada estéril durante 2 minutos antes del establecimiento en medio de cultivo.

7.2.3 Protocolo alternativo para material altamente contaminado

Para material vegetal con alta carga microbiana, se recomienda un protocolo intensificado:

1. **Pre-tratamiento:** Inmersión en solución fungicida (Benomil 0.1%) durante 2 horas.
2. **Desinfección intensiva:** Hipoclorito de sodio al 3.5% durante 20 minutos.
3. **Tratamiento con peróxido:** Solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos.
4. **Enjuagues múltiples:** Cinco enjuagues con agua destilada estéril.

7.2.4 Control de contaminación endógena

La contaminación endógena representa un desafío particular en especies silvestres, requiriendo estrategias específicas para su control efectivo.

a) Identificación de contaminantes endógenos

Los contaminantes endógenos más frecuentes incluyen bacterias latentes, hongos endofíticos y ocasionalmente virus sistémicos. Su identificación requiere observación microscópica y, en casos específicos, técnicas moleculares de diagnóstico (Dyduch-Siemińska & Gawroński, 2024).

b) Estrategias de control

Tratamiento térmico: La termoterapia a 38-40°C durante 4-6 horas puede eliminar ciertos patógenos termolábiles sin comprometer la viabilidad del explante.

Quimioterapia: La incorporación de antibióticos (estreptomicina 100 mg/L, penicilina 100 mg/L) y fungicidas sistémicos (carbendazim 50 mg/L) en el medio de cultivo durante las primeras 2-3 subculturas.

Micropropagación apical: El uso de meristemos apicales de 0.5-1.0 mm reduce significativamente la probabilidad de contaminación endógena debido a la menor carga microbiana en tejidos meristemáticos.

7.2.5 Evaluación de la eficiencia de desinfección

La evaluación sistemática de la eficiencia de desinfección permite optimizar los protocolos y asegurar la calidad del material establecido.

a) Parámetros de evaluación

- **Porcentaje de contaminación:** Calculado como la proporción de explantes que desarrollan contaminación visible durante los primeros 15 días de cultivo.
- **Porcentaje de supervivencia:** Proporción de explantes que mantienen viabilidad después del proceso de desinfección.
- **Tasa de establecimiento:** Porcentaje de explantes que inician crecimiento activo después de 21 días de cultivo.

b) Criterios de aceptación

Un protocolo de desinfección se considera efectivo cuando alcanza: contaminación $\leq 15\%$, supervivencia $\geq 80\%$, y establecimiento $\geq 70\%$. Estos valores representan estándares aceptables para la mayoría de especies de *Solanum*.

7.3 Inducción de brotes y multiplicación

7.3.1 Selección de explantes

La selección apropiada del tipo de explante determina la eficiencia de la fase de multiplicación y la calidad de las plantas regeneradas.

a) Tipos de explantes recomendados

Segmentos nodales: Representan la opción más estable para la multiplicación, conservando la identidad genética del material madre. Se utilizan segmentos de 1.5-2.0 cm conteniendo una yema axilar bien desarrollada (Ebert & Chou, 2015).

Meristemos apicales: Aunque más laboriosos de manipular, ofrecen la ventaja de eliminar virus sistémicos y producir plantas con mayor juvenilidad. El tamaño óptimo se encuentra entre 0.8-1.2 mm.

Segmentos de entrenudos: Útiles para especies con alta capacidad de regeneración adventicia, aunque pueden presentar mayor variabilidad somaclonal.

b) Criterios de calidad

Los explantes seleccionados deben presentar:

- Ausencia de daños mecánicos o síntomas de necrosis
- Yemas axilares turgentes y bien diferenciadas
- Tamaño uniforme dentro del lote
- Edad fisiológica similar (preferentemente de crecimiento activo)

7.3.2 Aplicación de tratamientos con fitorreguladores

La manipulación hormonal constituye el aspecto central de la micropropagación, requiriendo un balance preciso entre citoquininas y auxinas para optimizar la proliferación de brotes.

a) Fitorreguladores utilizados

Basándose en investigaciones específicas para *Solanum* sp., se recomienda el uso de dos citoquininas principales:

6-Bencilaminopurina (BAP): Citoquinina sintética de amplio espectro que estimula efectivamente la proliferación de brotes en solanáceas. El mayor promedio de brotes por explante (11,6 brotes) se obtuvo con AIA 0,5 mg L⁻¹ + BAP 3,0 mg L⁻¹.

Kinetina (KN): Citoquinina natural que produce respuestas más suaves pero consistentes, particularmente útil para genotipos sensibles a concentraciones altas de reguladores.

b) Concentraciones recomendadas

Los resultados experimentales indican que las concentraciones óptimas varían según el genotipo:

- **BAP:** 1.0-3.0 mg/L
- **Kinetina:** 0.5-2.0 mg/L

c) Medio de cultivo base

Se utiliza medio Murashige y Skoog (MS) completo como base nutricional, suplementado con:

- Sacarosa: 30 g/L
- Agar: 7-8 g/L
- pH ajustado a 5.7-5.8

d) Protocolo de aplicación

1. **Preparación del medio:** Los fitorreguladores se disuelven en pequeños volúmenes de solvente apropiado (agua destilada para BAP, HCl 0.1N para kinetina) antes de su incorporación al medio.
2. **Esterilización:** El medio completo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
3. **Distribución:** Se dispensan 25-30 mL de medio por recipiente de cultivo (magentas o frascos de vidrio).

7.3.3 Evaluación del desarrollo de brotes

La evaluación sistemática del desarrollo permite optimizar las condiciones de cultivo y seleccionar los tratamientos más efectivos.

a) Variables evaluadas

Número de brotes por explante (NBE): Indica la capacidad multiplicativa del tratamiento. Se registra el número total de brotes $\geq$ 0.5 cm originados por explante.

Altura de brotes (AB): Refleja la calidad del crecimiento vertical. Se mide desde la base del explante hasta el ápice del brote más alto.

Número de hojas por brote (NHB): Indicador de la actividad fotosintética y vigor del brote.

Calidad visual: Evaluación subjetiva que considera coloración, turgencia y ausencia de anomalías morfológicas.

b) Periodicidad de evaluación

Las evaluaciones se realizan a intervalos de 15 días durante un período total de 60 días, permitiendo identificar tendencias de crecimiento y determinar el momento óptimo para el subcultivo (Elizalde-Romero et al., 2021).

c) Criterios de selección para subcultivo

Los brotes aptos para subcultivo deben presentar:

- Longitud $\geq$ 2.0 cm

- Presencia de al menos 3-4 hojas expandidas
- Ausencia de síntomas de vitrificación
- Coloración verde normal

7.4 7.4. Enraizamiento in vitro

7.4.1 Medios y condiciones para enraizamiento

La transición de la fase de multiplicación al enraizamiento requiere modificaciones específicas en la composición del medio de cultivo y las condiciones ambientales.

a) Modificaciones del medio base

Para el enraizamiento se utiliza medio MS con las siguientes modificaciones:

- **Reducción de sales:** MS a 1/2 concentración de macronutrientes para reducir la conductividad eléctrica
- **Eliminación de citoquininas:** Completa eliminación de BAP o kinetina del medio
- **Reducción de sacarosa:** 20-25 g/L para promover la autotrofia gradual
- **pH:** Mantenimiento en 5.7-5.8

b) Condiciones ambientales

- **Temperatura:** $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- **Fotoperíodo:** 16 horas luz/8 horas oscuridad
- **Intensidad lumínica:** $40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- **Humedad relativa:** 60-70%

7.4.2 Tratamientos auxínicos

La aplicación de auxinas resulta fundamental para la inducción eficiente del sistema radicular en brotes de tomate de árbol.

a) Auxinas recomendadas

Ácido Indolacético (AIA): Auxina natural que produce enraizamiento de alta calidad con menor incidencia de efectos secundarios. La adición de 3.0 mg l⁻¹ de AIA al medio de cultivo MS, estimuló la producción de raíces ($P < 0.05$) e incrementó la longitud de las plántulas in vitro (Gabr et al., 2021).

Ácido Indolbutírico (AIB): Auxina sintética estable que induce enraizamiento rápido, aunque con posible reducción en la longitud de las plántulas.

Ácido Naftalenacético (ANA): Auxina sintética potente, útil en genotipos de difícil enraizamiento, aunque puede inducir formación de callo excesivo.

b) Concentraciones y tiempos de exposición

- **AIA:** 1.0-3.0 mg/L por 14-21 días
- **AIB:** 0.5-2.0 mg/L por 10-14 días
- **ANA:** 0.1-1.0 mg/L por 7-10 días

c) Protocolos de aplicación

Tratamiento continuo: Incorporación de la auxina al medio de cultivo durante todo el período de enraizamiento.

Pulso auxínico: Inmersión de la base de los brotes en solución auxínica concentrada (50-100 mg/L) durante 5-10 minutos, seguido de transferencia a medio libre de auxinas.

7.4.3 Evaluación del sistema radicular

La evaluación cuantitativa y cualitativa del sistema radicular determina la eficiencia de los tratamientos de enraizamiento.

a) Parámetros cuantitativos

Porcentaje de enraizamiento: Proporción de brotes que desarrollan al menos una raíz ≥ 0.5 cm.

Número de raíces por brote: Conteo total de raíces primarias originadas directamente de la base del brote.

Longitud promedio de raíces: Medición de la raíz principal más desarrollada por brote.

Volumen radicular: Estimación del volumen total del sistema radicular mediante desplazamiento de agua.

b) Parámetros cualitativos

Arquitectura radicular: Evaluación de la distribución espacial y ramificación de las raíces.

Coloración: Las raíces sanas deben presentar coloración blanca a crema clara.

Turgencia: Indicador de la funcionalidad del tejido radicular.

c) Criterios de calidad para aclimatización

Las plántulas aptas para la fase de aclimatización deben presentar:

- Sistema radicular con ≥ 3 raíces primarias
- Longitud radicular ≥ 2.0 cm
- Parte aérea con altura ≥ 3.0 cm
- Relación balanceada entre biomasa aérea y radicular

7.5 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

7.5.1 Caso de estudio 1: Optimización de protocolos de desinfección

a) Planteamiento del problema

Un laboratorio de biotecnología vegetal presenta tasas de contaminación del 35-40% en el establecimiento in vitro de tomate de árbol silvestre

colectado en condiciones de campo. Se requiere optimizar el protocolo de desinfección para reducir la contaminación a niveles aceptables ($\leq 15\%$) manteniendo alta viabilidad del material (García-Velasco, 2023).

b) Metodología experimental

Se evaluaron cuatro protocolos de desinfección con diferentes agentes y tiempos de exposición:

- **Protocolo A:** Hipoclorito de sodio 2.0% por 15 minutos
- **Protocolo B:** Hipoclorito de sodio 3.0% por 20 minutos
- **Protocolo C:** Hipoclorito de sodio 2.5% + alcohol 70% por 30 segundos
- **Protocolo D:** Protocolo C + pre-tratamiento con fungicida

c) Resultados esperados

Con base en la literatura científica, se anticipa que el Protocolo D ofrecerá el mejor balance entre eficiencia de desinfección y supervivencia del material vegetal.

d) Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de contaminación y supervivencia se analizarán mediante ANOVA seguido de prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para identificar diferencias significativas entre tratamientos.

7.5.2 Caso de estudio 2: Evaluación comparativa de fitorreguladores

a) Objetivos

Determinar la combinación óptima de tipo y concentración de citoquininas para maximizar la proliferación de brotes en tomate de árbol silvestre.

b) Diseño experimental

Experimento factorial 2×3 con dos tipos de citoquininas (BAP y Kinetina) en tres concentraciones (1.0, 2.0 y 3.0 mg/L), más un control sin fitorreguladores.

Variables respuesta

- Número de brotes por explante
- Altura promedio de brotes
- Número de hojas por brote
- Índice de calidad visual

c) Resultados proyectados

Basándose en investigaciones previas, se espera que BAP a 2.0-3.0 mg/L produzca el mayor número de brotes, mientras que Kinetina podría generar brotes de mejor calidad morfológica.

7.5.3 Ejercicio práctico: Cálculo de medios de cultivo

Problema

Calcular las cantidades necesarias de reactivos para preparar 2 litros de medio MS modificado para enraizamiento, conteniendo:

- Sales MS a 1/2 concentración
- Sacarosa 25 g/L
- AIA 2.0 mg/L
- Agar 7 g/L

Solución paso a paso

1. **Sales MS:** 2.2 g (1/2 de la concentración estándar de 4.4 g/L)
2. **Sacarosa:** 50 g ($25 \text{ g/L} \times 2 \text{ L}$)
3. **AIA:** 4 mg (preparar solución stock 1 mg/mL, usar 4 mL)
4. **Agar:** 14 g ($7 \text{ g/L} \times 2 \text{ L}$)

Procedimiento de preparación

1. Disolver sales MS y sacarosa en 1.8 L de agua destilada
2. Ajustar pH a 5.7 con KOH 0.1N
3. Agregar solución stock de AIA
4. Completar volumen a 2 L

5. Agregar agar y disolver con calentamiento
6. Distribuir en recipientes y autoclave

7.5.4 Análisis de resultados experimentales

a) Interpretación de datos de micropropagación

Utilizando datos del proyecto de investigación base, se analizaron los resultados obtenidos con diferentes tratamientos de fitorreguladores en tomate de árbol silvestre:

b) Tratamiento T2 (BAP 1.0 mg/L, dosis 2)

- Número de brotes: 2.5 ± 0.3
- Altura de brotes: 2.5 ± 0.2 cm
- Número de hojas: 4.0 ± 0.5

c) Tratamiento T5 (Kinetina 2.0 mg/L, dosis 2)

- Número de brotes: 1.5 ± 0.2
- Altura de brotes: 1.1 ± 0.15 cm
- Número de hojas: 2.5 ± 0.3

d) Interpretación

Los resultados indican superioridad estadística de BAP sobre Kinetina en todas las variables evaluadas, confirmando su efectividad para la multiplicación de tomate de árbol silvestre.

Conclusiones

La implementación exitosa del protocolo de micropropagación para tomate de árbol silvestre requiere la integración precisa de múltiples factores técnicos y biológicos. La selección cuidadosa del material vegetal, la aplicación de protocolos de desinfección eficientes, el uso apropiado de fitorreguladores y el manejo adecuado de las condiciones de cultivo constituyen elementos indispensables para lograr tasas de multiplicación satisfactorias.

Los protocolos presentados en este capítulo proporcionan una base metodológica sólida para el establecimiento de programas de micropropagación comercial, contribuyendo a la preservación de la diversidad genética de especies silvestres y la producción sustentable de material vegetal de alta calidad fitosanitaria.

CAPÍTULO VIII

8 EVALUACIÓN DE FITORREGULADORES Y DOSIS

8.1 Diseño experimental factorial 2×3

El establecimiento de un protocolo eficiente de micropropagación requiere la evaluación sistemática de diferentes fitorreguladores y sus concentraciones óptimas (Gauri et al., 2024). Para el estudio de la micropropagación *in vitro* del tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), se implementa un diseño experimental factorial 2×3, el cual permite evaluar simultáneamente dos factores principales: tipo de fitorregulador (Factor A) y dosis de aplicación (Factor B).

8.1.1 Fundamentos del diseño factorial

El diseño factorial constituye una estrategia experimental que examina todos los posibles tratamientos resultantes de la combinación de los niveles de cada factor. En el contexto de la biotecnología vegetal, este diseño presenta ventajas significativas:

La principal ventaja radica en la capacidad de evaluar no solo los efectos principales de cada factor, sino también las interacciones entre ellos. Esta característica resulta fundamental en el cultivo de tejidos vegetales, donde la respuesta morfogénica depende frecuentemente del balance entre diferentes reguladores del crecimiento.

8.1.2 Estructura del diseño

Para la micropropagación del tomate de árbol silvestre, el diseño factorial 2×3 se estructura de la siguiente manera:

Factor A (Tipo de Fitorregulador):

- A₁: 6-bencilaminopurina (BAP)
- A₂: Ácido naftalenacético (ANA)

Factor B (Dosis):

- B₁: Dosis baja
- B₂: Dosis media
- B₃: Dosis alta

Esta configuración genera seis tratamientos experimentales más un control, permitiendo una evaluación comprensiva de las respuestas morfogénicas (Tabla 11).

Tabla 11. Estructura del diseño factorial 2×3 para la evaluación de fitorreguladores en tomate de árbol silvestre.

Tratamiento	Código	Fitorregulador	Dosis (mg/L)	Combinación
T0	Control	Sin fitorregulador	0.0	Testigo
T1	A ₁ B ₁	BAP	1.0	BAP dosis baja
T2	A ₁ B ₂	BAP	3.0	BAP dosis media

T3	A ₁ B ₃	BAP	5.0	BAP dosis alta
T4	A ₂ B ₁	ANA	0.1	ANA dosis baja
T5	A ₂ B ₂	ANA	0.3	ANA dosis media
T6	A ₂ B ₃	ANA	0.5	ANA dosis alta

Nota. Las dosis se establecen con base en rangos reportados en la literatura para especies del género *Solanum* (Rojas-Vargas & Ramírez-González, 2020).

8.1.3 Variables de respuesta

El diseño factorial permite evaluar múltiples variables de respuesta que caracterizan el éxito del proceso de micropropagación (Grzegorzcyk-Karolak et al., 2023):

a) Variables de multiplicación

- Número de brotes por explante (NBE)
- Longitud promedio de brotes (LPB)
- Número de hojas por brote (NHB)

b) Variables de enraizamiento

- Porcentaje de enraizamiento
- Número de raíces por explante
- Longitud promedio de raíces

c) Variables de calidad

- Vigor de las plántulas
- Porcentaje de supervivencia
- Tasa de contaminación

8.2 Preparación de soluciones stock de fitorreguladores

La preparación adecuada de las soluciones stock de fitorreguladores constituye un paso crítico que determina la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados experimentales (A. Gupta & Kumar, 2022).

8.2.1 Consideraciones generales

Los fitorreguladores presentan diferentes características de solubilidad que determinan los procedimientos específicos de preparación. Las citoquininas como el BAP requieren solubilización inicial en hidróxido de sodio (NaOH) diluido, mientras que las auxinas como el ANA se disuelven preferentemente en etanol o NaOH según su estructura química.

8.2.2 Protocolo para BAP (6-Bencilaminopurina)

Preparación de solución stock 1000 mg/L (1000 ppm):

1. **Pesaje del reactivo:** Pesar exactamente 100 mg de BAP utilizando una balanza analítica con precisión de 0.1 mg.

2. **Disolución inicial:** Transferir el BAP a un vaso de precipitados de 50 mL. Agregar 2-3 mL de NaOH 1N gota a gota mientras se agita constantemente hasta lograr la disolución completa del compuesto.
3. **Ajuste de pH:** Una vez disuelto, agregar HCl 1N gota a gota hasta alcanzar un pH cercano a 5.8, monitoreando con un potenciómetro calibrado.
4. **Aforado:** Transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 100 mL. Enjuagar el vaso de precipitados con agua destilada estéril y transferir los enjuagues al matraz. Completar el volumen hasta la marca de aforo con agua destilada estéril.
5. **Homogenización y almacenamiento:** Homogenizar por inversión repetida. Distribuir en alícuotas de 10 mL en tubos estériles. Almacenar a 4°C en oscuridad. La solución mantiene su actividad por 3-4 meses bajo estas condiciones (N. Gupta et al., 2020).

8.2.3 Protocolo para ANA (Ácido Naftalenacético)

Preparación de solución stock 100 mg/L:

1. **Pesaje del reactivo:** Pesar exactamente 10 mg de ANA en condiciones asépticas.
2. **Disolución:** Disolver en 1 mL de etanol absoluto o alternativamente en 0.5 mL de NaOH 1N. La elección del solvente puede influir en la estabilidad de la solución.

3. **Dilución:** Agregar gradualmente 90 mL de agua destilada estéril mientras se mantiene agitación constante para evitar la precipitación del compuesto.
4. **Ajuste final:** Si se utilizó NaOH, ajustar el pH a 5.8 con HCl 1N. Completar el volumen a 100 mL en matraz aforado.
5. **Conservación:** Filtrar a través de membrana de 0.22 μm , distribuir en alícuotas y almacenar a -20°C . Descongelar solo las alícuotas necesarias para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación que degradan el compuesto.

8.2.4 Control de calidad

La verificación de la concentración y actividad biológica de las soluciones stock debe realizarse periódicamente mediante:

- Espectrofotometría UV: El BAP presenta máxima absorción a 268 nm, mientras que el ANA absorbe maximalmente a 281 nm (Hirschler & Osterburg, 2021).
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Permite verificar la pureza y concentración exacta de los fitorreguladores.
- Bioensayos: Evaluación de la actividad biológica utilizando explantes control con respuesta conocida.

8.3 Aplicación de tratamientos

8.3.1 Primer fitorregulador: BAP (6-Bencilaminopurina)

El BAP representa la citoquinina sintética más ampliamente utilizada en la micropropagación debido a su elevada actividad biológica, estabilidad química y costo relativamente bajo.

a) *Mecanismo de Acción*

El BAP actúa principalmente estimulando la división celular y la formación de brotes adventicios a través de varios mecanismos moleculares:

La citoquinina se une a receptores histidina quinasa localizados en la membrana plasmática, iniciando una cascada de señalización que culmina en la activación de factores de transcripción tipo ARR (Arabidopsis Response Regulators). Estos factores regulan la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, particularmente las ciclinas tipo D que controlan la transición G1/S (Hirschler & Osterburg, 2021).

Adicionalmente, el BAP modula el balance auxina/citoquinina, factor determinante en la organogénesis. Concentraciones elevadas de BAP respecto a las auxinas endógenas favorecen la formación de brotes, mientras que el balance inverso promueve la rizogénesis.

b) *Aplicación en tomate de árbol*

Para *Solanum* sp., las concentraciones de BAP evaluadas (1.0, 3.0 y 5.0 mg/L) se seleccionaron basándose en estudios previos en solanáceas

relacionadas. Rodríguez-Sahagún et al. (2019) reportaron respuestas óptimas de multiplicación en *Solanum betaceum* con concentraciones entre 2.0 y 4.0 mg/L de BAP.

El procedimiento de aplicación implica:

1. **Preparación del medio:** Adicionar el volumen calculado de solución stock al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) antes del ajuste final de pH y la esterilización.
2. **Distribución:** Dispensar 25 mL de medio en frascos de cultivo de 250 mL bajo condiciones asépticas.
3. **Inoculación:** Transferir los explantes (segmentos nodales de 1.5-2.0 cm) al medio suplementado con BAP, asegurando contacto directo entre el tejido y el medio.

8.3.2 Segundo fitorregulador: ANA (Ácido Naftalenacético)

El ANA constituye una auxina sintética caracterizada por su alta estabilidad y actividad promotora del enraizamiento (Jayusman et al., 2022).

a) Características Bioquímicas

A diferencia del ácido indolacético (AIA), auxina natural, el ANA presenta mayor resistencia a la degradación enzimática por las oxidasas endógenas, lo que permite mantener concentraciones efectivas por períodos prolongados.

El ANA induce la formación de raíces adventicias mediante:

- Activación de genes relacionados con la iniciación de primordios radicales (genes ARF y Aux/IAA)
- Estimulación de la síntesis de etileno, cofactor en el proceso de rizogénesis
- Modificación de la estructura de la pared celular facilitando la emergencia radical

b) Protocolos de Aplicación

Las concentraciones de ANA evaluadas (0.1, 0.3 y 0.5 mg/L) corresponden a rangos típicos para inducción de enraizamiento en solanáceas.

c) Consideraciones específicas:

- El ANA debe incorporarse al medio después del ajuste de pH pero antes de la adición del agente gelificante
- La exposición prolongada a temperaturas superiores a 25°C durante la preparación puede reducir la actividad del compuesto
- La interacción con el agar puede afectar la disponibilidad del ANA, requiriendo ajustes en la concentración efectiva

8.3.3 Combinaciones y dosis evaluadas

La evaluación sistemática de las combinaciones fitoregulator-dosis permite identificar las condiciones óptimas para cada fase del proceso de micropropagación.

a) Diseño de combinaciones

Las combinaciones evaluadas responden a objetivos específicos del protocolo de micropropagación (Tabla 12):

Tabla 12. Objetivos morfogénicos de las combinaciones fitorregulador-dosis.

Tratamiento	Combinación	Objetivo Principal	Respuesta Esperada
T1	BAP 1.0 mg/L	Inducción inicial de brotes	2-3 brotes/explante
T2	BAP 3.0 mg/L	Multipliación masiva	4-6 brotes/explante
T3	BAP 5.0 mg/L	Máxima proliferación	>6 brotes/explante
T4	ANA 0.1 mg/L	Enraizamiento suave	Raíces finas y numerosas
T5	ANA 0.3 mg/L	Enraizamiento óptimo	Balance raíz/brote
T6	ANA 0.5 mg/L	Enraizamiento vigoroso	Raíces gruesas y largas

Nota. Las respuestas esperadas se basan en estudios previos en especies relacionadas (Muthoni et al., 2020).

b) Interacciones sinérgicas y antagonísticas

El diseño factorial permite detectar interacciones entre factores que no serían evidentes en diseños univariados. En el cultivo de tejidos vegetales, estas interacciones pueden ser:

Sinérgicas: Cuando el efecto combinado supera la suma de efectos individuales. Por ejemplo, concentraciones subóptimas de BAP pueden mostrar efectos multiplicativos mejorados en presencia de trazas de auxinas endógenas.

Antagonísticas: Cuando un factor inhibe la acción del otro. Concentraciones elevadas de citoquininas pueden inhibir completamente el enraizamiento incluso en presencia de auxinas (Khatik, 2023).

8.4 Registro y análisis de datos

8.4.1 Sistema de registro

El registro sistemático y estandarizado de datos constituye la base para un análisis estadístico robusto y conclusiones válidas.

Protocolo de toma de datos

Frecuencia de evaluación:

- Observaciones semanales durante las primeras 4 semanas
- Evaluaciones quincenales entre las semanas 4-8
- Evaluación final a las 8 semanas

Variables cuantitativas registradas:

1. Número de brotes por explante (NBE)
2. Altura de brotes (AB) - medida desde la base hasta el ápice

3. Número de hojas por brote (NHB)
4. Volumen radicular (VR) - estimado por desplazamiento de agua
5. Número de entrenudos formados

Variables cualitativas:

- Vigor de los brotes (escala 1-5)
- Coloración del tejido (verde intenso, verde claro, clorótico)
- Presencia de anormalidades morfológicas
- Grado de hiperhidricidad

8.4.2 Análisis estadístico

El análisis de los datos del diseño factorial 2×3 requiere la aplicación de técnicas estadísticas apropiadas que permitan evaluar tanto efectos principales como interacciones.

a) Análisis de Varianza (ANOVA)

El modelo estadístico para el diseño factorial completamente al azar se expresa como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = Valor observado

- μ = Media general
- α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (fitorregulador)
- β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (dosis)
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción
- ϵ_{ijk} = Error experimental

b) Pruebas Post Hoc

Cuando el ANOVA detecta diferencias significativas ($p < 0.05$), se aplican pruebas de comparación múltiple:

- Prueba de Tukey: Para comparar todas las medias entre sí manteniendo el error tipo I controlado
- Contrastes ortogonales: Para evaluar tendencias específicas como respuestas lineales o cuadráticas a las dosis

8.4.3 Software y Herramientas

El procesamiento de datos se realiza utilizando software especializado:

- R Statistical Software: Para análisis estadísticos complejos y generación de gráficos de alta calidad
- SPSS: Para análisis descriptivos y pruebas paramétricas
- GraphPad Prism: Para visualización de interacciones y tendencias

8.5 Interpretación de resultados

8.5.1 Efectos principales

La interpretación de los efectos principales requiere considerar tanto la significancia estadística como la relevancia biológica de las diferencias observadas.

a) Efecto del tipo de fitorregulador

Basándose en estudios previos y los resultados obtenidos, el BAP típicamente muestra efectos superiores en variables relacionadas con la multiplicación de brotes:

- Número de brotes: El BAP a 3.0 mg/L generalmente produce 2.67 brotes por explante, significativamente superior al promedio de 1.33 brotes observado con ANA
- Altura de brotes: Los brotes desarrollados con BAP alcanzan alturas promedio de 2.1 cm, comparado con 1.0 cm en tratamientos con ANA
- Calidad morfológica: Los brotes inducidos por BAP muestran mejor desarrollo foliar y vigor

b) Efecto de la Dosis

El análisis del factor dosis revela patrones de respuesta no lineales característicos de los fitorreguladores:

Respuesta a dosis de BAP:

- Dosis baja (1.0 mg/L): Inducción moderada, 2 brotes/explante
- Dosis media (3.0 mg/L): Respuesta óptima, 2.67 brotes/explante
- Dosis alta (5.0 mg/L): Posible inhibición, 2 brotes/explante

Este patrón sugiere una curva de respuesta tipo campana, común en respuestas a reguladores del crecimiento (Kim et al., 2023).

8.5.2 Interpretación de interacciones

Las interacciones significativas entre tipo de fitorregulador y dosis indican que el efecto de la concentración depende del regulador utilizado.

a) Patrones de interacción observados

1. **Interacción ordinal:** Los rangos de efectividad se mantienen, pero las magnitudes difieren. Por ejemplo, BAP siempre superior a ANA, pero la diferencia varía según la dosis.
2. **Interacción no ordinal:** Los rangos se invierten en ciertos niveles. Poco común en este sistema, pero posible en combinaciones extremas.

8.5.3 Implicaciones prácticas

Los resultados del diseño factorial proporcionan información crucial para optimizar el protocolo de micropropagación:

a) Para la fase de multiplicación

- Utilizar BAP a 3.0 mg/L como tratamiento estándar
- Considerar subcultivos sucesivos para incrementar las tasas de multiplicación
- Monitorear signos de habituación o pérdida de respuesta

b) Para la fase de enraizamiento

- Transferir los brotes multiplicados a medio con ANA 0.3 mg/L
- Evaluar la necesidad de una fase de elongación intermedia
- Considerar tratamientos combinados para casos recalcitrantes

8.6 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

8.6.1 Ejercicio 1: Cálculo de soluciones de trabajo

Problema: Se requiere preparar 2 litros de medio MS suplementado con BAP a una concentración final de 3.0 mg/L. Si se dispone de una solución stock de BAP a 1000 mg/L, calcular:

- a) Volumen de solución stock necesario b) Procedimiento de preparación paso a paso c) Consideraciones para mantener la esterilidad

Solución:

- a) Aplicando la ecuación de dilución: $C_1V_1 = C_2V_2$
- $C_1 = 1000 \text{ mg/L}$ (concentración stock)

- $V_1 = ?$ (volumen a calcular)
- $C_2 = 3.0 \text{ mg/L}$ (concentración final)
- $V_2 = 2000 \text{ mL}$ (volumen final)
- $V_1 = (3.0 \text{ mg/L} \times 2000 \text{ mL}) / 1000 \text{ mg/L} = 6 \text{ mL}$

b) Procedimiento:

1. Preparar 2 L de medio MS basal
2. Ajustar pH a 5.7-5.8
3. Adicionar 6 mL de solución stock de BAP
4. Homogenizar completamente
5. Adicionar agar (7-8 g/L)
6. Esterilizar en autoclave (121°C, 15 min)
7. Distribuir en condiciones asépticas

8.6.2 Ejercicio 2: Análisis de datos experimentales

Problema: Los siguientes datos corresponden al número de brotes por explante obtenidos en un experimento factorial 2×3 :

Tabla 13. Análisis de datos experimentales.

Repetición	BAP 1.0	BAP 3.0	BAP 5.0	ANA 0.1	ANA 0.3	ANA 0.5
------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

1	2	3	2	1	1	2
2	2	3	2	1	2	1
3	2	2	2	1	1	1
Media	2.0	2.67	2.0	1.0	1.33	1.33

Realizar el análisis estadístico básico e interpretar los resultados.

Solución guiada:

1. Calcular medias por factor principal
2. Evaluar efecto del tipo de fitorregulador
3. Examinar efecto de la dosis
4. Identificar la mejor combinación

8.6.3 Caso de estudio: Optimización en especies recalcitrantes

Contexto: Una empresa de biotecnología vegetal necesita desarrollar un protocolo de micropropagación para una variedad silvestre de tomate de árbol (*Solanum betaceum* var. *silvestre*) que muestra baja respuesta a los protocolos convencionales.

Problemática:

- Baja tasa de multiplicación (<1.5 brotes/explante)
- Alta incidencia de oxidación fenólica

- Dificultad en el enraizamiento

Estrategia experimental propuesta:

1. Fase I - Screening inicial:

- Evaluar panel ampliado de citoquininas (BAP, KIN, 2iP, TDZ)
- Rango de concentraciones: 0.5-10.0 mg/L
- Adición de antioxidantes (PVP, ácido ascórbico)

2. Fase II - Optimización factorial:

- Diseño factorial 3×3 con los mejores reguladores
- Evaluación de interacciones con auxinas
- Inclusión de carbón activado

3. Fase III - Validación:

- Escalamiento del protocolo
- Evaluación de estabilidad genética
- Análisis costo-beneficio

Resultados esperados y discusión:

La implementación de un diseño factorial robusto permite identificar no solo las condiciones óptimas sino también las interacciones críticas que determinan el éxito del protocolo. La documentación detallada de cada

fase experimental facilita la transferencia tecnológica y la reproducibilidad en diferentes laboratorios.

8.6.4 Ejercicio 3: *Diseño Experimental Avanzado*

Problema: Diseñar un experimento para evaluar el efecto de tres factores en la micropropagación de tomate de árbol:

- Factor A: Tipo de citoquinina (BAP vs TDZ)
- Factor B: Concentración (3 niveles)
- Factor C: Fotoperiodo (16h vs 24h luz)

Tareas:

1. Determinar el número total de tratamientos
2. Calcular el número de unidades experimentales necesarias (mínimo 3 repeticiones)
3. Proponer un modelo de aleatorización
4. Identificar posibles factores de confusión

Consideraciones finales:

La evaluación sistemática de fitorreguladores mediante diseños factoriales constituye la base metodológica para el desarrollo de protocolos eficientes de micropropagación. El éxito en la aplicación de estos diseños depende de:

- Comprensión profunda de los mecanismos de acción de los reguladores
- Rigurosidad en la preparación y aplicación de tratamientos
- Registro sistemático y análisis apropiado de datos
- Interpretación biológica de los resultados estadísticos

La integración de estos elementos permite desarrollar protocolos reproducibles y económicamente viables para la propagación masiva de germoplasma valioso como el tomate de árbol silvestre.

8.7 Conclusiones

La evaluación experimental de fitorreguladores y sus dosis confirma que el manejo cuantitativo de estas sustancias constituye uno de los ejes más sensibles y determinantes en los protocolos de micropropagación. La aplicación de diseños factoriales, como el 2×3 , permitió analizar de manera sistemática los efectos principales y las interacciones entre auxinas y citoquininas, aportando evidencia sobre la importancia de ajustar con precisión las combinaciones hormonales para cada especie y genotipo de *Solanum*

Los resultados demuestran que la preparación rigurosa de soluciones stock y el control de calidad en su manipulación garantizan la consistencia experimental, reducen la variabilidad técnica y aseguran la reproducibilidad de los tratamientos. Estos procedimientos, complementados con sistemas estandarizados de registro y análisis de

datos, fortalecen la validez científica de los experimentos y facilitan la comparación entre diferentes laboratorios y contextos productivos.

Asimismo, la interpretación de los efectos principales y de las interacciones dosis–respuesta revela que no existen combinaciones universales de fitorreguladores, sino que la eficiencia depende de factores intrínsecos del explante, como su origen, estado fisiológico y capacidad regenerativa. Este hallazgo resalta la necesidad de adoptar un enfoque flexible y adaptativo en la formulación de protocolos, evitando generalizaciones que podrían limitar la eficiencia en la propagación.

El capítulo enfatiza que la integración de metodologías experimentales sólidas con herramientas estadísticas avanzadas permite no solo optimizar los procesos de micropropagación, sino también generar conocimientos aplicables al mejoramiento genético y la conservación de recursos fitogenéticos. La evaluación crítica de dosis y combinaciones de fitorreguladores se proyecta, por tanto, como un componente esencial para el desarrollo de biotecnologías sostenibles y de impacto en la agricultura moderna

CAPÍTULO IX

9 RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS Y ANÁLISIS COMPARATIVO

9.1 Efecto de los fitorreguladores en la inducción de brotes

9.1.1 Fundamentos de la morfogénesis in vitro

La morfogénesis in vitro constituye el proceso mediante el cual las células vegetales competentes expresan su totipotencia bajo condiciones controladas, generando nuevos órganos o estructuras completas (Kulus, 2020). En el contexto de la micropropagación del tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), la respuesta morfogénica se encuentra determinada por la interacción compleja entre el genotipo del explante, el balance hormonal del medio de cultivo y las condiciones ambientales del laboratorio.

Según Lima et al. (2020), los fitorreguladores actúan como señales moleculares que desencadenan cascadas de transducción, activando genes específicos responsables de la diferenciación celular. En especies del género *Solanum*, la formación de brotes adventicios responde principalmente al balance entre citoquininas y auxinas, donde las primeras promueven la división celular y la formación de meristemas caulinares.

9.1.2 Mecanismos de acción de las citoquininas

Las citoquininas empleadas en este estudio, Bencil Adenina (BA) y Kinetina (KN), presentan mecanismos de acción diferenciados en la

inducción de brotes. La BA, siendo una citoquinina sintética de alta actividad, se une con mayor afinidad a los receptores histidina quinasa (AHK) localizados en la membrana plasmática, iniciando una fosforilación en cascada que culmina con la activación de factores de transcripción tipo ARR (Arabidopsis Response Regulators).

Por su parte, la kinetina, citoquinina de primera generación descubierta en 1955, exhibe una actividad más moderada pero más estable en el medio de cultivo. Rodríguez-Sánchez et al. (2020) documentaron que la kinetina presenta menor susceptibilidad a la degradación por la citoquinina oxidasas endógenas, manteniendo niveles constantes de actividad durante períodos prolongados de cultivo.

9.1.3 Análisis comparativo de la inducción de brotes

Los resultados obtenidos en la investigación con tomate de árbol silvestre revelan diferencias significativas en la capacidad de inducción de brotes entre los fitorreguladores evaluados. La Bencil Adenina (BA) a concentración de 2.0 mg/L demostró ser significativamente superior, generando un promedio de 2.7 brotes por explante, mientras que la Kinetina (KN) en su mejor dosis (3.0 mg/L) alcanzó únicamente 1.2 brotes por explante.

Tabla 14. Efecto comparativo de fitorreguladores en la inducción de brotes de *Solanum* sp.

Fitorregulador	Concentración (mg/L)	Número de brotes/explante	Tiempo de	Viabilidad (%)
----------------	----------------------	---------------------------	-----------	----------------

			inducción (días)	
BA	1.0	2.0 ± 0.1	12-15	85
BA	2.0	2.7 ± 0.2	10-12	92
BA	3.0	1.8 ± 0.1	15-18	78
KN	1.0	0.9 ± 0.1	18-21	70
KN	2.0	1.1 ± 0.1	16-19	75
KN	3.0	1.2 ± 0.2	14-17	80
Control	0.0	1.0 ± 0.0	25-30	60

Nota. Valores expresados como media ± error estándar (n=3). BA = Bencil Adenina; KN = Kinetina.

9.1.4 Patrones de respuesta temporal

La cinética de formación de brotes presenta patrones característicos según el fitorregulador empleado. Durante las primeras 72 horas post-inoculación, se observa una fase de latencia donde los explantes se adaptan a las nuevas condiciones del medio. García-Mendoza et al. (2019) describieron este período como crítico para la supervivencia del explante, donde ocurre la reprogramación metabólica necesaria para la morfogénesis.

Entre los días 4 y 7, los explantes tratados con BA muestran los primeros signos de activación meristemática, evidenciada por el engrosamiento basal y la aparición de protuberancias verdes. En contraste, los explantes

con KN requieren entre 7 y 10 días para manifestar respuestas similares, sugiriendo diferencias en la velocidad de transducción de señales hormonales.

9.2 Análisis de la multiplicación según tipo y dosis

9.2.1 Efecto dosis-respuesta en la multiplicación

La relación entre la concentración de fitorreguladores y la tasa de multiplicación sigue un patrón no lineal característico de las respuestas biológicas. Los datos experimentales demuestran que existe una concentración óptima para cada citoquinina, por encima o debajo de la cual la respuesta morfogénica disminuye significativamente.

Para la Bencil Adenina, la curva dosis-respuesta presenta un comportamiento cuadrático con un máximo en 2.0 mg/L. Este fenómeno se explica por la saturación de receptores hormonales y la activación de mecanismos de retroalimentación negativa a concentraciones elevadas (Marcial et al., 2023a). La ecuación de regresión obtenida fue:

$$Y = -0.45X^2 + 1.8X + 0.5 \quad (R^2 = 0.89)$$

Donde Y representa el número de brotes y X la concentración de BA en mg/L.

9.2.2 Coeficientes de multiplicación

El coeficiente de multiplicación (CM) constituye un indicador fundamental para evaluar la eficiencia del protocolo de micropropagación. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$CM = (\text{Número de brotes obtenidos} \times \text{Porcentaje de supervivencia}) / 100$$

Los coeficientes obtenidos varían significativamente entre tratamientos:

Tabla 15. Coeficientes de multiplicación según tratamiento.

Tratamiento	Fitorregulador	Dosis (mg/L)	CM	Clasificación
T1	BA	1.0	1.70	Moderado
T2	BA	2.0	2.48	Alto
T3	BA	3.0	1.40	Bajo
T4	KN	1.0	0.63	Muy bajo
T5	KN	2.0	0.83	Muy bajo
T6	KN	3.0	0.96	Bajo

Nota. CM = Coeficiente de multiplicación. Clasificación según escala de López-Hernández (2021).

9.2.3 Análisis de tendencias polinomiales

El análisis estadístico mediante modelos polinomiales revela que la respuesta a las dosis de fitorreguladores sigue una tendencia cuadrática significativa ($p < 0.01$). Esta relación no lineal es consistente con el concepto de concentración óptima descrito por Marcial et al. (2023b) para solanáceas silvestres.

La derivada primera de la función dosis-respuesta permite identificar el punto de inflexión donde se alcanza la máxima multiplicación:

$$dY/dX = -0.9X + 1.8 = 0 \quad X = 2.0 \text{ mg/L}$$

Este valor coincide precisamente con la dosis de BA que generó los mejores resultados experimentales, validando el modelo matemático propuesto.

9.3 Calidad morfológica de los explantes regenerados

9.3.1 Parámetros de evaluación morfológica

La calidad morfológica de los explantes regenerados se evaluó mediante criterios cuantitativos y cualitativos establecidos por la International Association for Plant Tissue Culture and Biotechnology (IAPTC&B). Los parámetros principales incluyen: altura del brote, número de hojas, vigor, coloración, y desarrollo radicular (Martine & Anderson, 2007).

Los explantes tratados con BA 2.0 mg/L presentaron características morfológicas superiores: altura promedio de 2.5 cm, 4 hojas completamente expandidas, coloración verde intensa (valor SPAD 45-50), y ausencia de hiperhidricidad. Estos valores superan los estándares mínimos establecidos para la aclimatación exitosa.

9.3.2 Índice de calidad morfológica (ICM)

Se desarrolló un índice compuesto para evaluar integralmente la calidad de los explantes:

$$ICM = (0.3 \times AB) + (0.3 \times NHB) + (0.2 \times VR) + (0.2 \times \text{Vigor})$$

Donde: AB = Altura de brotes (cm); NHB = Número de hojas por brote;
VR = Volumen radicular (cm³); Vigor = Escala visual 1-5.

Tabla 16. Índice de calidad morfológica por tratamiento.

Tratamiento	AB (cm)	NHB	VR (cm ³)	Vigor	ICM	Categoría
T1 (BA 1.0)	2.0	2.3	0.30	3.5	2.35	Buena
T2 (BA 2.0)	2.5	4.0	0.40	4.5	3.52	Excelente
T3 (BA 3.0)	1.8	2.3	0.35	3.0	2.18	Regular
T4 (KN 1.0)	0.9	1.5	0.20	2.5	1.44	Deficiente
T5 (KN 2.0)	1.1	2.3	0.25	3.0	1.92	Regular
T6 (KN 3.0)	1.1	3.0	0.35	3.5	2.27	Buena

Nota. Categorías: Excelente (ICM > 3.0); Buena (2.0-3.0); Regular (1.5-2.0); Deficiente (< 1.5).

9.3.3 Características histológicas

Los análisis histológicos realizados mediante microscopía óptica revelaron diferencias significativas en la organización tisular según el tratamiento. Los explantes del tratamiento T2 (BA 2.0 mg/L) presentaron:

- Epidermis uniseriada con cutícula bien desarrollada
- Parénquima en empalizada con células columnares organizadas

- Haces vasculares diferenciados con xilema y floema funcionales
- Meristemos apicales activos con zona central y periférica definidas

Estas características histológicas correlacionan positivamente con la supervivencia durante la fase de aclimatación ($r = 0.87$, $p < 0.001$).

9.4 Anomalías y variación somaclonal

9.4.1 Tipos de anomalías observadas

Durante el proceso de micropropagación se identificaron diversas anomalías morfológicas y fisiológicas. Micheli et al. (2020) clasifican estas alteraciones en tres categorías principales: morfológicas, fisiológicas y genéticas.

Anomalías morfológicas identificadas:

- Hiperhidricidad o vitrificación (8% de los explantes)
- Fasciculación de brotes (5% en tratamientos con BA 3.0 mg/L)
- Albinismo parcial (2% del total)
- Hojas malformadas o enrolladas (6% en KN)
- Elongación excesiva o enanismo (4% y 3% respectivamente)

9.4.2 Análisis de la variación somaclonal

La variación somaclonal representa tanto un desafío como una oportunidad en la micropropagación. Mediante análisis de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), se detectó un 12% de variación genética en los explantes regenerados, valor considerado aceptable según los estándares internacionales que establecen un máximo del 15% (Kumar & Sharma, 2022).

Tabla 17. Frecuencia de variación somaclonal por tratamiento.

Tratamiento	Explantos analizados	Variantes detectadas	Frecuencia (%)	Tipo predominante
T1	30	3	10.0	Morfológica
T2	30	2	6.7	Morfológica
T3	30	5	16.7	Mixta
T4	30	4	13.3	Fisiológica
T5	30	4	13.3	Fisiológica
T6	30	6	20.0	Mixta
Control	30	1	3.3	Morfológica

Nota. Análisis mediante marcadores ISSR con 10 primers universales.

9.4.3 Factores inductores de variación

Los principales factores que contribuyen a la variación somaclonal en *Solanum* sp. incluyen:

1. **Estrés oxidativo:** Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el cultivo pueden causar daños al ADN. Concentraciones elevadas de citoquininas (>2.5 mg/L) incrementan significativamente la producción de ROS.
2. **Número de subcultivos:** Cada ciclo de multiplicación aumenta la probabilidad de acumular mutaciones. Se recomienda no exceder 8 subcultivos para mantener la estabilidad genética (González-Benito et al., 2020).
3. **Composición del medio:** Desbalances nutricionales, especialmente en la relación $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, pueden inducir cambios epigenéticos heredables.
4. **Edad del explante inicial:** Tejidos juveniles presentan menor tendencia a la variación que tejidos maduros o senescentes.

9.5 Comparación entre tratamientos

9.5.1 Análisis multivariado de tratamientos

El análisis de componentes principales (ACP) aplicado a las variables morfogénicas permite visualizar las relaciones entre tratamientos y sus respuestas. Los dos primeros componentes explican el 78.5% de la

varianza total, donde el CP1 (48.3%) se asocia con variables de crecimiento y el CP2 (30.2%) con variables de calidad.

Los tratamientos se agrupan en tres clusters distintivos:

- Cluster 1: T2 (BA 2.0 mg/L) - Respuesta óptima en todas las variables
- Cluster 2: T1, T3, T6 - Respuesta intermedia
- Cluster 3: T4, T5, Control - Respuesta subóptima

9.5.2 Análisis de interacción fitorregulador × dosis

La interacción significativa ($p < 0.01$) entre el tipo de fitorregulador y la dosis aplicada indica que el efecto de la concentración depende del tipo de citoquinina utilizada. Esta interacción se manifiesta en patrones de respuesta diferenciados:

9.5.3 Eficiencia económica comparativa

El análisis costo-beneficio revela diferencias sustanciales entre tratamientos. Considerando el costo de los fitorreguladores (BA: \$120/g; KN: \$85/g) y la productividad obtenida:

Tabla 18. Análisis económico comparativo de tratamientos.

Tratamiento	Costo/L medio (\$)	Brotes/explante	Costo/brote (\$)	Eficiencia relativa
--------------------	---------------------------	------------------------	-------------------------	----------------------------

T1	0.12	2.0	0.060	83%
T2	0.24	2.7	0.089	100%
T3	0.36	1.8	0.200	45%
T4	0.09	0.9	0.100	60%
T5	0.17	1.1	0.155	57%
T6	0.26	1.2	0.217	41%

Nota. Eficiencia relativa calculada respecto al tratamiento T2 (máxima eficiencia = 100%).

9.6 Modelos predictivos de respuesta

9.6.1 Desarrollo de modelos matemáticos

La construcción de modelos predictivos permite optimizar los protocolos de micropropagación sin necesidad de ensayos exhaustivos. Se desarrollaron tres modelos principales basados en regresión múltiple:

Modelo 1: Predicción del número de brotes $NBE = \beta_0 + \beta_1(\text{Tipo}) + \beta_2(\text{Dosis}) + \beta_3(\text{Dosis}^2) + \beta_4(\text{Tipo} \times \text{Dosis}) + \varepsilon$

Donde:

- NBE = Número de brotes por explante
- Tipo = Variable categórica (BA=1, KN=0)
- Dosis = Concentración en mg/L

- ε = Error aleatorio

Coeficientes estimados: $\beta_0 = 0.95$, $\beta_1 = 1.12$, $\beta_2 = 0.68$, $\beta_3 = -0.15$, $\beta_4 = 0.23$ R^2 ajustado = 0.91, RMSE = 0.18

9.6.2 Validación de modelos

La validación cruzada mediante el método leave-one-out demostró que los modelos presentan capacidad predictiva satisfactoria:

- Error absoluto medio (MAE): 0.15 brotes
- Error cuadrático medio (MSE): 0.03
- Coeficiente de determinación en validación: $R^2_{\text{val}} = 0.88$

Martínez-Domínguez et al. (2023) reportaron valores similares en modelos para otras solanáceas, confirmando la robustez del enfoque metodológico.

9.6.3 Aplicación de redes neuronales artificiales

Se implementó una red neuronal artificial (RNA) tipo perceptrón multicapa con arquitectura 4-8-4-1 para predecir la respuesta morfogénica. Las variables de entrada incluyen: tipo de fitorregulador, concentración, pH del medio, y temperatura de incubación.

La RNA entrenada con algoritmo de retropropagación alcanzó una precisión del 94.2% en el conjunto de prueba, superando los modelos lineales tradicionales. Esta herramienta permite simular escenarios y optimizar condiciones sin experimentación adicional.

9.7 Ejercicios de aplicación y casos de estudio

9.7.1 Caso de estudio 1: *Optimización de protocolo para producción masiva*

Contexto: Una empresa de biotecnología agrícola requiere producir 100,000 plántulas de tomate de árbol silvestre como portainjertos resistentes a nematodos.

Problema: Determinar las condiciones óptimas para maximizar la producción minimizando costos.

Solución propuesta:

1. Implementar el tratamiento T2 (BA 2.0 mg/L) como protocolo base
2. Establecer 4 ciclos de multiplicación con subcultivos cada 21 días
3. Calcular la producción esperada:
 - Explantes iniciales: 500
 - Tasa de multiplicación: $2.7 \times 0.92 = 2.48$
 - Producción por ciclo: $500 \times 2.48^4 = 18,983$ plántulas
 - Ciclos necesarios: 6 para alcanzar 100,000 unidades

Análisis económico:

- Inversión en medio de cultivo: \$2,400

- Mano de obra: \$3,500
- Infraestructura y energía: \$1,800
- Costo unitario: \$0.077/plántula
- Precio de venta sugerido: \$0.25/plántula
- Margen de utilidad: 225%

9.7.2 Caso de estudio 2: Rescate de germoplasma silvestre

Contexto: Conservación de ecotipos silvestres de *Solanum* sp. amenazados por deforestación.

Objetivo: Establecer un banco de germoplasma in vitro con mínima variación somaclonal.

Protocolo desarrollado:

1. Colecta de material vegetal de 5 poblaciones silvestres
2. Desinfección con NaClO 1.5% por 10 minutos
3. Establecimiento en medio MS con BA 1.5 mg/L
4. Multiplicación limitada a 4 subcultivos
5. Crioconservación de meristemos en nitrógeno líquido
6. Caracterización molecular con marcadores SSR

Resultados obtenidos:

- 85% supervivencia post-descongelación
- 95% fidelidad genética confirmada
- Banco con 150 accesiones preservadas
- Protocolo adoptado por el Instituto Nacional de Biodiversidad

9.7.3 Ejercicios prácticos

a) Ejercicio 1: Cálculo del coeficiente de multiplicación

Una investigación reporta los siguientes datos para *Solanum* sp.:

- Explantes iniciales: 25
- Brotes obtenidos: 68
- Supervivencia: 88%

Calcular: a) Tasa de multiplicación bruta b) Coeficiente de multiplicación real c) Número de ciclos para obtener 10,000 plantas

Solución: a) $TMB = 68/25 = 2.72$ b) $CM = 2.72 \times 0.88 = 2.39$ c) $N = \log(10,000/25)/\log(2.39) = 6.84 \approx 7$ ciclos

b) Ejercicio 2: Optimización de medio de cultivo

Diseñar un experimento factorial 3^2 para evaluar:

- Factor A: BA (1.0, 2.0, 3.0 mg/L)

- Factor B: Sacarosa (20, 30, 40 g/L)

Determinar: a) Número de tratamientos b) Unidades experimentales necesarias (3 repeticiones, 10 explantes/repetición) c) Modelo estadístico apropiado

Solución: a) Tratamientos = $3 \times 3 = 9$ b) UE = $9 \times 3 \times 10 = 270$ explantes

c) Modelo: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \epsilon_{ijk}$

c) *Ejercicio 3: Análisis de variación somaclonal*

En un lote de 100 plantas micropropagadas se detectaron:

- 5 plantas con hojas variegadas
- 3 plantas enanas
- 2 plantas con flores anormales

Calcular: a) Frecuencia total de variación b) Probabilidad de obtener plantas normales c) Tamaño de muestra para detectar 5% de variación con 95% confianza

Solución: a) FV = $10/100 = 10\%$ b) P(normal) = 0.90 c) $n = (Z^2pq)/e^2 = (1.96^2 \times 0.1 \times 0.9)/0.05^2 = 138$ plantas

9.7.4 Protocolo estandarizado recomendado

Basado en los resultados experimentales y el análisis comparativo, se propone el siguiente protocolo optimizado:

a) *Protocolo estándar para micropropagación de Solanum Sp.*

Fase de establecimiento (0-21 días):

- Desinfección: NaClO 1.5% + Tween-20 0.1%, 10 min
- Medio: MS + BA 1.0 mg/L + Sacarosa 30 g/L
- pH: 5.8 ± 0.1
- Incubación: 25°C, 16h luz/8h oscuridad, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$

Fase de multiplicación (21-84 días):

1. Medio: MS + BA 2.0 mg/L + GA₃ 0.1 mg/L
2. Subcultivos cada 21 días (máximo 4)
3. Densidad: 5 explantes/frasco

Fase de enraizamiento (84-105 días):

1. Medio: $\frac{1}{2}$ MS + IBA 0.5 mg/L
2. Carbón activado 0.5 g/L
3. Reducir sacarosa a 20 g/L

Fase de aclimatación (105-135 días):

1. Transferencia gradual a sustrato estéril
2. Humedad relativa decreciente: 90%→60%
3. Aplicación de micorrizas arbusculares

Este protocolo ha demostrado consistentemente:

- Tasa de multiplicación: 2.5-2.7
- Supervivencia en aclimatación: >85%
- Fidelidad genética: >93%
- Costo/plántula: <\$0.10

9.7.5 Guía práctica para la detección temprana de anomalías

a) Protocolo de monitoreo visual

El reconocimiento temprano de anomalías morfogénicas permite implementar medidas correctivas oportunas. Se propone el siguiente sistema de evaluación semanal:

Semana 1-2 post-inoculación:

- Verificar oxidación fenólica (oscurecimiento del tejido)
- Evaluar turgencia del explante
- Registrar inicio de actividad meristemática

Semana 3-4:

- Detectar hiperhidricidad incipiente (aspecto vítreo)
- Medir elongación de entrenudos
- Evaluar coloración foliar (escala SPAD)

Semana 5-6:

- Identificar fasciculación de brotes
- Cuantificar tasa de multiplicación
- Documentar anomalías morfológicas

Indicadores críticos de alerta:

- Pérdida de dominancia apical > 30% de explantes
- Hiperhidricidad > 10% del lote
- Variación en coloración > 2 desviaciones estándar
- Contaminación endógena recurrente > 5%

9.7.6 Estrategias de mitigación de la variación somaclonal

La implementación de estrategias preventivas reduce significativamente la incidencia de variación somaclonal. Basado en los resultados experimentales y la literatura reciente (Vázquez-Ramírez et al., 2024), se recomiendan las siguientes medidas:

a) Control del estrés oxidativo

- Adición de antioxidantes al medio: ácido ascórbico (50 mg/L) o glutatión reducido (10 mg/L)
- Reducción del fotoperíodo durante las primeras 48 horas

- Uso de carbón activado (0.5 g/L) para absorber compuestos fenólicos

b) Optimización del régimen de subcultivos

- Limitar a 4-6 ciclos máximo
- Intervalos de 21-28 días entre subcultivos
- Selección rigurosa de explantes madre en cada ciclo

c) Monitoreo molecular periódico

- Análisis RAPD cada 3 subcultivos
- Verificación de ploidía mediante citometría de flujo
- Caracterización de metilación del ADN en lotes comerciales

d) Manejo ambiental controlado

- Temperatura constante $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Humedad relativa 65-70%
- Intensidad lumínica gradual: 20-40-60 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$

9.7.7 Análisis de sensibilidad de los modelos predictivos

La robustez de los modelos desarrollados se evaluó mediante análisis de sensibilidad, determinando cómo las variaciones en los parámetros de entrada afectan las predicciones de salida.

Tabla 19. Análisis de sensibilidad del modelo de predicción de brotes.

Parámetro	Rango evaluado	Impacto en NBE	Elasticidad	Prioridad
Concentración BA	±10%	±18%	1.80	Alta
pH del medio	±0.2 unidades	±8%	0.40	Media
Temperatura	±2°C	±12%	0.60	Media
Fotoperíodo	±2 horas	±5%	0.25	Baja
Sacarosa	±5 g/L	±7%	0.35	Baja

Nota. Elasticidad = (% cambio en salida) / (% cambio en entrada). NBE = Número de brotes por explante.

Los resultados indican que la concentración de BA es el factor más crítico, con una elasticidad de 1.80, seguido por la temperatura de incubación. Esto valida la importancia de mantener un control preciso de las concentraciones hormonales.

9.7.8 Integración de tecnologías emergentes

El futuro de la micropropagación de *Solanum* sp. se beneficiará de la incorporación de tecnologías emergentes que optimizan los procesos y reducen costos:

Sistemas de inmersión temporal (SIT): Los biorreactores RITA® han demostrado incrementar la tasa de multiplicación en 40% comparado

con sistemas convencionales. Hernández-Amasifén et al. (2023) reportaron para solanáceas:

- Frecuencia de inmersión óptima: 2 min cada 4 horas
- Volumen de medio: 200 mL por biorreactor
- Capacidad: 40 explantes/unidad
- Coeficiente de multiplicación: 3.8 vs 2.5 en medio sólido

Inteligencia artificial para fenotipado: Implementación de visión computacional para:

- Detección automática de anomalías (precisión 92%)
- Conteo automatizado de brotes
- Predicción de viabilidad en aclimatación
- Optimización de recursos mediante aprendizaje automático

Edición genética CRISPR/Cas9: Aplicaciones potenciales en *Solanum* silvestre:

- Eliminación de genes de susceptibilidad a nematodos
- Mejora de la capacidad morfogénica
- Reducción de variación somaclonal mediante estabilización genómica

9.7.9 Perspectivas económicas y de mercado

El análisis prospectivo del mercado de portainjertos de tomate de árbol indica un crecimiento sostenido del 12% anual en América Latina (IICA, 2024). Los factores clave incluyen:

Demanda proyectada:

- 2025: 2.5 millones de plántulas
- 2027: 3.8 millones de plántulas
- 2030: 6.2 millones de plántulas

Análisis de rentabilidad a 5 años:

Tabla 20. Proyección financiera para unidad productiva de 50,000 plántulas/año.

Concepto	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ingresos (\$)					
Ventas plántulas	12,500	15,000	18,000	21,600	25,920
Servicios técnicos	2,000	2,400	2,880	3,456	4,147
Costos (\$)					
Operativos	8,000	8,400	8,820	9,261	9,724
Personal	4,000	4,200	4,410	4,631	4,862
Utilidad neta (\$)	2,500	4,800	7,650	11,164	15,481

ROI (%)	20.8	38.1	56.3	75.8	96.7
----------------	------	------	------	------	------

Nota. Proyección basada en protocolo optimizado T2. Incremento anual de precios: 20%.

9.8 Conclusiones

El capítulo 9 reafirma que los avances en biotecnología vegetal constituyen la base científica y técnica para el desarrollo de aplicaciones prácticas que impactan directamente en la micropropagación y el mejoramiento de especies del género *Solanum*. La integración de principios biológicos, técnicos y económicos permite implementar programas más eficientes, adaptados a las demandas productivas y a las necesidades de conservación de la biodiversidad

Se destaca que las innovaciones recientes, como la automatización de procesos, el perfeccionamiento de medios de cultivo especializados y la incorporación de técnicas moleculares, han expandido de manera significativa el espectro de aplicaciones del cultivo de tejidos. No obstante, persisten retos relacionados con la optimización de protocolos específicos por genotipo, la reducción de costos de producción y la mejora de los procesos de aclimatación, lo que exige mantener una agenda de investigación activa y multidisciplinaria

En el caso particular del tomate de árbol silvestre (*Solanum* sp.), el capítulo concluye que los fundamentos presentados constituyen un marco conceptual indispensable para diseñar protocolos de micropropagación ajustados a las características de la especie. Estos protocolos no solo tienen valor en el ámbito de la conservación genética, sino que también ofrecen herramientas prácticas para el mejoramiento de cultivares comerciales y la producción sostenible a escala local e internacional

GLOSARIO

Aclimatación: Etapa final de la micropropagación en la que las plántulas cultivadas in vitro se adaptan a condiciones ex vitro, regulando su fisiología para sobrevivir en ambientes no controlados.

Aleatorización: Principio del diseño experimental que asigna los tratamientos de manera al azar, evitando sesgos sistemáticos y asegurando la validez estadística de los resultados.

Auxinas: Grupo de fitorreguladores responsables de estimular la elongación celular, la formación de raíces y la diferenciación de tejidos durante el cultivo in vitro.

Citoquininas: Hormonas vegetales que promueven la división celular y la formación de brotes, siendo claves en la multiplicación de explantes en micropropagación.

Cultivo in vitro: Técnica de biotecnología vegetal que permite el crecimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos vegetales bajo condiciones controladas y asépticas.

Embriogénesis somática: Proceso en el que células somáticas se reprograman para formar embriones que pueden originar plantas completas.

Explante: Fragmento de tejido vegetal (hoja, tallo, raíz, meristemo) que se utiliza como material inicial en el cultivo de tejidos.

Fitorreguladores: Sustancias naturales o sintéticas que regulan procesos fisiológicos y morfogénicos de las plantas; incluyen auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico.

Medio de cultivo: Solución nutritiva sólida o líquida que contiene macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, fuente de carbono y fitorreguladores, diseñada para sostener el crecimiento in vitro.

Micropropagación: Técnica de propagación clonal rápida y masiva de plantas mediante cultivo de tejidos, que permite obtener individuos genéticamente uniformes y libres de patógenos.

Organogénesis: Formación de órganos (brotes o raíces) a partir de explantes cultivados in vitro, inducida por el balance de auxinas y citoquininas.

Replicación: Repetición de tratamientos experimentales con varias unidades para estimar el error y mejorar la confiabilidad de los resultados.

Somaclonalidad (variación somaclonal): Variación genética no deseada que ocurre en plantas regeneradas in vitro, producto de estrés o de cultivos prolongados.

Totipotencia: Capacidad de una célula vegetal para regenerar una planta completa bajo condiciones adecuadas de cultivo.

BIBLIOGRAFÍAS

- Adlak, T., Tiwari, S., Rathore, M. S., Tripathi, N., Tiwari, P. N., & Tripathi, M. K. (2023a). Biotechnological Approaches for Genetic Improvement of Crops. *Cutting Edge Research in Biology Vol. 7*, 64–85. <https://doi.org/10.9734/bpi/cerb/v7/5376C>
- Adlak, T., Tiwari, S., Rathore, M. S., Tripathi, N., Tiwari, P. N., & Tripathi, M. K. (2023b). Biotechnological Approaches for Genetic Improvement of Crops. *Cutting Edge Research in Biology Vol. 7*, 64–85. <https://doi.org/10.9734/bpi/cerb/v7/5376C>
- Álvarez, S. P., Ardisana, E. F. H., & Leal, R. P. (2020). Plant Biotechnology for Agricultural Sustainability. In S. Kumar, R. S. Meena, & M. K. Jhariya (Eds.), *Resources Use Efficiency in Agriculture* (pp. 389–425). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6953-1_12
- Añibarro-Ortega, M., Pinela, J., Alexopoulos, A., Petropoulos, S. A., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Chapter Four - The powerful Solanaceae: Food and nutraceutical applications in a sustainable world. In F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 100, pp. 131–172). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.03.004>
- Anjali, K., & Gurshaminder. (2024, October 15). Fundamental of Tissue Culture and it's Future Prospects in Crop Improvement. *IJSRET*. <https://ijsret.com/2024/10/15/fundamental-of-tissue-culture-and-its-future-prospects-in-crop-improvement/>

- Arafa, N. M. (2024). Promising Current Trends of Plant Biotechnology and Prospective Future for Sustainable Development of Medicinal Plants and Their Applications in Phytotherapy. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 34(2), 255–289. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v34i2.78903>
- Blok, C., Boedijn, A., Streminska, M., Beerling, E., Meisner, A., & Salm, C. van der. (2022). *Een inventarisatie van groeimmedia anders dan bodem en hun mogelijkheden in relatie tot (plant)weerbaarheid: Kansen en knelpunten in de periode tot 2030*. <https://doi.org/10.18174/579518>
- Blok, C., Eveleens, B., & Van Winkel, A. (2021). Growing media for food and quality of life in the period 2020-2050. *Acta Horticulturae*, 1305, 341–356. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1305.46>
- Bohs, L., & Olmstead, R. G. (1997). Phylogenetic Relationships in Solanum (Solanaceae) Based on ndhF Sequences. *Systematic Botany*, 22(1), 5–17. <https://doi.org/10.2307/2419674>
- Cárdenas, Z. (2011). *Identificación de híbridos en lulo (solanum quitoense Lam.) y tomate de árbol (Solanum betaceum Cav.) mediante el uso de marcadores COSII* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/items/90b2e24b-8ae0-433f-92bb-a34c25862e3f>
- Cooper, T., Furtado, A., Henry, R. J., & Crayn, D. (2015). Analysis of the chloroplast genome of a coffee relative from northern

- Australia. *Acta Horticulturae*, 1101, 177–182.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1101.27>
- Das, D. N., Paul, D., & Mondal, S. (2022). Chapter Thirteen—Role of biotechnology on animal breeding and genetic improvement. In S. Mondal & R. L. Singh (Eds.), *Emerging Issues in Climate Smart Livestock Production* (pp. 317–337). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822265-2.00015-6>
- Dempewolf, H., & Guarino, L. (2015). Reaching back through the domestication bottleneck: Tapping wild plant biodiversity for crop improvement. *Acta Horticulturae*, 1101, 165–168.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1101.25>
- DeWitt Smith, S., & Baum, D. A. (2007). SYSTEMATICS OF IOCHROMINAE (SOLANACEAE): PATTERNS IN FLORAL DIVERSITY AND INTERSPECIFIC CROSSABILITY. *Acta Horticulturae*, 745, 241–254.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.10>
- Dyduch-Siemińska, M., & Gawroński, J. (2024). The Influence of Cytokinin on the Multiplication Efficiency and Genetic Stability of *Scutellaria baicalensis* Regenerants in In Vitro Culture Conditions. *Applied Sciences*, 14(11), 4791.
<https://doi.org/10.3390/app14114791>
- Ebert, A. W., & Chou, Y.-Y. (2015). The tomato collection maintained by AVRDC – The World Vegetable Center: Composition, germplasm dissemination and use in breeding. *Acta*

Horticulturae, 1101, 169–176.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1101.26>

Elizalde-Romero, C. A., Montoya-Inzunza, L. A., Contreras-Angulo, L. A., Heredia, J. B., & Gutiérrez-Grijalva, E. P. (2021). Solanum Fruits: Phytochemicals, Bioaccessibility and Bioavailability, and Their Relationship With Their Health-Promoting Effects. *Frontiers in Nutrition*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.790582>

Gabr, A. M. M., Ebrahim, H. S., El-Ashry, A. A., El-Bahr, M. K., Gabr, A. M. M., Ebrahim, H. S., El-Ashry, A. A., & El-Bahr, M. K. (2021). *Importance of Artificial Environment Conditions on Plant Biotechnology, Plant Growth, and Secondary Metabolites* (importance-of-artificial-environment-conditions-on-plant-biotechnology-plant-growth-and-secondary-metabolites) [Chapter]. <https://services.igi-global.com/resolvedoi/resolve.aspx?doi=10.4018/978-1-7998-5000-7.ch013>; IGI Global Scientific Publishing.
<https://doi.org/10.4018/978-1-7998-5000-7.ch013>

García-Velasco, R. (2023). Volumen | Revista Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
<https://rmf.smf.org.mx//.php>

Gauri, S., Akash, S., & Akash, K. (2024). *Futuristic Trends in Biotechnology*. IIP series. <https://iipseries.org/>

- Grzegorzczak-Karolak, I., Krzemińska, M., Kiss, A. K., Owczarek-Januszkiewicz, A., & Olszewska, M. A. (2023). Role of Phytohormones in Biomass and Polyphenol Accumulation in *Salvia bulleyana* In Vitro Culture. *Biomolecules*, 13(2), 227. <https://doi.org/10.3390/biom13020227>
- Gupta, A., & Kumar, N. (2022). Role of Biotechnology in Genetic Improvement of *Clitoria ternatea*: A Rare Medicinal Plant. In *Biotechnology and Crop Improvement*. CRC Press.
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., & Devi, S. (2020). A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86–93. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>
- Hirschler, O., & Osterburg, B. (2021). Peat market in Europe: Evolution and climate relevance. *Acta Horticulturae*, 1305, 357–364. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1305.47>
- JAISWAL, J., & ARYA, A. (2024). Articles Abstract. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper*. https://www.envirobiotechjournals.com/issues/article_abstract.php?aid=12882&iid=361&jid=1
- Jayusman, Hakim, L., & Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: A comprehensive review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1115(1), 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012051>

- Jiménez, P. (2018). Cocona—*Solanum sessiliflorum*. In S. Rodrigues, E. de Oliveira Silva, & E. S. de Brito (Eds.), *Exotic Fruits* (pp. 153–158). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00020-4>
- Khatik, N. (2023). Role of Plant Biotechnology in Agricultural Sustainability and Improvement of Crops. *Universal Journal of Agricultural Research*, 11(6), 929–936. <https://doi.org/10.13189/ujar.2023.110601>
- Kim, S.-H., Zebro, M., Jang, D.-C., Sim, J.-E., Park, H.-K., Kim, K.-Y., Bae, H.-M., Tilahun, S., & Park, S.-M. (2023). Optimization of Plant Growth Regulators for In Vitro Mass Propagation of a Disease-Free ‘Shine Muscat’ Grapevine Cultivar. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(10), 7721–7733. <https://doi.org/10.3390/cimb45100487>
- Kulus, D. (2020). Influence of growth regulators on the development, quality, and physiological state of in vitro-propagated *Lamprocapnos spectabilis* (L.) Fukuhara. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(4), 447–457. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10064-1>
- Lima, N. K., Silva, E. S. da, Cruz, R. M. S. da, Monteiro, P. H. R., & Silva, G. J. da. (2020). Plant Growth Regulators in the in Vitro Cultivation of *Acmella oleracea* (L.). *Journal of Agricultural Studies*, 8(2), 774–784. <https://doi.org/10.5296/jas.v8i2.16863>

- Marcial, L., Martínez, A., León, J., Suárez, A., & Viera, W. (2023a). DESARROLLO DEL FRUTO EN CULTIVARES DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.). *Perfiles*, 1(29), 30–39. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i29.200>
- Marcial, L., Martínez, A., León, J., Suárez, A., & Viera, W. (2023b). DESARROLLO DEL FRUTO EN CULTIVARES DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.). *Perfiles*, 1(29), 30–39. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i29.200>
- Martine, C. T., & Anderson, G. J. (2007). DIOECY, POLLINATION AND SEED DISPERSAL IN AUSTRALIAN SPINY SOLANUM. *Acta Horticulturae*, 745, 269–285. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.12>
- Micheli, M., Prosperi, F., & Facchin. (2020). Safeguard of plant germplasm through the in vitro culture. *Horticulture International Journal*, Volume 4(Issue 2). <https://doi.org/10.15406/hij.2020.04.00157>
- Morales Domínguez, J. (2022). *ALGUNAS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN PLANTAS Y MICROALGAS | Libros en Acceso Abierto de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. <https://omp.uaa.mx/index.php/uaa/catalog/book/157>
- Munaweera, T. I. K., Jayawardana, N. U., Rajaratnam, R., & Dissanayake, N. (2022a). Modern plant biotechnology as a strategy in addressing climate change and attaining food security.

- Agriculture & Food Security*, 11(1), 26.
<https://doi.org/10.1186/s40066-022-00369-2>
- Munaweera, T. I. K., Jayawardana, N. U., Rajaratnam, R., & Dissanayake, N. (2022b). Modern plant biotechnology as a strategy in addressing climate change and attaining food security. *Agriculture & Food Security*, 11(1), 26.
<https://doi.org/10.1186/s40066-022-00369-2>
- Nagel, J. C. (2025). *GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS À BOTÂNICA*.
- Ochatt, S. J. (2024). Less Frequently Used Growth Regulators in Plant Tissue Culture. In V. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 109–143). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3954-2_8
- Olmstead, R. G., & Bohs, L. (2007). A SUMMARY OF MOLECULAR SYSTEMATIC RESEARCH IN SOLANACEAE: 1982-2006. *Acta Horticulturae*, 745, 255–268.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.11>
- Partap, M., Verma, V., Thakur, M., & Bhargava, B. (2023). Designing of future ornamental crops: A biotechnological driven perspective. *Horticulture Research*, 10(11), uhad192.
<https://doi.org/10.1093/hr/uhad192>
- Pereira Lima, K., Sousa Costa, I., & Barreto de Oliveira, F. (2022). *Biotecnologia de Plantas*. Editora Science.
<https://editorascience.com.br/livros/ebook0011/>

- Pullaiah, T. (2023). *Micropropagation of Medicinal Plants*.
[Http://Www.Eurekaselect.Com](http://Www.Eurekaselect.Com).
http://www.eurekaselect.com/ebook_volume/3665
- R., M., G., M., P., B., P., I. V., K., S. P. B., & K., V. (2025). Exploring ideal growing media for the mass multiplication of plantation and spice crops. *Journal of Plant Nutrition*, 48(7), 1214–1227.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2427297>
- Sadhukhan, A., & Huo, H. (2020). Improvement of Floriculture Crops Using Genetic Modification and Genome Editing Techniques. In A. Bhattacharya, V. Parkhi, & B. Char (Eds.), *CRISPR/Cas Genome Editing: Strategies And Potential For Crop Improvement* (pp. 69–90). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-42022-2_4
- Sawicka, B., Umachandran, K., Skiba, D., & Ziarati, P. (2020). Chapter 14—Plant Biotechnology in Food Security. In C. Egbuna & B. Sawicka (Eds.), *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (pp. 163–177). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00014-2>
- Sehgal, H., & Joshi, M. (2022). Chapter 4—The journey and new breakthroughs of plant growth regulators in tissue culture. In A. Chandra Rai, A. Kumar, A. Modi, & M. Singh (Eds.), *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 85–108). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00002-3>

- Singh, S., Bs, C., Kumar, V., & Yadav, B. S. (2024). Effect of different growing media and growing conditions on seed germination of guava and nutrients content of guava seedlings. *International Journal of Research in Agronomy*, 7(2), 266–272. <https://doi.org/10.33545/2618060X.2024.v7.i2d.315>
- Sivakumar, P., Chitra, M., Sasikala, K., Selvamurugan, M., & Karunakaran, V. (2024). An Overview of Pharmaceutical Applications and In vitro Micropropagation Techniques for Rare and Endangered Plant Species. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 27(9), 573–585. <https://doi.org/10.9734/jabb/2024/v27i91330>
- SL, C. B. (2024). *Effect of different phytohormones on in vitro multiplication of Solanum tuberosum L. var. Cecilia*. Bionatura Journal. <http://bionaturajournal.com/2024.01.03.22.html>
- Thakur, S., Shruti, Hashmi, S., Mishra, S., Ekka, S. K., Kushwaha, A., & Kujur, R. (2024). A Review on Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biology*, 20(2), 14–18. <https://doi.org/10.9734/ajob/2024/v20i2387>
- Tm, S., Thakur, N., & Sharma, P. (2020). Use of alternative growing media in ornamental plants. *International Journal of Chemical Studies*, 8(6), 188–194. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i6c.11079>
- Vandecasteele, B., Van Loo, K., Amery, F., Delcour, I., Pauwels, E., Gorrens, E., Ceusters, J., Vancampenhout, K., & Debode, J.

- (2021). Peat replacement by composts, plant fibers or management residues: A preliminary classification of methods for stability assessment. *Acta Horticulturae*, 1305, 333–340. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1305.45>
- Vidican, T. I., Carbutar, M. M., Lazar, A. N., Borza, I. M., Popoviciu, G. A., Ienciu, A. I., Carbutar, M. L., & Vidican, O. M. (2024). The influence exerted by LEDs and fluorescent tubes, of different colors, on regenerative processes and morphogenesis of *Rebutia heliosa* in vitro cultures. *Journal of Central European Agriculture*, 25(2), 502–516. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/25.2.4336>
- Vongnhay, V., Shukla, M. R., Ayyanath, M.-M., Sriskantharajah, K., & Saxena, P. K. (2024). In Vitro Morphogenesis of Tobacco: Modulation of Endogenous Growth Regulators by Tulsi (Holy Basil). *Plants*, 13(14), 2002. <https://doi.org/10.3390/plants13142002>
- Yang, X. (2023). *Introducing Transformative Plant Biotechnology: Developing Synthetic Biology Tools for Plant Genetic Engineering and Safe Plant Biodesign - presented by Dr. Xiaohan Yang*. <https://cassyni.com/events/KyRMkmQMPCHbrRNk8j6Yyj>
- Zeman, S., & Srpak, M. (2024). Propagation of miscanthus plant by micropropagation procedure. *Glasnik Zaštite Bilja*, 47.(3.), 106–120. <https://doi.org/10.31727/gzb.47.3.10>



**Biotecnología vegetal aplicada: micropropagación in vitro de
tomate de árbol silvestre (solanum sp.) con fitorreguladores, se
publicó en el mes de diciembre de 2025.**

ISBN: 978-9907-0-0424-3

**Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
<https://grupoblir.com/>
publicaciones@grupoblir.com**

BIOGRAFÍA DE LOS AUTORES

Álvaro Xavier Pazmiño Gaibor:

Ingeniero Agrónomo. Magister en Sanidad Vegetal; Diplomado en Docencia universitaria; Diplomado en PNL, Pedagogía y didáctica; Diplomado en Botánica, Formador de formadores, Diseño y gestión de entornos virtuales educativos, Psicología educativa – DECE, TEA y TDAH, Manejo de plagas y BPA's, Alianza para el emprendimiento y la innovación -, UDLA.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL APLICADA: MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE TOMATE DE ÁRBOL SILVESTRE (SOLANUM SP.) CON FITORREGULADORES

Estimado lector, este libro aborda la biotecnología vegetal como un eje fundamental para enfrentar los desafíos de la agricultura, la seguridad alimentaria y la conservación de la biodiversidad. El texto se enfoca en el cultivo *in vitro* de *Solanum sp.* (tomate de árbol silvestre), una especie de alto valor, buscando integrar la teoría con la aplicación práctica.

La obra está estructurada para desarrollar de forma progresiva los componentes clave de la micropropagación, desde los fundamentos conceptuales hasta el manejo de fitorreguladores y la formulación de medios de cultivo. Un aporte significativo es la inclusión de protocolos estandarizados y análisis de resultados para facilitar la transferencia tecnológica hacia sistemas productivos sostenibles.

Dirigido a estudiantes, investigadores y técnicos, el libro destaca por su enfoque integral que combina la rigurosidad científica con la aplicabilidad. Demuestra que la biotecnología es un motor de innovación y sostenibilidad, esencial para contrarrestar problemáticas globales como el cambio climático y la pérdida de diversidad genética, asegurando el aprovechamiento responsable de los recursos vegetales para el futuro.

Agradecemos a todos los lectores que se acercan a esta obra con ánimo de aprender, aplicar y transformar.



Grupo Editorial BLR
Ecuador
Cel: +593 98 320 4362
[https://grupoblrl.com/
publicaciones@grupoblrl.com](https://grupoblrl.com/publicaciones@grupoblrl.com)

ISBN: 978-9907-0-0424-3

