

UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA



En convenio con:

UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA
“FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PEREZ”
FACULTAD DE AGRONOMIA



Curso de continuación de estudios
“Agricultura Orgánica y Gestión en Agronegocios”
previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo

*Utilización de bioestimulantes en la
micropropagación masiva de plantas.*

AUTOR: Santiago Felipe Vintimilla Neira
TUTOR: MSc. Jaime Ramiro Hidrobo Luna

LA HABANA - CUBA.

2002

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, que me ha dado una familia y amistades generosas, que han sabido apoyarme en cada momento de mi vida, en especial a mis padres y abuelos que han sido un ejemplo a seguir en cada decisión importante.

AGRADECIMIENTOS

- Quisiera agradecer al pueblo cubano por la generosidad que los caracteriza y las enseñanzas que me han brindado.
- Al grupo de profesores cubanos de la UNAH por amenizar mi estadía en Cuba.
- A la Universidad de Cuenca y sus profesores por servirme de medio para mi realización como profesional.
- A mi tutor MSc. J Ramiro Hidrobo por su preocupación y generosidad, y por servirme de ejemplo para continuar mis estudios.
- A mis compañeros por ser un grupo tan sui generis de personas de los cuales he podido aprender diferentes razones de la vida.

En fin, a todos muchas gracias.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivos, analizar la utilización de sustancias bioestimulantes, elaboradas con tecnología cubana como el oligopectato (Pectimorf) y el análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) como posibles sustitutos de los reguladores del crecimiento tradicionales y así lograr una mejora en las diferentes etapas que debe soportar una planta *in vitro* y estudiar que esta posible combinación en diferentes concentraciones y con la tecnología cubana dan excelentes resultados para la propagación masiva de especies de interés económico teniendo en cuenta que el Ecuador al ser un país agrícola exige tecnología que mejore la calidad y sea de mayor conveniencia para su economía.

I. INTRODUCCION

La existencia de los bioestimulantes se supone desde la segunda mitad del siglo XIX cuando señalaron la posibilidad de que en las hojas de algunas plantas existieran sustancias que podían ser transportadas para dar origen a la formación de órganos (Vásquez y Torres, 1995).

Es así que a partir de varias observaciones y experimentos se encontró la presencia de los reguladores de crecimiento, que se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican de una forma u otra cualquier proceso fisiológico vegetal (Devlin, 1975).

Desde entonces las sustancias biorreguladoras del crecimiento han sido usadas para diversos fines entre los cuales se pueden citar, enraizamiento y propagación, letargo, floración, amarre y desarrollo de los frutos, senescencia, abscisión, control del tamaño y control de malas hierbas (Weaver, 1976).

Con el avance de la biotecnología y con la finalidad de abastecer la demanda de plantas para sembrarlas en grandes cantidades, las sustancias reguladoras de crecimiento juegan un papel importante en los medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de plantas. Según (Cevallos, 1999) el desarrollo de plantas *in vitro* es producto de la interacción cuantitativa entre los reguladores del crecimiento, especialmente entre auxinas y citoquininas. Estas sustancias al intervenir en la micropropagación *in vitro* toman un papel protagónico ya que sirven de herramientas en diversas aplicaciones que ayudan a los científicos a hacer avances importantes en la biotecnología.

La producción de plantas *in vitro* tiene como ventaja principalmente la propagación masiva que permite manejar altos volúmenes de plantas en corto tiempo (Pérez, 1998), además se puede mencionar la rápida introducción de nuevas variedades, la obtención de plantas sanas y uniformes capaces de adaptarse con éxito a su lugar

definitivo de siembra, siendo de máxima finalidad el aumento de los rendimientos y además en general varias utilidades que han permitido bajar los precios por cada planta y obtenerlas con mayor calidad y en corto tiempo en forma masiva. Potencialmente con esta técnica de micropropagación, un meristemo posibilita la obtención de hasta 15 millones de plántulas (Anganica y Perea, 1991, citado por Echenagusia, 1999).

En el Ecuador las ventajas obtenidas por la micropropagación in vitro plantas es muy limitada especialmente por la falta de técnicos con la preparación adecuada y por los altos costos que significan montar un laboratorio capacitado, sin embargo con el avance de la industria agrícola se está tratando de usar métodos nuevos de propagación que permitan obtener plántulas y semilla básica para satisfacer la demanda de los agricultores en varios cultivos (MAG,2002)

La industria agrícola ecuatoriana tiene la desventaja de que se destinan muy pocos fondos por parte del gobierno para la investigación, lo que no ha permitido un desarrollo de la tecnología, sin embargo el uso de la micropropagación y el uso de las sustancias reguladoras del crecimiento no son una novedad.

Lo que sí constituyese una premisa sería la implementación del uso de bioestimulantes orgánicos en reemplazo de las fitohormonas comunes que se usan en los medios de cultivo como por ejemplo el: RIZOBAC, BIOSTAN, LIPLANT, BIOBRAS 6 Y PECTIMORF, que son compuestos preparados en Cuba y que han demostrado ser un excelente sustituto de las Auxinas, Citoquininas y Giberelinas, con la gran ventaja de abaratar los costos de producción y conseguir un efecto positivo en la aclimatación de las vitro plantas (Díaz, et al., 2002).

Hipótesis

Es posible a partir de la utilización de sustancias orgánicas, reguladoras del crecimiento, sustitutas de las fitohormonas, conseguir una mejora en las características de las vitroplantas, y una buena adaptación a la fase de vivero y lugar definitivo de siembra.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la posibilidad de la sustitución de sustancias bioestimulantes de origen Cubano por los reguladores tradicionales del crecimiento en la micropropagación masiva de plantas *in vitro* para aumentar los rendimientos y mejorar su calidad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Utilizar sustancias bioestimulantes de origen cubano como sustitutos de reguladores del crecimiento tradicionales en la producción masiva de plantas *in vitro* para aumentar los rendimientos y mejorar su calidad.
- Analizar la utilización del Pectimorf y Biobras-16 en la micropropagación masiva y la disminución de los costos de producción de vitroplantas.
- Valorar la posibilidad de introducir en la producción de plantas de interés económico, métodos biotecnológicos y uso de sustancias bioestimulantes en el Ecuador.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes históricos del cultivo de tejidos

Sin poder determinar una fecha exacta en la que el cultivo de tejidos dio inicio se pueden mencionar sucesos importantes, como por ejemplo en los años 1860-1861, Sacko (1860) y Knops (1861) descubrieron las sustancias más importantes absorbidas por las células, que dieron lugar a la elaboración de una sustancia nutritiva (solución de Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usa como componente básico de los medios de cultivo. De ahí hasta 1902 Haberlandt tuvo reconocimiento siendo el mayor aportador en el cultivo de tejidos con importantes descubrimientos y terminologías que ayudaron a desarrollar la ciencia, entre ellos se puede citar el cultivo de células, la especulación con respecto a una fitohormona que llamó traumatina, y así mismo fue el primero en usar el término callo para describir a una masa amorfa de células; sin embargo debido a que usó un medio de cultivo simple y la selección como explantes de células altamente diferenciadas, no pudo obtener división celular (Villalobos, 1990)

Teniendo noción de los medios de cultivo y que en el se pueden cultivar células partieron con una variedad de experimentos que determinaron año tras año una mejora en las condiciones para una rápida división celular, mayor velocidad de crecimiento y otros componentes que determinaron el éxito de los medios de cultivo, sin embargo siguen habiendo dificultades que son motivo de estudio y que han ayudado a obtener avances en diversos campos como la genética, morfogénesis, fisiología, bioquímica, y fitopatología. En el futuro próximo este método puede ser utilizado más frecuentemente y en varios campos de la ciencia (Villalobos, 1990).

2.2. Utilización del Cultivo de Tejidos

El desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos a dado un gran aporte no solo a la agricultura si no también a la biotecnología, que en la actualidad constituye una vía fundamental en la actividad científico tecnológica (Cevallos, 1999). Siendo una herramienta en varios campos de la ciencia que se complementan para hacer importantes avances tecnológicos y metodológicos.

El cultivo de tejidos vegetales presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, tales como:

- mejora genética
- multiplicación vegetativa (micropropagación)
- obtención de plantas libres de virus y otros patógenos
- obtención de haploides y líneas isogénicas
- conservación de germoplasma
- criopreservación
- cultivo de células y protoplastos (Pienik, 1990).

Según Angarica y Perea (1991), la técnica del cultivo de tejidos *in vitro*, consiste en aislar una fracción de la planta (explantes), a la cual se le proporcionan las condiciones adecuadas para que sus células expresen su potencial intrínseco o inducido, empleándose procedimientos asepticos para evitar con ello la contaminación microbiana del medio de cultivo donde estas se desarrollan. Es así que según Angarica y Perea (1991) se puede mencionar el avance obtenido en especialidades como:

Cultivo de meristemas

Es un método muy eficaz para la obtención de plantas libres de virus, viroides, fitoplasmas, y otros patógenos a partir de material infestado: estos materiales se propagan de forma clonal y de esta manera pueden fomentarse bancos de germoplasma y combinarse esta técnica con la criopreservación.

Micropropagación

Consiste en la propagación acelerada de brotes, mediante la fragmentación de ápices, yemas axilares, etc. de genotipos seleccionados por su alto valor genético, u otros provenientes de otras técnicas biotecnológicas en cualquier época del año y en cantidades ilimitadas, los cuales se pueden producir en las biofabricas.

Cultivo de Callos

Se pueden obtener a partir de pequeños segmentos o explantes de órganos como raíces, tallos, hojas, peciolo, etc. Se emplean fundamentalmente para obtener variación somaclonal y en la obtención de mutantes deseados, en estudios de resistencia y tolerancia temprana a estrés bióticos y abióticos.

Cultivo de Anteras, Polen y Ovocitos

Mediante estos se pueden obtener mutantes y plantas haploides, se explotan de forma cotidiana en la creación de nuevas variedades y somaclones, fundamentalmente de gramíneas.

Cultivo de células en suspensión

Cultivo en el que las células aisladas y agregados celulares crecen y se multiplican suspendidos en un medio líquido. Muy utilizado para la selección de variantes o mutantes, uso de fermentadores en la embriogénesis somática y semilla artificial, además en la producción de metabolitos secundarios tales como antibióticos, saborizantes, proteínas, vitaminas, bioinsecticidas, enzimas, etc, para fines farmacológicos y alimenticios.

Cultivo de protoplastos

Es el cultivo de células a las cuales les ha sido eliminada la pared celular por digestión enzimática, quedando solamente la membrana rodeando el citoplasma. Se utiliza en la selección de mutantes, hibridación somática e ingeniería genética.

2.3 Micropropagación

Esta técnica supera ampliamente a otras técnicas de propagación, posibilitando la obtención masiva de plantulas, las cuales deben estar sometidas a un control estricto de calidad para que puedan ser adaptadas con éxito a su lugar definitivo de siembra.

Es así que desde 1974 cuando Murashige propuso tres fases para la micropropagación de plantas, los investigadores han ido acumulando información y se han puesto de acuerdo para diferenciar cinco fases que logran una exitosa multiplicación (Pérez, 1998).

Fase 0: Comprende la selección de la planta madre con las características deseadas y la desinfección del material vegetal.

Fase I: Fase de iniciación en la cual se establece el cultivo inicial. Tiene como finalidad la adaptación del explante a las condiciones del cultivo *in vitro*.

Fase II: Se produce la multiplicación del material vegetal. Su objetivo es aumentar el número total de plantas que partan de una yema.

Fase III: Corresponde al enraizamiento. En esta etapa se debe obtener plantas autótrofas que sobrevivan a las condiciones de trasplante al suelo.

Fase IV: Transferencia final a las condiciones naturales o fase de acimatación.

Hay que tomar en cuenta que en el desarrollo de estas fases juega un papel muy importante, principios básicos indispensables que garantizan el éxito de los mismos, los cuales son:

a) Selección de Explante

Prácticamente se puede utilizar cualquier porción de las plantas; en primera instancia dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Para arribar a una selección del explante es recomendable comparar sistemáticamente varias

fuentes de células, tejidos u órganos antes de decidirse por alguna de ellas. Generalmente se recomienda utilizar plantas sanas y vigorosas y dentro de estas las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemas. De forma general se admite que son plantas jóvenes las que aportan los explantes más reactivos, ya que la potencialidad disminuye con la edad; este fenómeno se manifiesta particularmente en las plantas leñosas (Dodds y Roberts, 1982).

b) Desinfección de explante

La relación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban estos cultivos, constituye un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, los cuales se reproducen más rápidamente que las células vegetales, agotando de esta forma los nutrientes del medio de cultivo, además que liberan hacia este metabolitos tóxicos para el material vegetal.

La eliminación de los patógenos contaminantes debe realizarse antes de poner en contacto el explante con el medio de cultivo, comúnmente se utiliza el etanol 70% y el hipoclorito de sodio (NaOCl) de 1-3%. Con menor frecuencia se usa el hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 6-12% y el cloruro de mercurio HgCl_2 , 0,1-1,5%, se debe recalcar que este compuesto es demasiado tóxico y no es fácil removerlo del explante.

c) Los medios de cultivos

Mediante el medio de cultivo sintético se le debe proporcionar al explante, los requerimientos nutricionales esenciales: Sales inorgánicas, reguladores del crecimiento, vitaminas, fuentes de carbono y aminoácidos, en la proporción y dosis específicas para cada tipo de tejido cultivado (Cevallos, 1999).

Cuando se va a establecer un cultivo por primera vez, el procedimiento consiste en probar un medio previamente definido el cual se irá modificando al nuevo sistema vegetal. Generalmente la complejidad del medio aumenta a medida que disminuye el tamaño del explante a cultivar.

d) Condiciones ambientales de incubación

Es un requerimiento riguroso para el éxito de los cultivos *in vitro* que exige que los explantes sean sometidos a ambientes controlados de luz y temperatura, así como la humedad relativa acorde al objetivo de trabajo.

Por ejemplo en el cultivo de embriones y óvulos se recomienda una temperatura de 25 a 28°C, una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes de 40W y lámparas incandescentes de 25W que brinden entre 1000 y 4000 Lux de iluminación. El fotoperiodo varía en dependencia de la planta, el más utilizado es el de 16h luz (Ochoa, 1990).

Según a planteado Kitto (1997), la micropropagación es una industria joven con un excelente futuro, pero su incremento dependerá del desarrollo de nuevas técnicas para la automatización de los procesos y del mejoramiento de los sistemas de acimatación de las plantas (Pérez, 1998).

2.4 Medios de cultivo

Existen aproximadamente 260 medios cultivo publicados y muchas revisiones acerca de ellos así como su composición, estos difieren esencialmente por su composición general de sales (Cevallos, 1999). Como se explicó anteriormente es importante realizar pruebas o ensayos antes de determinar el medio de cultivo más adecuado para las exigencias del material vegetal, teniendo en cuenta factores como: el origen del explante, los compuestos nutritivos esenciales y los reguladores de crecimiento empleados (López, 1990).

Se conoce que las plantas en la naturaleza a través de las raíces se alimentan absorbiendo macronutrientes tales como sales de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. El medio de cultivo tiene estos elementos además de carbohidratos (usualmente sacarosa), para reemplazar el carbono, que la planta normalmente fija de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtiene mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento (López, 1990).

En general los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

I. Sales inorgánicas

a) Macronutrientes

Los tejidos en cultivos requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente: **N, P, K, Ca, Mg y S.**

El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato o iones de amonio, o la combinación de ambos iones.

El fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas NaH_2PO_4 ó KH_2PO_4 .

El potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza; es un catión que se agrega en forma de KCl , NO_3K , ó KH_2PO_4 .

El sulfato de magnesio (MgSO_4) satisface tanto el requerimiento de magnesio como de azufre.

El calcio se adiciona con CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, o la formación anhidra de cualquier sal.

El cloro está presente en la forma KCl ó CaCl_2 .

b) Micronutrientes

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: **Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo.** Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

El **Fe** es requerido para la formación de precursores de la clorofila y es adicionado en forma de quelato EDTA.

El **Mn** es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético.

II. Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que a bajas concentraciones actúan como reguladores del crecimiento (Vásquez y Torres, 1995). Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las más empleadas son:

Tiamina (Vitamina B1) se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0,1 a 30mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales.

Acido Nicotínico (Niacina)

Piridoxina (Vitamina B6) se añade como pirodoxina-HCl

Mio-inositol: no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.

Acido pantoténico: ayuda al crecimiento de varios tejidos.

Acido fólico: Disminuye la proliferación de tejido en la obscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico.

Riboflavina: es inhibidor del crecimiento de raíces.

Vitamina E: ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.

III. Reguladores del Crecimiento

En cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos:

a) **Auxinas:** ayudan a la elongación de las células.

AIB (ácido indolbutírico) ; **AIA** (ácido indolacético) se utilizan independientemente en un rango de 0,1 – 10mg/l.

ANA (ácido naftalenacético); **2,4D** (ácido 2,4 Diclorofenoxiacético); **PCA** (ácido paracloro fenoxiacético) se utilizan independientemente en un rango de 0,001 – 10mg/l.

La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente:

2,4D > ANA > AIB > AIA.

- b) **Citocininas:** promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: BA benciladenina; cinetina y zeatina, en concentración de 0,03 – 30mg/l. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias.
- c) **Acido Giberélico:** promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.
- d) **Acido absicico:** se utiliza en casos muy especiales, estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento.

IV Aminoácidos

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Estos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y a su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indica las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*:

La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor.

IV. Carbohidratos

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45g/l.

V. Agua

El agua utilizada para preparaciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada, de cualquier el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final.

VI. Agentes solidificantes

Comunmente se ha utilizado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- a) Con agua forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- b) El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- c) El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- d) No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Sin embargo hay que tener en cuenta otros tipos de compuestos que resultan menos costosos que el agar.

VII. Suplementos no definidos

Algunos de los suplementos utilizados han sido:

- a) Extracto de levadura
- b) Jugos y extractos de varios frutos (plátano, tomate, y agua de coco).
- c) Caseína hidrolizada (proteínas).
- d) Antioxidantes, como el ácido ascórbico, y
- e) Absorbentes como el carbón activado.

2.5 Reguladores de crecimiento

El término reguladores de crecimiento se usa con la finalidad de abarcar todos aquellos compuestos que no cumplen un papel nutricional en la planta pero que sin embargo, en pequeñas cantidades modifican el crecimiento y desarrollo de la misma, incluyendo compuestos naturales y sintéticos, es importante definir que los compuestos naturales son producidos en la misma planta y se las conoce con el nombre de fitohormonas, mientras que las que son producto de la obtención del hombre se las conoce como compuestos sintéticos similares a las hormonas (Vasquez y Torres, 1995).

Generalmente las sustancias de crecimiento naturales y sintéticas pueden ser clasificadas en tres grupos principales: **hormonas promotoras** del crecimiento conocidas

como las auxinas, las giberelinas, y las citoquininas: supuestas **hormonas promotoras** como el florígeno, la antesina, y el ácido traumático, cuyas estructuras aún no se conocen; y **hormonas inhibidoras** del crecimiento como el ácido abscísico (ABA), el etileno, los compuestos fenólicos y otros (Vázquez y Torres, 1995).

2.5.1 Auxinas

Es un término genérico que designa los compuestos caracterizados por su capacidad para inducir el alargamiento de las células del brote, la base la constituye el ácido indol-3-acético (AIA), que se produce en la planta y otros pueden ser el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) que son sintéticos.

Las auxinas sintéticas mencionadas anteriormente son relativamente más activas que las naturales, tienen la capacidad de inducir:

- división y alargamiento celular
- diferenciación del tejido vascular
- iniciación de las raíces
- formación de callos
- dominancia apical
- abscisión
- partenocarpia
- respiración y tropismos (Devlin, 1975).

Los órganos productores de auxina son los ápices de crecimiento de las hojas, los tallos, las yemas y las raíces, aunque esta sustancia se encuentra ampliamente distribuida por la planta. El transporte de la auxina se realiza fundamentalmente en dos direcciones: hacia la base o hacia el extremo superior de la planta; al primero se lo denomina basípeto y al segundo acrópeto, tienen como característica estos compuestos de ser producidos en un órgano y tener su función en otro.

La mayor parte de las plantas necesitan auxinas para conseguir una regeneración eficaz, esta necesidad no es constante, pues al producirse la iniciación de la raíz se necesita

una alta concentración de dicha hormona, mientras que el desarrollo de los primordios radicales requieren una baja concentración; por esta razón a veces la iniciación radical se lleva a cabo *in vitro* y la iniciación de los primordios radicales se realiza *in vivo* (Pierik,1990).

Existen muchas evidencias de que las auxinas procedentes del tallo influyen mucho en la inhibición de la raíz; ya que la eliminación de yemas y hojas jóvenes ambos ricos en este regulador, inhiben el número de raíces laterales formadas; se puede plantear que la sustitución de este regulador por estos órganos con frecuencia restituye la capacidad de la planta de formar raíces. Existe una diferencia importante en los efectos de estas auxinas exógenas sobre la elongación de la raíz y en el desarrollo temprano se observa una promoción.

La influencia que ejerce la yema apical en el desarrollo de las yemas laterales hace que estas últimas no se desarrollen y permanezcan dormidas cuanto más cerca se encuentren del extremo apical. Este fenómeno se conoce con el nombre de dominancia apical (Vasquez y Torres, 1995).

2.5.2 Giberelinas

Esta fitohormona fue descubierta por fitopatólogos japoneses en la década de 1930 al surgir una enfermedad en el arroz que provocaba en las plantas características morfológicas diferentes a las de las plantas normales, estas plantas con frecuencia eran incapaces de sostenerse por sí mismas y terminaban por morir debido a la combinación de daños causados por la debilidad y el parasitismo (Salisbury, Ross, 1994)

Las giberelinas (GA3) son una familia de compuestos que son sintetizadas en en puntos de crecimiento como embriones, meristemos o tejidos en desarrollo y son transportadas por el xilema y el floema. Se han sintetizado varias giberelinas a partir de la planta, pero solamente se encuentran disponibles en el mercado dos o tres compuestos activos. Los principales efectos producidos por la giberelina son:

- Crecimiento de las plantas

- Espigamiento
- Floración

Como acción contraria debe señalarse:

- Inhibición del crecimiento normal de raíces y tallos en el cultivo de callos
- Partenocarpia
- Germinación
- Control de la senescencia.

En los cultivos *in vitro* se usa generalmente para las plantas superiores y se usa para acelerar el crecimiento de órganos ya formados. En la mayor parte de los casos son sustancias no esenciales en el cultivo *in vitro*, además se debe tener en cuenta que es un compuesto muy sensible al calor y luego del autoclaveado se pierde un 90% de su actividad biológica (Pierik,1990).

La giberelina actúa en el crecimiento de las plantas enanas las cuales presentan entrenudos cortos sin perder el número natural de estos, esto se debe a la mutación de un gen único que provoca un bloqueo de la vía metabólica de la giberelina, lo cual ocasiona que estas plantas tengan una concentración muy baja de esta hormona. Para lograr respuesta en la elongación de los entrenudos se debe aplicar giberelina exógena determinando la dosis adecuada de acuerdo a la planta o tipo de explante.

La giberelina actúa de forma independiente al AIA en varios procesos, tales como la movilización de los glúcidos de reserva en la semilla, el espigamiento y la floración, pero por otra parte cuando actúan asociadas su efecto es aditivo, además se ha comprobado que el AG3 puede producir alargamiento del tallo de chícharo en presencia de concentraciones inhibitorias de AIA. Se puede decir que las giberelinas actúan en forma sinérgica con las auxinas en la inducción del alargamiento celular, sabiendo que la planta sometida al AG3 produce una enzima que transforma el triptófano en AIA (Vásquez y Torres, 1995).

2.5.3 Citoquininas

La citoquininas forman un grupo de fitohormonas cuya acción característica es la estimulación de la división celular, estos compuestos son principalmente sintetizados en las raíces de las plantas. desde donde son traslocados hacia los brotes y hojas, su transporte es acrópeto (Cevallos, 1999).

Son compuestos derivados de la adenina, algunos de los cuales se han encontrado en los tejidos de muchas especies vegetales como fitohormonas (tales como la cinetina y la zeatina) y otros son moléculas sintéticas (como la bencilaminopurina). Estos son compuestos de reciente descubrimiento por lo tanto su conocimiento es menos completo y sus vías biosintéticas aun no han sido definidas. (Vásquez y Torres, 1995).

Estos compuestos se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y desarrollo; siendo las más comunes: kinetina (kin); 6 bencilaminopurina (6 BAP); n-2 isopenteniladenina (2ip); éstas estimulan la división celular, sobre todo si están acompañadas de las auxinas. Skoog (1971), citado por Rodríguez, (1999) encontró que al cultivar tejido parenquimático de tallos de tabaco, soya u otras dicotiledóneas en un medio con agar, auxinas y los nutrientes adecuados, se forma una masa de células indiferenciadas llamada generalmente callo; al agregar a este medio de cultivo una citoquinina se promueve aún más la división. Lo anterior demuestra la necesidad de determinar el balance hormonal adecuado para lograr el objetivo propuesto; respecto a esto Salisbury y Ross (1994) plantean que al cultivar determinado tejido *in vitro* manteniendo una alta relación de citoquininas-auxinas se producen células meristemáticas en el callo; estas se dividen y generan otras que se diferencian para formar yemas, tallos y hojas; pero si se reduce esta relación hormonal, entonces es favorecida la formación de raíces; seleccionando una relación adecuada se puede lograr tanto el crecimiento de los órganos aéreos como de la raíz o de ambos.

2.5.4 Etileno

Se sabe que tanto el cultivo de órganos como el de callos pueden producir etileno, una hormona gaseosa (Mele *et al.* 1982, citado por Pierik, 1990). Esta interviene en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, esta se asemeja a las demás hormonas por el hecho de que en pequeñas cantidades puede causar intensos cambios en las actividades fisiológicas de las plantas, esta se mueve por difusión de su lugar de síntesis, su repuesta es variable entre

especies, comúnmente se utiliza para la producción *in vitro* se utiliza para la producción de tubérculos de papa

El modo de acción del etileno consiste en que muchos efectos del mismo se acompañan de un incremento en la síntesis de enzimas y el tipo de enzima depende del tejido blanco, cuando el etileno estimula la abscisión aparece celulasa y otras enzimas que degradan la pared celular (Salisbury, Ross, 1994).

Algunos de los efectos fisiológicos provocados por las auxinas también pueden ser producidos por la acción del etileno, ya sea solo o en colaboración con estas.

Los principales efectos son:

- el geotropismo
- la dominancia apical
- la abscisión
- la regulación de la cantidad de alfa-amilasa
- la regulación del letargo de algunas semillas
- la maduración de los frutos.

El etileno bloquea el movimiento normal de la auxina, y se detectó en pruebas que el efecto que este tiene se da en exposiciones largas al mismo más no en exposiciones cortas, que no tienen efecto en el transporte longitudinal de las auxinas.

Por otra parte se ha encontrado que las altas concentraciones de auxina inducen la formación de etileno en los frutos, las semillas, las raíces y las hojas de todas las plantas en general y estos en interacción aceleran la abscisión, esto definiría que el AIA regula la formación del etileno, el cual se encuentra en grandes cantidades en zonas donde es común la presencia del AIA.

2.5.5 Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un compuesto simple que se sintetiza en plastidios y cloroplastos esto tiene lugar en las hojas adultas, de donde se traslada rápidamente al ápice foliar por el floema y a las raíces y brotes por el xilema.

El modo de acción del ABA consiste en una respuesta a la deficiencia de agua que causa un estrés hídrico y pérdida de turgencia que activa los genes que controlan la síntesis del ABA el cual es transportado a las hojas para cerrar los estomas, también puede actuar en posible defensa contra el estrés causado por el frío y los niveles de salinidad (Salisbury, Ross, 1994).

Esta es una sustancia inhibidora del crecimiento y contrarresta la acción de las auxinas, las giberelinas y las citoquininas y viceversa.

De los efectos del ABA pueden numerarse los siguientes:

- Acelera la abscisión y la senescencia de un buen número de plantas
- inhibe el crecimiento
- inhibe la germinación de las semillas fotosensibles
- Contrarresta la síntesis de alfa-amilasa inducida por la giberelina en las capas de alcurona
- inhibe la inducción de la floración en algunas plantas
- induce el reposo o letargo de las yemas y en cultivos *in vitro* (se usa en casos muy especiales) como por ejemplo para estimular la sincronización de la embriogénesis somática en ciertos cultivos.

2.6 Antecedentes de la utilización de sustancias bioestimulantes

Las principales condiciones nutricionales y ambientales para el crecimiento ilimitado de células, tejidos y órganos han sido establecidas en los últimos 40 años gracias a las aportaciones de numerosos investigadores (Vázquez y Torres, 1995).

Siguiendo los pasos determinados para la obtención de buenos resultados en los cultivos de tejidos, está en segundo lugar, luego de la obtención de un buen explante la determinación del medio de cultivo apropiado (Hidrobo, 2000), ésto es importante ya que cuando un órgano

es cultivado en medios sintéticos, el patrón de desarrollo puede continuar de manera semejante al que tenía en la planta o cambiar totalmente, sin embargo está en dependencia de los bioestimulantes presentes en el medio, que podrían favorecer sólo el desarrollo de los primordios foliares o radiculares del embrión (Ochoa, 1990).

Casi siempre, crecimiento significa aumento de tamaño. A medida que crecen los organismos multicelulares a partir del cigoto, no solo aumentan en volumen, sino también en peso, número de células, cantidad de protoplasma y complejidad.

En las plantas, el crecimiento se restringe a determinadas zonas que tienen células reproducidas recientemente por división celular en un meristemo, hay que tener en cuenta que la división celular en los meristemas no significa aumento de tamaño, pero si los productos celulares de la división incrementan u originan el crecimiento (Salisbury, Ross, 1994).

Esto es importante para poder entender que las plantas son organismos complejos, en donde la diferenciación de órganos está bien definido por la información genética de cada célula, teniendo en cuenta que en el proceso de división celular ocurren diversos procesos bioquímicos y en el caso de las hormonas a diferentes concentraciones son las responsables de la inducción de ciertos órganos.

2.6 Utilización actual de Bioestimulantes

En la actualidad muchos investigadores han hecho importantes avances en diferentes campos de la ciencia ayudados de las técnicas de cultivo de tejidos, en la cual intervienen numerosas ciencias que se interrelacionan por la complejidad de los procesos, los bioestimulantes tienen un papel importante ya que en diferentes concentraciones inducen y regulan el crecimiento, pudiendo mencionar su utilización en:

2.6.1 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis es el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos y que dependen básicamente de la actividad y expresión de ciertos genes. Tales procesos se desarrollan y relacionan íntimamente con múltiples factores que son

imposibles de definir aisladamente ya que interactúan en cada fenómeno morfogenético (Hidrobo, 2000).

No solo implica los cambios observables en la forma y estructura, sino también en los procesos que controlan el desarrollo de los órganos y tejidos, es por todo esto que podemos definirla como todo el conjunto de fenómenos relativos a la diferenciación y desarrollo de los tejidos y órganos vegetales (Hidrobo, 2002).

En la planta adulta hay establecidas correlaciones hormonales y nutricionales que posibilitan un funcionamiento armónico del sistema. En determinadas zonas de la planta se sintetizan y traslocan diferentes hormonas que van a actuar de forma específica en los tipos celulares localizados en todos los puntos del organismo (Montes, 1994).

En el cultivo de tejidos, el control de la morfogénesis se realiza a través de la incorporación exógena de compuestos hormonales y otros elementos nutricionales. Al ser colocado un fragmento de tejido en un medio nutritivo, posibilita la liberación de células al control a que están sometidas en el organismo vivo y se readquiere la capacidad de división celular (desdiferenciación) (Roca, 1991).

La morfogénesis conduce a dos eventos diferentes: La Organogénesis y la Embriogénesis somática

2.6.1.1 Organogénesis

La formación de órganos *de novo* se puede inducir reproduciblemente a través de la manipulación química de los medios de cultivo, como se citó anteriormente el desarrollo organizado ocurre como consecuencia de la interacción cuantitativa entre reguladores del crecimiento, especialmente auxinas y citoquininas y un balance de los componentes del medio que determinan el curso del desarrollo.

Es un hecho ampliamente demostrado que la formación de órganos *in vitro*, a partir de células y tejidos vegetales se realiza *de novo* sin depender de la preexistencia de



meristemos iniciales (Thorpe, 1997). La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o partir de callos.

Los explantes *in vitro* seguirán un proceso morfológico por cualquiera de las rutas generales; esto es por medio de meristemoides, subsecuentemente primordios, brotes y finalmente la formación de raíces adventicias o bien a través de la embriogénesis somática. En cualquiera de los dos procesos, la naturaleza que controla el mecanismo de diferenciación sigue siendo, a la fecha, una de las más importantes incógnitas de la biología moderna (Villalobos, 1990).

Los brotes son básicamente estructuras monopolares, los cuales presentan conexiones vasculares con la masa del callo o del tejido. En muchos casos pueden desarrollarse raíces adventicias en el extremo basal de dichos brotes, dando lugar a estructuras aparentemente bipolares.

La organogénesis es de forma general, repetitiva; los brotes apicales generan adicionalmente brotes o meristemos apicales en las axilas de las hojas, y los ápices radicales producen raíces secundarias a lo largo de las zonas más maduras (Cevallos, 1999).

El cultivo de callos, el cultivo de células en suspensión y el cultivo de ápices y meristemos en el proceso por organogénesis son factores importantes en los que intervienen en sus diferentes etapas los bioestimulantes. en el caso de la formación de callos lo más importante es la totipotencia de las células que tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces y embriones somáticos dependiendo fundamentalmente del balance auxina-citocinina en el medio de cultivo, además para la formación del callo es necesario usar cualquier auxina potente, otro factor importante es el efecto que tienen en la pared celular induciendo la división celular (Barranca, 2001).

En el caso de meristemos, ápices o yemas se necesita un balance apropiado entre auxinas y citoquininas, este balance está determinado por las concentraciones endógenas de ambas hormonas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y el tipo de explante. Se puede hacer la siguiente división, en relación con el crecimiento (Pienik, 1990):

1. Cultivos que no necesitan ni auxina y ni citoquinina.
2. Cultivos que necesitan solo auxina.

3. Cultivos que necesitan solo citoquininas.
4. Cultivos que necesitan auxina y citoquinina.

Las giberelinas han sido adicionadas sólo en el 17% de los casos. al parecer en la mayoría de los explantes se sintetiza suficiente cantidad de estas hormonas (Jiménez. 1998).

2.6.1.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin necesidad de la fusión de gametos (Barranca. 20001).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno, estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales. Este método es considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*.

Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan el proceso siendo aun limitado el número de especies en las cuales, se reporta una embriogénesis somática eficiente que permite un uso aplicado del método.

En la actualidad la embriogénesis somática es posible inducirla en mas de 200 especies vegetales procedentes de 86 géneros y de 34 familias siendo esto bastante común en las siguientes familias: Ranunculaceas, Rutaceas, Solanaceas, Umbelíferas, y Gramíneas (Vasil, 1994).

El desarrollo de un sistema experimental para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática incluye los siguientes pasos:

- Inducción de los embriones somáticos
- Desarrollo de los embriones somáticos
- Proliferación
- Maduración
- Germinación y conservación de plantas

En consecuencia el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis).
- Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que puede ser separada fácilmente de ésta.
- Es una estructura bipolar, radical-apical y cotiledonar.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Morfológicamente un embrión somático es muy similar a uno cigótico, sobretodo en su desarrollo desde proembrion, fase globular, corazón, torpedo, y fase cotiledonar o embrión maduro, esto para el caso de las especies dicotiledóneas (Messa,1999).

Existen dos patrones del desarrollo de los embriones somáticos:

a. Embriogénesis directa

Los embriones se forman a partir del propio tejido del explante, sin pasar por la fase de callogenesis. Esto ocurre a través de *células proembriónicas determinadas*, donde las células están listas para iniciar el desarrollo embriónico y necesitan solo ser activadas.

b. Embriogénesis indirecta

En este tipo de embriogénesis, primero se forma un callo a partir del cual se originan después de los embriones. Las células a partir de las cuales se forma los embriones, reciben el nombre de células determinadas embriónicas que producen embriones cuando son inducidas a ello mediante la incorporación de reguladores del crecimiento (células inducidas embriónicamente determinadas).

La reacción del explante para la embriogénesis esta determinada por la edad de este, así como la concentración de auxina empleada. Una fuerte correlación ha sido establecida entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de dediferenciación y diferenciación *in vitro*.(Carimi, 1994 citado por Hidrobo, 2000).

En la embriogénesis existen factores importantes que deben ser considerados para su desarrollo, estos son: tipo de explante, medio de cultivo y condiciones del medio ambiente.

La mayoría de los sistemas embriogénicos requieren una concentración alta de auxina en el medio para la inducción de los embriones (Evans *et al.*, 1981).

Actualmente se postula la hipótesis, que relaciona que el nivel endógeno de auxina provoca la polaridad de la masa embriogénica, la cual es indispensable para la inducción de la embriogénesis; las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad, al difundirse dentro de la masa provocando la inhibición del proceso embriogénico iniciado por la auxinas endógenas. Esta hipótesis postula que el papel de las auxinas es doble. (Núñez, 2000).

Debe recordarse que las auxinas afectan las células diferenciadas, induciendo la dediferenciación de una parte y en la formación de primordios de embriones por otra.

Puede comprenderse esta aparente contradicción, si se considera que una vez formados los agregados pro embriogénicos, éstos se vuelven insensibles a las auxinas. La sensibilidad a auxina se reestablece en un estado posterior, cuando los embriones detienen su programa diferenciativo y se revierten hacia un tejido desorganizado en presencia del bioregulador. (Santos, 1998).

El rol de las citoquininas esta menos claro en la primera fase de inducción de los embriones somáticos, aunque normalmente se adicionan algunas de ellas a este medio. Ellas pueden favorecer la producción de callo embriogénico. También se ha señalado que pueden desempeñar un papel en la maduración y germinación de los embriones somáticos (Barranca, 2001).

El ácido giberdico (AG3) también se ha incorporado al medio, con el fin de ayudar a la maduración normal y a la germinación de los embriones somáticos en *Panicum maximum* (Salisbury y Ross, 1994).

El ácido abscísico (ABA) actúa como represor de la embriogénesis somática y reductor de la frecuencia de anomalías en el desarrollo, como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz, además, se ha

observado que el balance entre el AG3, zeatina y ABA controla el desarrollo y la maduración del embrión.

El etileno desempeña un papel importante en la regulación de la embriogénesis somática en el cultivo de hojas de *C. Canephora*.

2.7 Oligopectatos

Los oligopectatos son polisacáridos complejos que pueden funcionar en las plantas como señales moleculares que regulan el crecimiento, la diferenciación y la adaptación al ambiente (Cote y Hahn, 1994). Hace poco tiempo se descubrió que las oligosacarinas (definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular) son mensajeros químicos, con propiedades reguladoras específicas que además de interferir en los distintos mecanismos de defensa de la planta, controlan la morfogénesis *in vitro*.

Las oligosacarinas se desprenden de la pared celular por la acción enzimática y pueden actuar como reguladores no solo "disparando" los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos y el estrés ambiental, sino también regulando la tasa de crecimiento y diferenciación para producir raíces, flores y yemas vegetativas (Pierik, 1990), de igual forma se consideran hormonas endógenas de las plantas ya que regulan la síntesis y acción de ciertas fitohormonas. (Rodríguez, 1999).

Investigaciones realizadas por Rodríguez (1999), demostró que las oligosacarinas son biológicamente activas a muy bajas concentraciones y son capaces de controlar diferentes funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación, la defensa contra enfermedades, el control de diversas funciones elicitorias y la adaptación al ambiente (Cote y Hahn, 1994).

El efecto de los oligosacáridos sobre la orgánogénesis es el más sensible de los reportados hasta el momento según lo señaló Valdés (1997).

Ciertos oligosacáridos fragmentados enzimáticamente por la acción de la celulasa a partir de xiloglucano (XG) *in vitro*, actúan como reguladores del crecimiento. El primer

oligosacárido del xiloglucano identificado como oligosacarina fue el XG9, antagonista del crecimiento inducido por 2.4-D en segmentos de epicótilo de guisante (Cevallos, 1999).

En Cuba, el grupo de oligosacarinas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) trabaja en la obtención de oligopectatos con actividad en la morfogénesis *in vitro*, a partir de la degradación enzimática de la pectina de la corteza de los frutos de los cítricos (Cabrera et al, 1997).

Con base a estos compuestos se han hecho en Cuba varios estudios sobre los beneficios que brindan en diferentes tipos de medios para una variedad de cultivos, entre los cuales se puede citar investigaciones realizadas en cítricos al utilizar pectimorf en concentraciones bajas para cultivar óvulos; obtención de raíces a partir del cultivo de embriones somáticos de naranjo agrio los cuales se trataron con pectimorf el cual causo un desarrollo vigoroso, con una marcada tendencia a formar multiembriones cuando se empleo combinado con el 6 BAP; en ausencia de la citoquinina se estimula el desarrollo radical (Redondo, 1995).

Con el objetivo de conocer la actividad biológica del oligopectato "Pectimorf" en la calidad del polen de papa, se emplearon cinco medios de germinación con diferentes concentraciones de este producto (10 mg.L⁻¹ de Pectimorf). Se colectaron flores de papa (*solanum tuberosum. L.*) la variedad Desirée en horas tempranas de la mañana en el momento de la antesis.

No se observó diferencias significativas entre los dos años de estudio para el porcentaje de germinación y la longitud del tubo polínico. Se pudo constatar que la adición al medio de estos biorreguladores como complemento, estimuló la germinación del polen, así como el crecimiento de los tubos polínicos; y como sustitutos de las sales también estimuló la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos, con mayor favorecimiento en aquellos desarrollados en el medio con Pectimorf (González *et al.*, 2001).

2.7.1 Pectimorf

El Pectimorf es un biorregulador cubano, cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos de origen péctico. Este compuesto es capaz de inducir y desarrollar el enraizamiento, estimular el crecimiento de los callos, incrementar de forma notable el desarrollo y vigor de las vitroplántulas en diferentes cultivos. El empleo de este nuevo producto Cubano en el cultivo *in vitro* permitirá validar su acción como regulador del crecimiento, y posibilitará hacer más eficiente este proceso (More y González, 2001).

Los aspectos que más resaltan del PECTIMORF son:

- Estimula el crecimiento y diferenciación celular de diferentes especies vegetales (caña de azúcar, café, cítricos, papa, tomate, ajo, tabaco, plátanos y bananos, arroz).
- El efecto biológico del PECTIMORF en los medios de cultivo de células vegetales *in vitro* puede ser del tipo auxínico o citoquinínico en dependencia del balance hormonal en el medio.
- Los resultados obtenidos hasta la actualidad evidencian que las células vegetales cultivadas *in vitro* en presencia de este producto no cambian su información genética. Es conocido que algunas fitohormonas inducen variación genética en algunos cultivos.
- Puede sustituir parcial o totalmente las hormonas tradicionales en los esquemas de micropropagación de diferentes cultivos. En todos los casos ensayados se observó una estimulación del vigor de los brotes vegetativos obtenidos en presencia de estos oligosacáridos y un estímulo marcado del enraizamiento. En algunos cultivos se comprobó que este factor incrementa el porcentaje de supervivencias de las vitroplántulas al pasar del medio estéril a la fase de adaptación en vivero.

- Variedades recalcitrantes al cultivo *in vitro* manifiestan un comportamiento satisfactorio en presencia de PECTIMORF, ejm. La variedad Ja 60-5 de caña de azúcar.
- Estimula la desagregación celular durante la obtención de suspensiones celulares aumentando la eficiencia del proceso.
- Las aspersiones foliares estimulan el crecimiento de las plantas.
- La inducción de respuestas defensivas en las plantas al aplicar foliarmente este producto evidencia que la planta percibe estas biomoléculas en la superficie foliar y que la señal mediada por éstos es traslocada a través del vegetal.
- Las concentraciones óptimas del PECTIMORF en los medios de cultivo para obtener una respuesta biológica satisfactoria oscilan entre los 5 y 20 mg/l, rango similar utilizado para las hormonas tradicionales al expresarla en unidades de concentraciones molares. Este bioestimulante presenta ventajas de solubilidad en el medio acuoso utilizado para preparar los medios y su estabilidad en las condiciones utilizadas para esterilizar los medios.(Cabrera. 2000)

2.8 Brasinoesteroides

En la década de los 60 fue descubierto un grupo de sustancias esteroideas reguladoras del crecimiento vegetal en granos de polen de varias especies, cuyo componente activo se lo denominó brasinólido (Rodríguez, 1999).

Poco tiempo después se han descubierto de forma natural y por síntesis química numeroso análogos de estas sustancias llamados brasinoesteroides (Rodríguez, 1999)..

Los brasinoesteroides son un grupo de polihidroxiesteroides que existen naturalmente y que son derivados del 5 alfa colestano; en la actualidad químicamente se han identificado aproximadamente 30 brasinoesteroides de fuentes vegetales (Messa.1999)

Estudios recientes sobre la distribución de estos compuestos sugieren que los mismos al igual que las giberelinas y las auxinas están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto en plantas superiores como inferiores (Núñez, 1996).

Este nuevo grupo de reguladores tiene diversos efectos sobre el crecimiento de algunas plantas y se plantea que actúan de forma parcial al incrementar la sensibilidad de los tejidos a las auxinas, además pueden ser capaces de estimular el alargamiento celular por su acción sinérgica con las auxinas; pero aún queda por demostrarse la importancia de las brasinas en fisiología vegetal, así como su mecanismo de acción (Salisbury y Ross, 1994), ya que este tipo de compuesto puede actuar como auxinas en un momento, y como giberelinas o citoquininas en otro (Núñez, 1996).

Los efectos positivos de los brasinoesteroides sobre la elongación celular de los tejidos se han detectado en muchas especies vegetales, pero en pocas se han estudiado con profundidad (Rodríguez, 1999).

Al probar la actividad Biológica del brasinólido en comparación con las auxinas en diversos bioensayos realizados por Yopp et al. (1981), el brasinoesteroide manifestó respuestas similares a las mostradas por las auxinas como el incremento de la masa fresca del tejido y el alargamiento celular; sin embargo no ejerció efecto alguno sobre la inhibición del crecimiento de la yema lateral en plantas decapitadas, ni sobre la formación de raíces en las plantas probadas; la aplicación simultánea de auxinas y brasinoesteroides en determinados experimentos efectuados demostró el fuerte efecto sinérgico que existe entre ambos compuestos.

La aplicación simultánea del brasinoesteroide (BR) y AIA en los bioensayos del hipocótilo del frijol y de la elongación de segmentos de epicótilo de frijol y la elongación y ganancia en masa fresca del guisante enano demostraron el fuerte efecto sinérgico que existe entre ambos compuestos (Rodríguez, 1999).

Según Mandava (1988) la estimulación de la elongación provocada por los brasinoesteroides ocurre en presencia de la luz pero no en la oscuridad; en este sentido han

demostrado que la acción del brasinoesteroide puede estar relacionada con la regulación del crecimiento mediada por fotocromos.

En Cuba no solo se están produciendo sustancias de este tipo sino también otras que están dando buen resultado en la fisiología de la planta *in vitro* y que están ligadas directamente con la mejora de la economía nacional.

2.8.1 Biobras-16

Productos de la serie BIOBRAS. son formulaciones cuyos principios activos son nuevos análogos de Brasinoesteroides sintetizados en Cuba. Dentro de esta serie el BB-6 y el BB-16 ha mostrado una importante actividad biológica como promotores del crecimiento vegetal aumentando los rendimientos y la calidad de las cosechas en varios cultivos de interés económico, lo cual conllevado a la extensión nacional de la aplicación del producto (Jomarrón,).

En la línea de cultivo *in vitro* y en los trabajos de las biofrábricas, además de los productos anteriormente mencionados se incluyen entre otros CR44, MH5, MRC1 con resultados positivos fundamentalmente en la fase de adaptación de las plántulas, en el porcentaje de germinación y vigor de las plántulas de papaya y cítricos; así como en la evaluación citogenética e isoenzimática donde demostró que los mismos no producen variabilidad genética.

Estas investigaciones se llevan a cabo por un grupo multi e interdisciplinario con la participación de más 10 Instituciones de prestigioso aval investigativo en las esferas agrobiológica y toxicológica del país, logrando abarcar las vertientes fundamentales siguientes: Síntesis química, validación agrobiológica (*in vitro*, en macetas, pequeñas parcelas experimentales y extensión agrícola a nivel nacional), estudios toxicológicos, registro, producción, promoción y comercialización del producto.

Desde el punto de vista científico, la síntesis de Brasinoesteroides y de nuevos análogos de los mismo coloca al país Cubano en un lugar cimero en América Latina ya que esta temática es abordada solo por países desarrollados entre los que se encuentran Canadá, Japón, Estados Unidos y Alemania. La comercialización de estos productos en el extranjero

constituye una fuente de divisas para el laboratorio y podría convertirse en una fuente de ingreso de divisas para el país (Coll, *et al.*, 199..)

2.9 Rinobacterias

Por más de 100 años la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas ha sido considerada como la más eficiente forma de transformación del N₂ atmosférico en nutriente aprovechable para las plantas: sin embargo, durante las dos últimas décadas el estudio de la fijación biológica del Nitrógeno por bacterias asociativas o de vida libre cobra cada vez mayor atención por parte de los investigadores en su afán de encontrar alternativas a la creciente demanda de fertilizantes minerales que como es bien conocido atentan contra la vida tanto de los seres humanos como de las propias plantas y animales, provocando además un desequilibrio ecológico que amenaza con ser irreversible.

Unido a esto los microorganismos rizosféricos juegan un importante papel en la agricultura, ya que poseen la capacidad de descomponer y reciclar elementos que son inutilizables en su estado natural e incluso establecer entre sí relaciones que pueden conducir a la protección contra patógenos.

Por esto actualmente se dedica particular atención al estudio y esclarecimiento de las interacciones plantas-microorganismos rizosféricos, trabajo que ha sido desarrollado de forma gradual y ascendente comprobándose que estos microorganismos son capaces de influir positivamente sobre la germinación de la semilla y el desarrollo posterior de las raíces

Entre los microorganismos de vida libre que se emplean para la biofertilización se encuentra el género *Azospirillum*, el cual ha sido objeto de estudio desde la década del 70 por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y estimular el crecimiento vegetal, permitiendo de esta forma el desarrollo más saludable y económico de las plantas. Es por ello que cobra auge el aislamiento y caracterización de cepas de este género, empleando metodologías cada vez más eficaces que sustituyan el trabajo engorroso de los métodos tradicionales.

En el presente trabajo un total de cuarenta cepas bacterianas se aislaron, empleando el modelo Microcosmos, a partir de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari, doce de estas identificadas como pertenecientes al género *Azospirillum*, por combinación de métodos tradicionales y serológicos de aglutinación en portaobjetos e inmunodifusión doble. Se realizó la caracterización de las mismas en cuanto a reducción de acetileno y producción de ácido indolacético (AIA). Las doce cepas mostraron actividad reductora del acetileno; sin embargo, solo presentaron una capacidad para reducir el acetileno de forma consistente e importante 5 de estas cepas (41.66%), igualmente se comprobó que producen AIA.

Para la identificación se pudo comprobar que los métodos serológicos corroboraron los resultados obtenidos por los métodos tradicionales. Doce de las cepas respondieron a la aglutinación en portaobjeto de forma positiva, aunque existieron diferencias entre ellas en cuanto a la intensidad de la reacción, se logra una alta discriminación para este género bacteriano con respecto a otros que habitan también la rizosfera de cultivos de interés económico, como es el caso del control negativo empleado *P. cepacia* 0057.

2.10 Perspectivas de la utilización de las sustancias bioestimulantes en el Ecuador para la producción de vitroplantas

La perspectiva que se presenta para la utilización de compuestos bioestimulantes en el Ecuador, siguiendo el ejemplo emprendedor de Cuba, son muy alentadoras ya que con constante investigación para satisfacer las necesidades cubanas se ha podido consolidar varias técnicas que han mejorado la industria en biotecnología en base a las demandas agrícolas.

Siendo el Ecuador un país netamente agrícola que tiene como ventaja una diversidad de climas podría invertir en investigaciones que favorezcan a dicho sector, teniendo como incentivo el constante desarrollo en la tecnología y la constante demanda de productos agrícolas en abundancia y con mejor calidad, capacitando así profesionales que puedan trabajar y desarrollar la biotecnología ya implantada en varios cultivos intensivos.

2.11 Algunos resultados en cultivos de interés comercial

En los diversos experimentos que se han realizado en cultivos de interés comercial, se puede citar los siguientes.

Según los resultados obtenidos por Rodríguez (1999), en las diferentes etapas del cultivo de tejidos del plátano (*Musa sp*), analizó la etapa de multiplicación el cual tiene como objetivo fundamental elevar el número de individuos.

Obteniendo así frente a un testigo que contenía sales solo del medio MS, mayores valores en cuanto al número de brotes y a esto debe sumarse un bajo valor del número de raíces formadas. Teniendo en cuenta que el testigo falla en la obtención alta de individuos además de que se produce un estímulo en la formación de raíces, lo que no resulta beneficioso.

Los tratamientos que dieron resultado presentaban T1 (0.65mg. L⁻¹ AIA + 4mg. L⁻¹ BAP) (testigo) y T4 (0,65mg. L⁻¹ AIA + 2mg. L⁻¹ 6 BAP + 0.01mg. L⁻¹ BB-6), recomendando así el empleo de la menor concentración de BB-6 con reducción a la mitad del 6 BAP, manteniendo constante el AIA.

Se obtuvo que la utilización de estos compuestos bioactivos son una alternativa más económica, con un ahorro de \$5925 para la propagación *in vitro* de un millón de plántulas de plátano, ya que también mantiene un elevado porcentaje de sobrevivencia (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de costos entre las sustancias bioactivas y los reguladores del crecimiento tradicional

Trat.	Necesidades (g)				Costo(USD)				Total	Ahorro
	AIA	6BAP	BB 6	Pectim	AIA	6BAP	BB 6	Pectim		
T-1	162,5	1000	-	-	379	11800	-	-	12179	-
T-4	162,5	500	2,5	-	379	5900	75	-	6254	5925
T-5	162,5	500	12,5	-	379	5900	375	-	6654	5525
T-7	81,2	1000	-	2500	189,5	11800	-	12,75	12001,75	177,25
T-8	-	1000	-	2500	-	11800	-	12,75	11812,17	366,25

Otros resultados son los obtenidos en el número de brotes y el número de raíces por explante, diferenciando según los resultados alcanzados en este trabajo, la utilización de 0,65mg. L⁻¹ AIA, 2mg. L⁻¹ 6 BAP, y 0,01mg. L⁻¹ BB-6 (T4) que pudiera ser aplicado en uno de los subcultivos finales con el objetivo de elevar el número de individuos en el último periodo, donde estos tienden a disminuir, y llevar a la fase de enraizamiento plántulas de alta calidad para así analizar el comportamiento de las mismas en diferentes combinaciones de BB-6 durante la última de las fases llevadas a cabo *in vitro*.

Además se pudiera considerar futuras investigaciones donde se analicen los efectos que causan estos biorreguladores de forma continua en un número mayor de subcultivos durante la fase de multiplicación.

Los tratamientos en los cuales se empleó Pectimof (T7 y T8) muestran valores elevados en cuanto al porcentaje de sobrevivencia y altura de las plántulas para ambos subcultivos: sin embargo, no produjeron efectos positivos sobre la producción de brotes en ninguno de los casos ya que más bien se observó crecimiento en la longitud dado por el alargamiento celular y no en el número de individuos por lo que bajo condiciones similares de trabajo no se recomienda su uso para la producción de vitroplantas de plátano.

Según un informe de estudios realizados por diferentes universidades en la utilización del Pectimorf en diferentes cultivos de interés comercial, en el Café (*Coffea arabica*) se logró en la inducción de calogénesis *in vitro* los siguientes resultados:

Para este estudio se diseñaron experimentos, para evaluar el efecto combinado del oligalacturónico con auxinas (2,4-D) y citoquininas (Kinetina en el testigo) tradicionalmente utilizadas para provocar dicho efecto. Se usó el medio de cultivo MS suplementado con: tiamina, inositol, cisteína, y sacarosa con un pH de 5,7.

Los resultados morfológicos y bioquímicos de los callos obtenidos en los tratamientos, fueron superiores al testigo (MCR₁) 1,88, (MCR₂) 3,76, y (MCR₃) 7,52 yM, con oligogalacturónidos en el contenido de proteínas totales, así como el crecimiento de la masa

Los resultados presentados justificaron de forma constante, la sustitución de las citoquininas por los oligogalacturónidos en el proceso de la embriogénesis *in vitro* del café (*Coffea arabica*).

III. CONCLUSIONES

1. La presencia del BIOBRAS-16 y el PECTIMORF en los diferentes medios de cultivo han utilizado en varios ensayos demostrado tener efectos favorables en la sustitución de los reguladores del crecimiento tradicional.
2. En diferentes procesos de micropropagación de plantas con las sustancias bioactivas utilizadas existe la posibilidad de la sustitución, según experimentos realizados, de reguladores del crecimiento tradicional
3. Es posible en algunos casos potenciar a las sustancias bioactivas en diferentes concentraciones.
4. En la mayoría de trabajos revisados al respecto se encontró una mejora en la calidad de características de las vitroplantas.
5. Es posible su implementación en el Ecuador sobre todo por los ahorros que esto implica.

IV. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- **Con la finalidad de ampliar el mercado para lograr precios convenientes deberían considerarse los compuestos orgánicos como sustitutos de los reguladores del crecimiento tradicionales.**

- **Se debería mejorar la agroindustria ecuatoriana, con la implementación de la biotecnología y el uso de estas sustancias bioactivas para la elaboración de medios de cultivo en la micropropagación masiva de plantas.**

- **Realizar experimentos dirigidos a la obtención de metodologías que se adapten a la necesidad de la agricultura ecuatoriana.**

- **Continuar estudios relacionados a esta temática.**

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angarica, A y Perea, M. 1991. Técnicas de cultivo de Tejidos. CIAT. Cali-Colombia. Cap, 22: 4 94-510.
- Barranca, L. 2001. Embriogénesis somática en banano (*Musa AAAB*) cv. FHIA-18. Empleando medios de cultivo líquidos. Tesis de Doctorado. IBP. Santa Clara. 95pg.
- Cabrera, J. C., Igartuburo, J.H., Gutierrez, A., González, S., e Iglesias, R.1997. Obtención de Oligosacáridos Pécticos con Actividad Biológicas en Plantas. Memorias de la 26 Bienal de Química de la Real Sociedad Española de Química. Septiembre.
- Cevallos, M.1999. Embriogénesis somática en *Coffea sp.* Determinación de Marcadores Morfológicos Moleculares. Tesis de maestría. FAC. Biología (U.H). INCA. 97pg.
- Coll, *et al.* 1999. <http://www.fq.uh.cu/investigacion/lpn/Brasinoesteroidesnew.html>
- Cote, F y M.G. Hahn.1994: Oligosacharins: Structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology*. 26: 1379-1411.
- Devlin, R.M. 1975. Las hormonas de crecimiento naturales. En: *Fisiología Vegetal*. Ediciones Omega, Barcelona. 2 ed
- Días *et al.* 2002.....
- Dodds, J y Roberts, L. 1989. *Experiments in plants tissue culture*. University of Cambridge. USA. 224 pg.
- Echenagusia, A. 1999. Indicadores bioquímicos y tasas de crecimiento en la micropropagación *in vitro* del platano. Monografía
- Hidrovo, J. 2000. Estudios morfológicos, histológicos y bioquímicos de callos embriogénicos en el cultivo de papa *Solanum tuberosu. L.* Tesis para título de Maestro en Ciencias.

- Jiménez, E., Rivera Axa., y Silva, M. 1998. Embriogénesis somática en suspensiones celulares en papa *Solanum tuberosum*. Revista del mes Villa Clara.20 (3):27-32.
- López, P. 1990. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. En: Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO. Roma. Pg. 9-21.
- Messa, P. 1999. Actividad biológica de dos análogos de Brasiñoesteroides (BAA-6 y MH5) en la formación de callos de papa *Solanum tuberosum*. Trabajo de Diplomado.
- Montes Silvia.1994. Cultivos *in vitro* de células tejidos y órganos. Conferencias Univ. Autonoma México.83pg.
- Moré y Gonzáles. 2001. Empleo del oligopeptato Pectimorf sobre el desarrollo de callos embriogénicos en papa *Solanum tuberosum*, L. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de La Habana. Cuba
<http://www.redepapa.org/documentosred.html>
- Núñez, M. 2000. Análogos de Brasiñoesteroides cubanos como biorreguladores en la agricultura. Informe final de Proyecto. INCA. San José de las Lajas. 102pg.
- Ochoa, M. 1990 a. Cultivo de anteras. En: Fundamentos teóricos del cultivo de tejidos de cultivo vegetales. FAO. Roma. Pg.49-75.
- Ochoa, M. 1990b. Establecimiento del cultivo de tejidos *in vitro*. En: Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO, Roma. 38-45.
- Pérez, T.N. *et al.* 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Ediciones CIGO. Cuba. 390pg.
- Herik, R. 1990. Inducción de callos. Cultivo de callos y regeneración de órganos y embriones. En: Cultivo *in vitro* en las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. p209-213.
- Redondo, A.D. 1995. Embiogénesis somática en *citrus curiantum* L. Trabajo de Diploma. FAC. Biol., UH. 30pg.
- Roca, M. W. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones/ William M. Roca, L.A. Mioginski. (Cali): CIAT. 970pg.

- Rodriguez Tania 1999. Influencia de biorreguladores cubanos sobre algunos indicadores morfológicos durante las fases de multiplicación y enraizamiento *in vitro* del plátano *Musa sp.* Tesis a la opción a Maestra en Ciencias.
- Santos Joao Da Costa. 1998. Efecto de la actividad de un oligopetato en el proceso de callogenesis *in vitro* de *coffea canephora* var. Robusta. Trabajo de Diploma. 56pg.
- Salisbury, F.B y C.W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo editorial de Ibero América. México. 759pg .
- Thor, T. 1997. Cytogenetic techniques. In: Plant tissue culture, methods and applications y agriculture. Academic press. USA. p213-240
- Valdés. B. 1997. Suspensiones celulares de *Cataranthus rosus L.* G. Dan y *Glycine sp L.* Merr como modelos biológicos para probar biorreguladores sintéticos. Tesis Diploma. FAC. Biol. Ult. 53p.
- Vasil, I.Q.1994. Autaration of plant micropropagation. Plant Cell a Culture. 39: 105-108.
- Vazquez, E y Torres, C. 1995. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación, 465pg.
- Villalobos, V. 1990. Organogénesis *in vitro*. En: Fundamentos teorico practicas del cultivo de tejidos vegetales. FAO, Roma.
- Weaber, J.R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas de la agricultura. Editorial Trilla.