

CONSERVACIÓN Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LULO (*Solanum quitoense*) Y TOMATE DE ARBOL (*Cyphomandra betacea*)

Zaida Lentini

Introducción

Un gran número de frutas de origen Andino tienen gran potencial de convertirse en productos *premium* de consumo Nacional y de exportación con un alto beneficio económico para los agricultores, al tiempo que pueden ser utilizados para la conservación y regeneración del ecosistema de laderas. Entre estas frutas encontramos el lulo (*Solanum quitoense*), originario de Colombia y Ecuador, el cual normalmente se cultiva entre 700 y 2000 m.s.n.m., al igual que el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). Un indicador de los posibles cambios que el mercado de frutas puede propiciar se registró en los últimos años con el lulo, el cual pasó de ser una fruta de consumo fresco local para entrar a la industria de jugos, lo que incrementó su valor agregado abriendo nuevos mercados. Sin embargo, al igual que la mayoría de las frutas tropicales, estas especies tienen limitantes importantes que restringen su cultivo, como son la susceptibilidad a enfermedades y pestes, problemas de deterioro en la poscosecha, heterogeneidad en la calidad de la fruta, y una disponibilidad limitada del material elite libre de patógenos. El control de estos factores incrementan los costos de producción. El fitomejoramiento genético es una alternativa clave para el desarrollo de materiales mejorados con resistencia a pestes y enfermedades, y de calidad superior. La práctica cotidiana del control químico para pestes y enfermedades, además de aumentar los costos de producción, es una fuente de contaminación que afecta no solo al ambiente sino a la salud. En el caso de frutales leñosos sin embargo, el período de fitomejoramiento es substancialmente mayor respecto a cultivos anuales, lo que dificulta el desarrollo de nuevas variedades. Esta limitante de tiempo puede ser asistida complementando el fitomejoramiento convencional con la micropropagación masiva de materiales elites libres de patógenos, y la ingeniería genética, que es una técnica que permite insertar genes directamente en el genoma de la planta obviando el proceso de cruzamiento sexual. Esta técnica además posibilita el uso de genes presentes en otras especies, incluyendo el acervo silvestre relacionado con la especie cultivada cuyo uso generalmente es restringido debido a barreras de incompatibilidad inter-específica. Los avances biotecnológicos de las dos últimas décadas principalmente se ha realizado con especies anuales de zonas templadas. La inserción de la Biotecnología en estas especies esta permitiendo la aplicación de estas técnicas en el desarrollo expedito de variedades comerciales, incrementando su competitividad en el mercado Internacional. En contraste, las especies de frutas tropicales han sido objeto de una atención muy limitada. Es claro que para incrementar el valor agregado de las frutas tropicales bajo el actual régimen de globalización y competitividad, se requiere el desarrollo, la adaptación y optimización de estas técnicas para agilizar el desarrollo de materiales mejorados. La tecnología desarrollada no solamente estaría apoyando al desarrollo de materiales mejorados, sino que además en sí misma podría ser objeto de propiedad intelectual debido a la novedad de la invención. A continuación se resume el avance en el desarrollo de metodologías reproducibles y eficientes para la conservación

de germoplasma, micropropagación, y transformación genética del lulo y tomate de árbol en el período 2000 y 2001. Estos avances han contando con la gentil disposición del germoplasma proveniente del Centro Frutícola Andino (CEFA) y Corpoica LA Selva, sin el cual no sería posible realizar esta investigación. El presente trabajo incluye la participación de una estudiante M.Sc., Vanessa Segovia.

Objetivo general: Ofrecer incentivos al agricultor Colombiano para el cultivo de especies oriundas de la región con un valor agregado en el mercado Nacional y de exportación, que además contribuyan con la preservación del ecosistema de laderas y la biodiversidad nativa.

Objetivos específicos: 1) Desarrollar un método eficiente de conservación *in vitro* a largo plazo del germoplasma de lulo y tomate de árbol; 2) Desarrollar un método eficiente de multiplicación masiva y rápida de material elite de interés comercial, mediante el uso de cultivo de tejidos *in vitro*; y 3) Desarrollar un método eficiente para la transformación genética de estas dos especies que pueda ser utilizado para la incorporación de genes de interés.

Material Vegetal:

- Selecciones de materiales comerciales de alta calidad realizadas y mantenidas *in vitro* por el Centro Frutícola Andino-CEFA. Genotipos de lulo con espinas y sin espinas.
- Genotipos facilitados por COROPOICA (Sede La Selva) de lulo con espinas y lulo “La Selva”, variedad generada en ese centro resistente a nemátodos.

Resultados Año 2000.

- Se desarrollo una metodología para conservación y propagación *in vitro* de la colección de germoplasma con resultados superiores a los aplicados por CEFA y Corpoica La Selva. Esta metodología incluye la utilización de un medio diferente, y modificaciones del protocolo de propagación *in vitro*. Con este método se observó una mayor proliferación de raíces, desarrollo y vigor de las plantas. Esta metodología se desarrolló tanto para lulo como para tomate de árbol.
- Para poder transformar plantas, es necesario contar con un método eficiente de regeneración de plantas a partir de cualquier tejido de la planta original. Se ensayaron dos vías de regeneración; *organogénesis* y *embriogénesis somática* siguiendo protocolo reportados en la literatura. En el caso de tomate de árbol, no se obtuvo ninguna respuesta. En el caso de lulo, después de introducir varias modificaciones a los protocolos publicados, incluyendo tipo de explante, medio, pretratamiento al tejido, edad y orientación del explante, fue posible regenerar algunas plantas mediante organogénesis. En base a la falta de respuesta en tomate de árbol y los mejores resultados en lulo, se decidió temporalmente discontinuar los trabajos con tomate de árbol, y concentrar mas los esfuerzos en lulo para optimizar el protocolo y luego retomar tomate de árbol una vez que la metodología de lulo este sido establecida con alta eficiencia.

- Se realizaron ensayos preliminares de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Estos ensayos indicaron que el lulo es apto a este tipo de transformación genética. Sin embargo, debido a la baja tasa de regeneración de plantas disponible a la fecha, se decidió primero optimizar el proceso de regeneración *in vitro* antes de proseguir con esta actividad, la cual será retomada hacia finales del 2001.

Resultados año 2001

- Después de al menos 10 subcultivos *in vitro* de las plantas de lulo en el óptimo establecido en el año 2000, se comenzó a observar un efecto de decoloración en las hojas, indicando un “*estrés*” en el tejido. La manifestación de los cambios en las plantas indicaron que se trataba de un efecto fisiológico del medio de cultivo *in vitro*, por lo que se introdujeron cambios en la composición del medio. El medio nuevo además de eliminar el deterioro fisiológico antes mencionado, acelera la emisión de raíz (haciendo más eficiente el proceso) y aumenta considerablemente el vigor de las plantas. Después de varios subcultivos en este medio, se ha podido recuperar la mayoría del material que presentaba deterioro fisiológico en el medio anterior, y podemos recomendarlo como un medio más eficiente para fines de conservación de germoplasma y micropropagación. Recientemente Corpoica La Selva nos ha enviado otros materiales de su banco de germoplasma *in vitro*, los cuales han presentado problemas, para evaluar si con la metodología y medio optimizados en CIAT tienen una mejor respuesta. Una vez evaluados estos materiales se compartiría la información con Corpoica La Selva.
- Se realizaron un gran número de ensayos siguiendo un diseño experimental estadístico y número de repeticiones para garantizar la reproducibilidad de los resultados a gran escala. Se realizaron modificaciones adicionales al protocolo original que en el año 2000 había dado regeneración de las primeras plantas y se optimizó. En este momento se cuenta con un protocolo que puede ser utilizado para fines de transformación genética.
- Paralelamente se estableció una metodología para la transferencia del material regenerado *in vitro* al invernadero y posteriormente al campo.
- Las primeras plantas regeneradas han mostrado un desarrollo vegetativo y floración normal en el invernadero y en el campo. La fructificación está siendo evaluada en campo a condiciones óptimas para cultivo de lulo (1700 m.s.n.m y 22°C) en la finca “LA CASONA”, ubicada en el corregimiento de DAPA a 20 minutos de Cali.

Planes futuros

- Establecer un cultivo cíclico entre invernadero e *in vitro* para renovar continuamente la colección.
- Implemento y optimización del protocolo de transformación.
- Evaluación en campo de materiales regenerados en el laboratorio, y comparados con micropropagación *in vitro* y semilla sexual.

Bibliografia

- ATKINSON R. and GARDNER R. 1993. Regeneration of transgenic tamarillo plants. *Plant Cell Reports*. 12: 347-351
- GUIMARAES M. L., CRUZ G. and MONTEZUMA-CARVALO J. 1988. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 15 (2): 161-167.
- HENDRIX R., LITZ R. and KIRCHOFF B. 1987. In vitro organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum*, *S. quitoense* (naranjilla) and *S. sessiliflorum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 11: 67-73.
- ULTZEN T., GIELEN J., VENEMA F., WESTERBROEK A., HAAN P., TAN M., SCHRAM A., GRINSVEN M and GOLDBACH R. 1995. Resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tomato hybrids. *Euphytica*. 85: 159-168.