

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO DE LAS
PLANTAS

***MÉTODOS DE CULTIVO Y ACCIÓN DE NUEVOS
REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA
MORFOGÉNESIS IN VITRO DEL TOMATE
(LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL),
CULTIVAR AMALIA***

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LAS PLANTAS

Autor: Ing. Dagmara Plana Ramos

Tutor: Dra. C. Marta A. Alvarez Gil

La Habana, 2000

RESUMEN

Actualmente, existen numerosos protocolos de regeneración *in vitro* para el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), estos son poco eficientes y muchos de los brotes no dan lugar a regenerantes normales; por lo que entre los principales objetivos de este trabajo se encuentra el desarrollo de un protocolo de regeneración en el que se emplee un mínimo de reguladores del crecimiento o la sustitución de estos por bioreguladores que permitan disminuir los costos del proceso. Para ello, se realizaron diferentes ensayos donde se utilizaron como explantes segmentos apicales de hipocótilos y cotiledones, provenientes de plántulas del cultivar Amalia; cultivándose en medio basal suplementado con diferentes concentraciones de Pectimorf (1, 5, 10, 15 mg.L⁻¹) y Biobras 6 (10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ mg.L⁻¹), en presencia o no de bajas concentraciones de BAP (0.25, 0.5, 1mg.L⁻¹). En una segunda fase del trabajo se desarrolló un nuevo protocolo de regeneración para tomate a partir de la metodología propuesta por Ezura *et al.*, (1993) para *Capsicum annum* L. ; que consistió en el cultivo de secciones de semillas en ausencia de reguladores del crecimiento. Se realizaron diversos ensayos en los que se evaluaron diferentes tipos de imbibición de las semillas y la acción de bioreguladores en el proceso de imbibición y suplementando el medio de cultivo, (Pectimorf 10 mg. L⁻¹; Biobras-6 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² mg.L⁻¹; BAP 2 mg.L⁻¹; Ácido Giberelico 1, 2 mg.L⁻¹ y Zeatina 2 mg.L⁻¹). Se caracterizó la regeneración de brotes en la superficie de corte de la semilla mediante análisis en el microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido. Las vitroplántulas obtenidas a partir de SC fueron enraizadas en el medio basal y adaptadas a condiciones *ex vitro* (Lara,1999; González, 1998 y Casanova, 1999). La estabilidad genética de las vitroplántulas se estudió a través de técnicas de análisis electroforético de las isoenzimas Prx, GOT, Est y AC en extractos foliares y evaluaciones cuantitativas del cariotipo. Se pudo constatar que los bioreguladores Pectimorf y Biobras 6 tuvieron un efecto similar al del BAP en cuanto a la formación de callos, frecuencia y eficiencia de regeneración se refiere. La dosis de 10 mg.L⁻¹ de Pectimorf favoreció la regeneración *in vitro* de hipocótilos y SC del cultivar Amalia. En las

hojas cotiledonares se logró una eficiente regeneración directa con el uso del BAP a concentraciones de 0.5 y 1 mg.L⁻¹, mientras que con la combinación de Biobras-6 (10⁻⁴ mg.L⁻¹) y BAP (0.25 mg.L⁻¹) se obtuvieron brotes a partir de callos de crecimiento abundante. La imbibición de las semillas de tomate durante 48 horas en agua antes de ser cortadas y cultivadas en medio basal en ausencia de reguladores del crecimiento aportó los mejores resultados en cuanto a eficiencia y frecuencia de regeneración se refiere, no observándose un efecto adicional cuando se imbibieron las semillas en soluciones BAP (2 mg.L⁻¹), Ácido Giberélico (1, 2 mg.L⁻¹); Pectimorf (10 mg.L⁻¹) y Biobras-6 (10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² mg.L⁻¹) o se sembraron las SC en medio basal suplementado con BAP (2 mg.L⁻¹), Pectimorf (10 mg.L⁻¹), Biobras-6 (10⁻⁴ mg.L⁻¹) y Zeatina (2 mg.L⁻¹); ., este proceso organogénico ocurrió en solo tres semanas. Las vitropántulas estuvieron adaptadas a los 15 días de establecidas en condiciones *ex vitro*, siendo las más vigorosas aquellas provenientes de SC imbibidas por 48 horas en agua. El análisis morfológico, isoenzimático y del cariotipo de las vitroplántulas, demostró la similitud de los regenerantes con los genotipos donantes. Se determinó mediante análisis la factibilidad económica del nuevo protocolo de regeneración que emplea SC del cultivar Amalia imbibidas en agua por 48 horas y cultivadas en medio basal como metodología de regeneración *in vitro* para el tomate en comparación con el protocolo recomendado para esta variedad por Alvarez *et al.* (1999b). Este nuevo protocolo se aplicó a cinco cultivares de tomate (Campbell 28, Amalia, Lignon, Rilia y Floradel), los que presentaron una respuesta morfogenética cuantitativamente similar demostrándose la efectividad de esta metodología en diferentes genotipos de la especie.

RESUMEN	2
2- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	6
2.1 Aplicación de la biotecnología a la mejora genética de las plantas	6
2.1.1 <i>El cultivo in vitro</i>	7
2.1.2 <i>Morfogénesis in vitro</i>	9
2.1.3 <i>Fusión de células somáticas</i>	13
2.1.4 <i>Transformación genética de las plantas</i>	15
2.1.5 <i>Obtención y uso de marcadores moleculares</i>	17
2.2 Regulación hormonal de la morfogénesis del tomate cultivado in vitro	21
2.2.1 <i>Reguladores del crecimiento</i>	22
2.2.2 <i>Los brasinoesteroides</i>	23
2.2.3 <i>Los oligogalacturónidos</i>	26
2.2.4 <i>Origen, causas y naturaleza de la variación en el cultivo in vitro</i>	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Aspectos generales del cultivo in vitro	30
3.1.1 <i>Material Vegetal</i>	30
3.1.2 <i>Medio basal</i>	30
3.1.3 <i>Esterilización de las semillas</i>	31
3.1.4 <i>Tipos de explante utilizados Hipocótilos y Cotiledones</i>	31
3.1.5 <i>Condiciones de incubación</i>	32
3.2 Descripción de los experimentos realizados con diferentes reguladores del crecimiento y tipos de explante	32
3.2.1 <i>Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y organogénesis en hipocótilos y cotiledones del cultivar Amalia.</i>	33
3.2.2 <i>Efecto de la imbibición en agua de semillas del cultivar Amalia en la callogénesis y organogénesis in vitro</i>	34
3.2.4 <i>Imbibición de semillas en BAP, Ácido Giberelico, Pectimorf y Biobras-6 y cultivo de SC en ausencia de reguladores del crecimiento</i>	35
3.3 Enraizamiento y adaptación de los regenerantes	37
3.4 Evaluaciones y análisis estadístico	37

3.4.1 Callogénesis.	37
3.4.2 Organogénesis	38
3.4.3 Adaptación a condiciones <i>ex vitro</i>	38
3.5 Caracterización histológica de la regeneración in vitro a partir de semillas cortadas	39
3.5.1 Microscopio óptico	39
3.5.2 Microscopio electrónico de barrido	39
3.6 Análisis de la estabilidad genética de las vitroplántulas	40
3.6.1 Estudio bioquímico	40
3.6.2 Estudio citogenético	41
3.7 Análisis económico	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y la organogénesis en hipocótilos del cultivar Amalia	43
4.2 Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y la organogénesis en cotiledones del cultivar Amalia	53
4.3 Nuevo protocolo de regeneración tomando como explante semillas cortadas	58
4.3.1 Imbibición de semillas en agua y cultivo en ausencia de reguladores del crecimiento, cultivar Amalia	59
4.3.2 Imbibición de las semillas en BAP, Ácido Giberelico, Pectimorf y Biobras-6 y cultivo de SC en ausencia de reguladores del crecimiento, cultivar Amalia.	74
4.3.3 Imbibición de semillas en agua y cultivo de Scv en medios suplementados con Pectimorf, Biobras-6, BAP y Zeatina	76
5. CONCLUSIONES	78
6. RECOMENDACIONES	80
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	81

2- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Aplicación de la biotecnología a la mejora genética de las plantas

La biotecnología vegetal se define como el cultivo y manipulación de plantas, embriones vegetales, explantes, tejidos, células y protoplastos en un medio nutritivo o en condiciones estériles (Pierik, 1990a). Según Blis (1993) esta técnica esta siendo utilizada para investigar problemas biológicos complejos y facilitar la producción de nuevos productos prometedores que pudieran ser difíciles o imposibles de obtener usando un método de cultivo tradicional.

Debido al desarrollo de sistemas eficientes de control de la morfogénesis a partir de células y tejidos, y técnicas de ADN recombinante, en las últimas tres décadas se ha logrado un mayor grado de precisión en la manipulación genética vegetal. Mediante la biología molecular, con la identificación de los genes correspondientes, así como el estudio de la regulación de su expresión, se ha hecho posible el análisis de las características individuales de las plantas, posibilitando la comprensión, identificación y evaluación de la regulación de genes de interés para la agricultura, a nivel celular y de la planta completa (Dandekar, 1992).

La biotecnología tiene tres campos dirigidos a la mejora de plantas hortícolas: técnicas de cultivo *in vitro*, obtención y manejo de marcadores moleculares y transformación de plantas; demostrando un desarrollo específico y viable en muchas de estas especies. Estas han permitido aprovechar la variación somaclonal (Morales, 1997), transformar plantas con ADN que codifica para caracteres tan importantes como la resistencia a *Pseudomonas syringae* p.v *tomato* (Martín, 1994), o para mejorar el sabor y alargamiento de la vida de los frutos de tomate en el almacén (González, 1994); así dilucidar la genética de varios caracteres cuantitativos y de proporcionar un gran cúmulo de marcadores moleculares que señalan la situación y posición de los genes en el genoma de las plantas, permitiendo a los mejoradores aplicar técnicas denominadas de Selección Asistida por Marcadores (Fernández, 1999).

La interacción entre mejoradores y biotecnólogos se plantea como una identificación por ambos del problema práctico a resolver; de una búsqueda de posibles donantes a realizar por el primero, de un marcaje molecular a efectuar por el segundo, y de un programa de introducción del carácter en el que los dos elaborarían y de una evaluación agronómica de los materiales obtenidos que sería realizada por el mejorador. Después del tercer paso también cabría que el biotecnólogo abordara la clonación del gen o genes responsables del carácter y la transformación de cultivares que después debería seleccionar el mejorador (Cuartero y Sánchez, 1998).

La ingeniería genética es una tecnología genérica que ha permitido la extensión del uso de la biotecnología a situaciones de producción que pueden o no ser novedosas en el ámbito mundial. Esta es una de las herramientas más poderosas de la nueva biotecnología y su utilización ha cambiado de manera definitiva la estrategia de abordar los problemas en la agricultura (Pérez de la Vega, 1997).

2.1.1 El cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales comprende una amplia serie de técnicas para la manipulación y control en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células, protoplastos, embriones y plantas completas empleando medios nutritivos artificiales. Los orígenes del cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular que es la base teórica sobre la que se basan todas estas técnicas.

Probablemente, todas las células nucleadas de las plantas superiores son totipotentes, estando regulada esta potencialidad por la expresión génica y siendo función de complicadas interrelaciones (Lyndon, 1990). La plasticidad, inherente a dichas células, sugiere que el crecimiento y posteriormente la diferenciación, depende en gran medida de estímulos externos (Takahashi *et al.*, 1995). El medio de cultivo es el encargado de desencadenar los procesos *in vitro* que se llevan a cabo, convirtiendo al cultivo bajo estas condiciones en una importante herramienta

para las investigaciones básicas y aplicadas sobre la regeneración de las plantas (Santana, 1993).

Las herramientas necesarias que hicieron posible el avance de estas técnicas fueron el desarrollo de los medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores de crecimiento, que no estuvieron disponibles hasta finales de los años 50. A partir de este momento se sucedieron una serie de acontecimientos como la generación de plantas a partir de callos mediante la formación de embriones somáticos *in vitro* (Reinert, 1958) y posteriormente la demostración de que estos embriones somáticos se originaban a partir de células aisladas (Backs-Haseman *et al.*, 1970; Reinert *et al.*, 1971), los cuales confirmaron totalmente la capacidad de totipotencia de las células vegetales.

Actualmente, dentro de la biotecnología, es la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Komamine *et al.*, 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Gidekel y Barrientos, 1999), la propagación masiva (Kitto, 1997; Vasil, 1998), la conservación de germoplasma (Withers, 1984), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones (Cisneros *et al.*, 1998), la selección *in vitro* (Labrada; 1999), la ingeniería genética (Herrera–Estrella, 1999b); otra frecuente utilidad es su aplicación a los programas de mejora genética tradicionales, para los cuales es una herramienta muy eficaz que acorta considerablemente los ciclos de mejora (Cuartero, 1998).

Las técnicas de cultivo de tejidos están bien establecidas en muchos laboratorios de todo el mundo, donde se han desarrollado métodos para la regeneración, seguimiento de diferentes variantes de clonaje celular, rápida propagación de genotipos, inducción de tejidos haploides provenientes de anteras y polen la hibridación somática, el cultivo de células y la embriogénesis somática. Además, cabe señalar que junto con estas metodologías, ha surgido una nueva fuente de variabilidad intrínseca del cultivo *in vitro*; la cual se ve favorecida por las condiciones de cultivo, las fitohormonas utilizadas y el tiempo de cultivo (Gómez, 1998).

2.1.2 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis puede definirse como la génesis o iniciación de la forma de los organismos vivos. El estudio de la morfogénesis vegetal tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de la planta (González, 1999).

El desarrollo histórico de la tecnología del cultivo *in vitro* va ligado a los intentos por demostrar experimentalmente la totipotencia celular, es decir, la capacidad de las células para regenerar el fenotipo de la planta de la que derivan. El proceso de diferenciación celular no implica pérdida de material genético sino expresión diferencial de genes. Por ello, la mayoría de las células vegetales pueden, en principio, considerarse totipotentes (Pierik, 1990a). Hoy en día, sabemos que las células en cultivo pueden manifestar su totipotencia siguiendo la ruta de la organogénesis o de la embriogénesis somática. En las dos rutas es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfogénico: la morfogénesis directa o en ausencia de callos y la indirecta, donde la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas.

El establecimiento de cultivos de callos seguido por la formación de plantas, vía de organogénesis o embriogénesis somática, se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Hidrobo, 1996; Cevallos, 2000). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de determinado tejido, que comienza su formación con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados; los cuales desdiferencian en el medio de cultivo dando origen a una masa amorfa de células. La formación de callos es, en forma general, el evento menos importante, sin embargo, lograr multiplicarlo con buen crecimiento y al final obtener plantas son las fases o etapas más difíciles (Pérez, 1998).

La expresión *in vitro* de una determinada respuesta morfogénica en plantas viene determinada por la interacción de numerosos factores, tales como el genotipo de la planta donante, tipo de explante y estado fisiológico, así como la composición química del medio nutritivo, las fitohormonas y el ambiente físico en el que se desarrolla el cultivo (Tran Thanh Van y Trinh, 1990). Por el momento, se

desconoce totalmente el mecanismo de acción de estos componentes en la morfogénesis. No obstante, las técnicas de ingeniería genética están permitiendo desarrollar nuevas estrategias que permitirían, en un futuro próximo, desentrañar las bases moleculares de la morfogénesis (Torreli, 1996).

Los métodos de regeneración de plantas completas mediante procesos de organogénesis o embriogénesis son un instrumento imprescindible para los diferentes campos de la biotecnología vegetal; como complemento de los procesos de transformación de plantas, de la fusión de protoplastos y del cultivo de anteras (Encina *et al.*, 1998).

2.1.2.2 Órganogénesis

Es un hecho ampliamente demostrado que la formación de órganos *in vitro* a partir de células y tejidos vegetales, se realiza independientemente de la preexistencia de meristemos iniciales. La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o de los callos (Lech *et al.*, 1996). La regeneración a partir de diferentes explantes ha sido estudiada en diferentes cultivos, y se ha observado que en algunos de ellos ocurre vía organogénesis directa e indirecta (Compton and Veilleux, 1991; Branca, *et al.*, 1994 y Pratta *et al.*, 1997).

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 de meristemos apicales en las axilas de las hojas y los ápices radicales producen raíces secundarias a lo largo de las zonas más maduras. Las yemas y los meristemos apicales aislados pueden crecer en cultivo y propagarse asexualmente (Mirghis *et al.*, 1995).

Una vez que son establecidos los explantes y los brotes se han desarrollado, los cultivos pueden ser subcultivados por muchas generaciones, resultando incrementada la formación de brotes. Los brotes pueden ser escindidos después

de elongados y generalmente enraizados en iguales condiciones o en invernaderos (Gómez, 1998).

Uno de los principales objetivos en los sistemas de propagación de plantas es el de obtener brotes múltiples por explantes con una alta frecuencia de regeneración, requisito indispensable para justificar el uso de la manipulación genética en los programas de mejora (Ezura *et al.*, 1993; Brunetti *et al.*, 1997). Diferentes estudios se han realizado para desarrollar un procedimiento similar que permitiera obtener plantas con un alto porcentaje de regeneración provenientes de diferentes genotipos que diferían en tipo de crecimiento, rendimientos y calidad nutricional de los frutos.

Autores como Oladokoon *et al.*, (1995); Lech *et al.*, (1997) y Cano *et al.*, (1998), han investigado la respuesta morfogénica y la regeneración en diferentes cultivares de tomate para un amplio rango de concentraciones hormonales y determinaron que la reacción de los genotipos podía ser muy diferente ante igual composición fitohormonal del medio; lo que en muchos casos se toma como evidencia de la diferencia en los contenidos endógenos de auxinas existentes entre cultivares de una misma especie. Aún cuando se han realizado estudios donde se toman diferentes explantes de un mismo genotipo y colocados en iguales condiciones de cultivo se denota una variabilidad significativa en la frecuencia y eficiencia de la regeneración, determinándose que las concentraciones hormonales óptimas para la regeneración varían según el tipo de tejido y la edad del explante en cuestión (El Farash *et al.*, 1993; Piven y Vallejo, 1994).

Probablemente, la regulación más precisa de la formación de órganos en respuesta a la aplicación exógena de auxinas y citoquininas se consigue utilizando explantes superficiales, esto es, explantes epidérmicos y subepidérmicos que sólo contienen entre una y tres capas de células (Tran Thanh Van y Trinh, 1990). Los explantes superficiales son un sistema multiprogramable, en el que es posible efectuando cambios en la relación auxina/citoquinina, pH, intensidad luminosa y azúcares establecer varios programas morfogénicos, entendiéndose inducción de yemas vegetativas o florales, raíces y callos; aunque siempre se ha comprobado

que la efectividad del balance entre fitohormonas depende de la especie o variedad en cuestión (Segura, 1993).

2.1.2.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso biológico que permite la obtención de embriones a partir de una célula o un grupo de células somáticas; esto ocurre de forma natural en muchas especies *in vivo* y está restringido al tejido intraovular. Este fenómeno ha sido muy empleado durante los últimos años en la propagación *in vitro*, ya que contribuye a suministrar a gran escala en un tiempo corto y en un espacio limitado grandes poblaciones de plantas (Gleddic *et al.*, 1984 citado por Diosdado, 1997).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con ejes apical y radical bien definidos y no poseen conexión vascular con el tejido materno; mantienen similitud en relación con los embriones cigóticos, excepto que no transcurren por el proceso de latencia, con una precoz germinación y pasan por los estadios de desarrollo: embriones globulares, acorazonados, torpedo y cotiledonares (Cevallos, 1998). Estas estructuras son capaces de crecer y desarrollarse en plantas normales con iguales características genéticas que la planta que le dio origen. Se presenta, además, una similitud en los programas de expresión génica espacial y temporal entre embriones somáticos y cigóticos (De Jong *et al.*, 1993).

La aplicación de técnicas de embriogénesis somática permite la multiplicación masiva de clones selectos de determinadas especies de cultivo extensivo, debido a la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Pérez, 1998). La producción de semillas artificiales permite la conservación y manipulación de embriones somáticos o embriones híbridos obtenidos por cruces entre variedades o especies incompatibles y un cierto control sobre su germinación (Santana, 1998).

Esta vía de regeneración todavía no está totalmente dilucidada, y poco se conoce de los eventos morfohistológicos, bioquímicos y moleculares que tienen lugar

cuando las células somáticas se vuelven competentes para producir embriones somáticos (Menéndez *et al.*, 1994). Una de las etapas más difíciles y cruciales en el proceso embriogénico es la sincronización de las poblaciones embriogénicas, así como la búsqueda de marcadores tempranos relacionados con el potencial embriogénico que permitan predecir la formación del embrión somático antes de que esté presente, especialmente al inicio del cultivo, donde el número de células embriogénicas es pequeño y deben ser seleccionadas para obtener frecuencias de regeneración adecuadas (Zapata, 1994).

En la actualidad, la embriogénesis somática es posible inducirla en más de 200 especies vegetales procedentes de 86 géneros y 34 familias, siendo ésta bastante común en las siguientes familias: Ranunculáceas, Rutáceas, Solanáceas, Umbelíferas y Gramíneas (Vasil, 1995; Lukse *et al.*, 1997).

En estudios realizados en *Lycopersicon sp.* por Gill *et al.*, (1995) y Newman *et al.*, (1996) se plantea que dentro de un explante, ciertas células están precondicionadas para los eventos morfogenéticos que conducen a la embriogénesis, por lo que la presencia de reguladores exógenos del crecimiento, no solo inciden en el desarrollo de los embriones somáticos, sino que también estimulan la multiplicación clonal de las células predeterminadas; encontrar la combinación adecuada de fitohormonas que logre desencadenar los procesos embriogénicos en cultivos recalcitrantes es aún una ardua tarea para los investigadores.

2.1.3 Fusión de células somáticas

La exploración de la variación genética presente en las especies silvestres, es frecuentemente difícil por la incompatibilidad genética que existe entre estas especies, e incluso entre géneros. La introgresión de características deseadas, como la resistencia a enfermedades, metabolitos secundarios y componentes del rendimiento; provenientes de accesiones dentro de una especie cultivada que pertenecen al mismo género o a diferentes, pueden a veces ser llevadas a cabo, en algunos casos, por medio de la hibridación interespecífica (Rumulu, 1996) y el

subsecuente cruzamiento recurrente con las especies cultivadas, pero los cruces entre especies de diferentes géneros normalmente fallan (Pierik, 1990a).

No fue hasta 1970, en que Power *et al.*, unieron células somáticas por primera vez utilizando protoplastos de maíz y avena, logrando con esto la transferencia de material genético de un individuo a otro, aspecto que sólo era posible en el caso de las plantas superiores mediante medios sexuales. Esta es una forma totalmente diferente de transmisión de material genético que conduce a un incremento en la variación genética, cuando se unen dos protoplastos originados a partir de células somáticas; dando lugar a una hibridación somática o parasexual (Pierik, 1987). En este caso, el número de cromosomas del híbrido somático es la suma de sus progenitores participantes en la fusión. Los llamados cíbridos son producto de la hibridación citoplásmica, lo que corrobora la existencia de una considerable información disponible en los cloroplastos y mitocondrias de los productos fusionados de este género (Arce Montoya, 1994).

Utilizando la hibridación somática se han creado híbridos que no se habían podido realizar, debido a las barreras taxonómicas (Pratta *et al.*, 1997). En los últimos años, un gran número de reportes han sido publicados sobre la obtención de híbridos somáticos interespecíficos y su potencial para ser usados como herramienta en los programas de mejora genética. Un ejemplo interesante es la hibridación somática entre *Solanum tuberosum* y *Solanum brevidens* (Barsker and Harrison, 1984), o entre *Solanum tuberosum* y *Lycopersicon esculentum* (Schoenmakers, 1993) o entre *Solanum ochranthum* y *Lycopersicon esculentum* (Kabayashi *et al.*, 1996); que no pueden realizarse *in vivo*.

En el género *Lycopersicon* la producción de híbridos asimétricos ha sido empleada como vía para burlar las barreras de incompatibilidad existentes entre algunas especies silvestres, las que pudieran transferir genes que confieren resistencia a diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos a cultivares de tomate con características de interés agrícola (Lefrancois *et al.*, 1993).

En particular la producción de híbridos asimétricos es explotada como una vía para transferir una sola parte del genoma nuclear de especies silvestres de *Lycopersicon* (Ratushnyak, 1993; Kibanabal y Miyakazi, 1998). Los resultados

obtenidos confirman a la hibridación asimétrica como una nueva fuente de variación genética y un método para transferir parte del material genético de un donante, demostrando que es posible producir híbridos fértiles por esta técnica (Hossain, 1995).

2.1.4 Transformación genética de las plantas

Los programas de mejoramiento genético vegetal clásico han permitido obtener un gran número de nuevos cultivares con características deseables de resistencia. Sin embargo, estos programas están basados en técnicas de larga duración que pueden llegar a ser poco efectivos por la rápida evolución y diseminación de patógenos resistentes y la necesidad de incrementar y mejorar la productividad de los cultivos (Vasil and Herrera Estrella, 1995). Desde 1985, en que la introducción de determinados genes en los genomas vegetales fue realizada por primera vez en Europa, ha ocurrido una nueva revolución en la agricultura, la transformación de plantas ha permitido la obtención de variedades con rasgos únicos incluidos en su genoma; que de otra forma sería muy difícil de conseguir o quizás imposible por los métodos de mejora clásica (Cuba, 1998).

Muchos investigadores han empleado a *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo para la producción de plantas transgénicas ya que requiere de exposición mínima de las células a condiciones de cultivo y resulta en una alta frecuencia de transformación. Varias especies de importancia agronómica como tomate (McCormick *et al.*, 1986 y Mohamed-Yassen and Abdallad-Hemeida, 1999), soya (Hinchee *et al.*, 1988), papa (Arrieta *et al.*, 1996 y Oramas, 1999) y tabaco (Menéndez *et al.*, 1996); han sido transformadas con genes que codifican para resistencia a herbicidas, insectos, protección contra virus, expresión de proteínas antifúngicas, alteración en la maduración, incremento en el almacenaje de proteínas en las semillas e incremento en la producción de almidón.

En 1993, Bechtold *et al.*, desarrollaron una técnica de transformación a partir de una planta entera de *Arabidopsis thaliana*, llamada "Floral Dip". Con este protocolo se lograron reducir significativamente los tiempos de regeneración, evitando el paso de cultivo de células y callos, necesario en la metodología tradicional de

transformación, y representó un gran empuje a la biología molecular vegetal. En esta técnica se sumergen inflorescencias de la planta en una solución de *A. tumefaciens* y con ayuda del vacío se logra la transformación de semilla en formación. Esta técnica fue mejorada por Bent y Clough (1998), citados por Arce-Jhonson (1999), quienes lograron transformar las semillas al colocar las inflorescencias en contacto con *A. tumefaciens* sin tener que recurrir a la complejidad de aplicar vacío.

En teoría, cualquier tipo de explante en el que la regeneración de plantas es posible, ya sea a través de la embriogénesis somática, de protoplastos o de la morfogénesis de brotes y de raíces, puede ser utilizado para la obtención de plantas transgénicas mediante *Agrobacterium*. Hasta hace pocos años, se sostenía que el rango de hospederos de *Agrobacterium* era limitado a plantas dicotiledóneas (Webb y Morris, 1992 citado por Arencibia, 1997), por lo que se desarrollaron métodos de transformación directa para las plantas monocotiledóneas, como la permeabilización reversible de las membranas de protoplastos usando los tratamientos con polietilenglicol (PEG), fosfato de calcio (Songstad *et al.*, 1995) y la electroporación de protoplastos (Arencibia, 1997).

Uno de los métodos de transformación directa más difundidos ha sido el bombardeo de partículas aceleradas (biobalística), aunque su mayor inconveniente es el alto costo del equipamiento, lo que hace muy difícil su aplicación generalizada (Christou, 1995; Vain y *et al.*, 1993). Este proceso involucra la introducción de sustancias como ácidos nucleicos en células intactas usando microproyectiles a alta velocidad (Sanford, 1987 citado por Cuba, 1998); lo que ha permitido la obtención de maíz transgénico resistente a insectos (Koziel *et al.*, 1993), e infecciones virales (Murry *et al.*, 1993) y papaya resistente a herbicidas (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995 y Cuba, 1997).

Paralelamente al desarrollo de estas tecnologías de transformación, ha sido necesario desarrollar protocolos de regeneración eficientes a partir de células o tejidos, que pueden ser más o menos complejos según la especie vegetal. Además de esto se requiere de la preparación cuidadosa de células o tejidos a transformar, estandarizaciones de las metodologías para introducir el ADN

foráneo en el explante y una larga y cuidadosa etapa de selección y regeneración de las plantas seleccionadas (Herrera Estrella, 1999b).

El enorme potencial que brinda la transformación genética de plantas ha sido explotado principalmente por grandes compañías biotecnológicas de países industrializados para obtener variedades agronómicas con nuevos fenotipos, o para acelerar la transferencia de fenotipos conocidos a un amplio grupo de especies de plantas importantes comercialmente (Alvarez-Morales, 1995). En 1999, se sembraron 29 millones de hectáreas de soja en los Estados Unidos, de los cuales el 50% estuvo sembrado con semilla genéticamente modificada con resistencia a herbicidas. Al utilizarse semilla resistente a herbicidas, las malezas se controlaron fácilmente, se realizó un menor laboreo del suelo y se minimizó la erosión. Mundialmente, en 1999, se sembraron alrededor de 28 millones de plantas transgénicas y algunos expertos predicen que esta superficie se triplicará en los próximos 5 años (Abelson and Hines, 1999).

2.1.5 Obtención y uso de marcadores moleculares

Gran parte de las características de importancia agronómica se encuentran bajo un control genético complejo, implicando la acción de numerosos genes. Por otra parte, la selección de individuos efectuada en los programas de mejora clásicos es básicamente de tipo fenotípica, y en consecuencia, poco eficaz. Si bien, numerosas metodologías estadísticas relacionadas con la genética cuantitativa han sido desarrolladas a objeto de superar la situación mencionada, ninguna de ellas presenta una aplicación masiva al nivel de mejoramiento genético práctico (Iglesias, 1994). Durante los últimos años, se ha desarrollado una nueva línea de investigación dentro de la biotecnología y la biología molecular de plantas, los marcadores moleculares, los cuales presentan una serie de aplicaciones, tanto en mejoramiento genético como en otras disciplinas agronómicas.

Se define como marcador molecular a toda variabilidad de naturaleza bioquímica/molecular que esté de algún modo asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico/agronómico; permitiendo la inequívoca diferenciación de los progenitores, siendo transmitido en forma estable a la progenie Paterson *et*

al.,1991, citado por Campos (1995a), Además, debe generar abundante información de calidad, dentro de un lapso de tiempo y un nivel de costos razonable. A diferencia de otras estrategias biotecnológicas, el objetivo fundamental de la aplicación de los marcadores moleculares es obtener información genética, la cual permita definir estrategias de acción (León, 1998) .

Numerosos marcadores moleculares han sido desarrollados, sin embargo los de naturaleza bioquímica, como son isoenzimas y proteínas de reserva, en estricto rigor son de naturaleza fenotípica (Gepts, 1994). Los marcadores fenotípicos son aquellos que se basan en la expresión fenotípica de un genotipo determinado, es decir, analizan el producto de un gen en lugar del gene propiamente como tal (Campos, 1995b).

La primera y más frecuente aplicación de los marcadores moleculares fenotípicos ha sido la identificación varietal, la cual complementa las clasificaciones morfológicas anteriormente realizadas (Smith y Smith, 1992). La electroforesis de proteínas juega un rol fundamental en aquellas aplicaciones en las cuales se hace necesario evaluar una gran cantidad de individuos, como un banco de recursos genéticos, puesto que permite, a un bajo costo realizar una primera identificación, reduciendo así sustancialmente la cantidad de muestras a analizar mediante marcadores moleculares de mayor poder resolutivo (Florido, 1999).

Los patrones electroforéticos de isoenzimas han sido utilizados para la caracterización *in vitro* de líneas celulares, análisis de la variación somaclonal, en la identificación de híbridos obtenidos por fusión de protoplastos (Martelli *et al.*, 1993; Arzatefernandez *et al.*, 1997; Morales, 1997; Cevallos, 1998) y monitorear la variabilidad en estudios de micropropagación (Iglesias, 1994; Zambrano, 1998; García, 1998). Sin dudas, lo más espectacular lo constituye la identificación varietal, donde la lista de especies estudiadas por esta vía no cesa de crecer (Iglesias, 1994; Chamberlain *et al.*,1996; Sulaman y Babu, 1996; Morales *et al.*, 1997; Sui *et al.*, 1997; Suh *et al.*, 1997; Prede *et al.*, 1998; Mantarroyos *et al.*, 1998).

La principal ventaja de las técnicas isoenzimáticas radica en la simplicidad tecnológica que ofrecen, sin embargo, poseen ciertas desventajas debido a que no

abundan en los tejidos vegetales y a que numerosas isoenzimas presentan patrones de expresión génica variables dependiendo del tejido y grado de desarrollo de la planta, la influencia de las condiciones ambientales en la actividad enzimática, y en particular, cuando se requiere de una cobertura más amplia del genoma se dificulta la detección del número total de loci, que pueden ser detectados sólo en las regiones de copia únicas del genoma y el número de alelos por locus (Cornide, 1998).

Considerando que sobre un 75% de las sustituciones de nucleótidos en la cadena de ADN no poseen efectos sobre los péptidos codificados, se ha desarrollado una serie de marcadores moleculares de naturaleza génica a nivel de ADN que permite un mayor poder discriminatorio, es decir analizan la información existente dentro de un gen en lugar de los productos codificados por tal gene (Song y Henry, 1995; Pérez de la Vega, 1997, Milach, 1997). Dentro de este grupo de marcadores moleculares pre transcripción-traducción que analiza directamente el ADN se encuentran los basados en la hibridación de este, como son los RFLP y los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores arbitrarios como los RAPDs (Campos, 1999).

La búsqueda de un marcador que presentara las ventajas derivadas del uso de PCR en ausencia de información de secuenciación, más robusto y que despliegue una mayor cantidad de polimorfismo ha permitido desarrollar los AFLPs que integran la restricción enzimática y una subsecuente amplificación (Vos *et al.*, 1995; Pérez de la Vega, 1997). Mediante el desarrollo de microsatélites amplificados a través de PCR, los cuales son genomaespecíficos y presentan un elevado poder discriminatorio, se han identificado las secuencias microsatélites permitiendo su caracterización y la construcción de bibliotecas genómicas enriquecidas de estas secuencias (Arencibia, 1998). Es necesario definir caso por caso el marcador molecular a utilizar, considerando parámetros como complejidad técnica y los objetivos del estudio a desarrollar.

En este sentido, se debe señalar la gran utilidad que han brindado todos estos marcadores en el mejoramiento genético del género *Lycopersicon*, pues los mismos han servido para la construcción de mapas genéticos (Van Ooijen *et al.*,

1994; Sandbrink *et al.*, 1995), evaluar las relaciones genéticas entre cultivares y la predicción de la diversidad genética entre los parentales en programas de mejora, determinar polimorfismo inter e intraespecífico, así como para identificar cultivares, híbridos F1 y líneas mejoradas, (Bonnema and O'Connell, 1992; Prince, Pochard y Tanksley, 1993; Rus-Kortekaas *et al.*, 1993; Foolad *et al.*, 1993; Kaemmer *et al.*, 1995; Rom *et al.*, 1995; Smulders *et al.*, 1997), detectar cambios genéticos producidos por las técnicas de cultivo de tejidos (Smulders *et al.*, 1995), la caracterización de genes asociados con la calidad de los frutos (Chetelat *et al.*, 1993), la identificación de genes de resistencia a factores adversos como salinidad (Bretó, Asíns y Carbonell, 1994) y altas temperaturas (AVRDC, 1994; AVRDC, 1997), genes de resistencia a patógenos (Williamson *et al.*, 1994; Malepaard *et al.*, 1995; Ganai *et al.*, 1995) y virosis (Ohmori, Murata y Motoyoshi, 1996; Chagué *et al.*, 1996), así como en el análisis de QTL en programas de introgresión y selección (Bretó, Asíns y Carbonell, 1994; Harada *et al.*, 1995; Tanksley y Nelson, 1996; Tanksley *et al.*, 1996).

Gracias al enorme interés que ha despertado este campo de estudio, se han desarrollado varias técnicas que permiten identificar genes expresados diferencialmente. Los primeros métodos estuvieron basados, principalmente, en las técnicas de hibridación diferencial, como la hibridación sustractiva y/o construcción de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) (Gutierrez, Gidekel y Mujica, 1999). Recientemente, la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en diferentes laboratorios hizo posible el desarrollo del "mRNA Differential Display" (Liang and Pardee, 1993) y "cDNA-AFLP" (Bachem *et al.*, 1996; Money *et al.*, 1996; Habu *et al.*, 1997); métodos que se caracterizan por ser más rápidos y versátiles que sus predecesores. En general, estos métodos permiten apreciar la expresión diferencial de genes, a través de la comparación de perfiles de ADNc generados por PCR y separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En estos momentos, están siendo utilizados como marcadores potenciales para el estudio de los procesos de regeneración *in vitro* del tomate (Torrelli *et al.*, 1996).

2.2 Regulación hormonal de la morfogénesis del tomate cultivado in vitro

De todos los factores implicados en los procesos morfogénéticos el factor limitante es la concentración hormonal, según los resultados de estudios de correlación entre los niveles hormonales endógenos y procesos fisiológicos específicos, así como experimentos sobre los efectos de las hormonas aplicadas exógenamente (Zorzoli *et al.*, 1994; Núñez, Ricci *et al.*, 1996). No obstante, el factor desencadenante de la respuesta morfogénética también podría ser la sensibilidad de las células a determinadas hormonas, ya que en un gran número de casos no se ha comprobado correlación entre niveles hormonales y magnitud de la respuesta. Consultando la bibliografía existente sobre el tema, se encuentran muchos experimentos en los que se sugiere que la sensibilidad de las células a las hormonas desencadena un determinado proceso morfogénético, como por ejemplo, la presencia de auxinas en los medios de cultivo favorece la inducción de embriones somáticos (Santana, 1993).

Hasta el momento, la hipótesis más aceptada para explicar el modo de acción de los reguladores del crecimiento en la organogénesis postula que dicho proceso está regulado por cambios en los niveles hormonales endógenos de auxinas y citoquininas. De acuerdo con lo que se ha denominado modelo Skoog-Miller, la diferenciación de yemas vegetativas es promovida por balances auxina/citoquinina favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (Segura, 1993).

La primera respuesta del tejido ante el medio está dada por la interacción de los niveles endógenos y exógenos de hormonas. Los endógenos varían de tejido a tejido e inclusive dentro del mismo, asociados con el estado fisiológico del explante. Con relación a los contenidos exógeno, las auxinas son un requerimiento esencial para la proliferación de células, mientras que las citoquininas son beneficiosas para la regeneración (Ricci *et al.*, 1996).

Es necesario destacar que los resultados de la aplicación exógena de hormonas no han podido interpretarse correctamente, ya que aún se carece de información suficiente sobre su absorción, transporte, localización inter e intracelular, y

metabolismo de éstas. Debido a tales problemas, por el momento no es posible avanzar en una hipótesis totalmente válida sobre el modo de acción de las fitohormonas en la morfogénesis; incluso, se discute si dichos compuestos actúan como agentes morfogenéticos primarios determinando la ruta morfogenética que seguirán las células o, por el contrario, las células ya están predeterminadas para seguir dicha ruta y las hormonas sólo activan la expresión de la misma. En cualquier caso, las técnicas de ingeniería genética están siendo una valiosa herramienta para la búsqueda de los mecanismos causales de la morfogénesis (Encina *et al.*, 1998).

Aunque los balances auxina/citoquinina permiten la regeneración de órganos en una gran cantidad de plantas, existen muchos casos en los que no ha sido posible inducir respuesta organogénica suplementando el medio con estos reguladores del crecimiento, encontrando cultivos en los que la acción de auxinas y citoquininas no ejerce control alguno sobre el tipo de órgano regenerado o tiene un efecto opuesto al que predice el modelo (Ezura *et al.*, 1993).

En el caso de *Lycopersicon*, la regulación hormonal de la morfogénesis es muy dependiente del balance endógeno que presente la accesión en cuestión. Se discute por algunos autores (Smulders *et al.*, 1995; Mirghis *et al.*, 1995; Lech *et al.*, 1996; Lu-Rue *et al.*, 1997), que la formación de estructuras a partir de explantes de tomate es producto de un balance de los reguladores; donde auxinas y citoquininas son los principales requerimientos, mientras su presencia y concentración están en dependencia del tipo de tejido y del genotipo donante. Para usar las fitohormonas, individualmente o en combinación, se deben establecer balances hormonales en los cuales la reacción sea específica y represente los resultados de la interacción entre niveles exógenos y endógenos de estos compuestos (Santana, 1993 y Plana *et al.*, 1999).

2.2.1 Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento se definen como compuestos orgánicos que a diferencia de los nutrientes actúan en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna u otra forma cualquier proceso fisiológico vegetal (Weaver,

1976). Estos constituyen una familia de compuestos, cuyo estudio tiene una gran relevancia para la vida de las plantas y un gran valor práctico.

Las hormonas vegetales o fitohormonas generalmente se sintetizan en un órgano, es decir, en forma endógena y ejercen su acción fisiológica en otro sitio de la planta. Actualmente, existen compuestos químicos sintéticos con una actividad fisiológica similar a las fitohormonas endógenas en la modificación del crecimiento (Taiz y Zeiger, 1991).

Entre sus principales características está su elevado peso molecular y que forman parte de diferentes clases de compuestos orgánicos como, ácidos carboxílicos, adeninas sustituidas en el N6, esteroides, etc. (Tsatsakis y Shtilman, 1993). A este grupo pertenecen las clásicas: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, así como las menos estudiadas: brasinoesteroides (Ktiripach and Zhabinskii, 1999), poliamidas alifáticas, fusicosina y oligosacarinas, entre otras (Segura, 1993; Taíz, 1998).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, las fitohormonas, especialmente las auxinas y citoquininas, juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin estos reguladores, su manipulación en los medios de cultivo permite regular la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo la base de gran parte de los protoplastos de micropropagación existentes en la actualidad.

Las tres clases restantes de hormonas, giberelinas, etileno y ácido abscísico, no son esenciales para la inducción de órganos; pero actúan como moduladores de la respuesta morfogénica.

2.2.2 Los brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son un grupo de polihidroxiesteroides que existen naturalmente y que son derivados del 5 α et colestano, presentando una estructura similar a las hormonas esteroidales de los animales (Clouse, 1996). Son sustancias estimuladores del crecimiento vegetal y desde su aislamiento a partir del polen de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979 citado por Núñez, 1996), una gran variedad de ellos han sido encontrados en un amplio número de especies vegetales. Se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y se

presentan en casi todas las partes de la planta, con altas concentraciones en los órganos reproductivos (Khripach and Zhabinskii, 1999).

Con relación a los efectos fisiológicos fundamentales sobre el crecimiento, Sasse (1997) plantea que el tratamiento con las hormonas vegetales reconocidas afecta la elongación inducida por el brasinólido. Con las giberelinas tienen acción aditiva, con la zeatina un efecto inhibitorio, mientras que con las auxinas existe un sinergismo donde el brasinólido permite a esta inducir elongación; cuando sola es inefectiva. Sobre este aspecto, Mayumi y Shibaoka (1995), plantearon que el efecto de los brasinoesteroides sobre la elongación celular se realiza a través de la orientación de los microtúbulos de las células corticales.

Recientemente, se ha informado por primera vez, que los niveles endógenos de brasinoesteroides están implicados en la inducción de un paso específico de la diferenciación en plantas, a través de la expresión génica (Yamamoto *et al.*, 1997). A partir de este análisis, Li *et al.*, (1996), sugirieron que los brasinoesteroides sean considerados como una importante hormona de las plantas. Por su parte, Yokota (1997), planteó que después de 17 años de haber sido aislados los brasinoesteroides, finalmente han sido aceptados como hormonas vegetales y que sus mecanismos de acción probablemente son diferentes a los de las auxinas y las giberelinas.

En Cuba, fue informada por primera vez la obtención de dichos análogos y su uso para la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal por Alonso, (1990). El desarrollo de todas estas investigaciones ha permitido que en el país se disponga de análogos de brasinoesteroides con diferentes estructuras químicas para estudios biológicos y, además, de cantidades suficientes de algunos de los más activos para evaluar su efectividad como biorreguladores, siendo de gran interés científico-técnico su utilización en la biotecnología vegetal (Nuñez, 1996).

González *et al.* (1994) determinaron la notable estimulación de la diferenciación celular de variedades de arroz por el efecto del análogo Biobras-6, obteniéndose la mejor respuesta cuando se sustituyó la citoquinina del medio por 2mg. L⁻¹ de este producto. Con este compuesto se obtuvo respuesta en la diferenciación de callos de papa (Hernández, 1994) y en la adaptación de sus vitroplántulas

(Agramonte *et al.*, 1996), también en la tuberización *in vitro* de ñame brindó buenos resultados (Labrada *et al.*, 1994). En *Citrus aurantium*, los biorreguladores sintéticos obtenidos en Cuba, fueron efectivos en los procesos morfogénéticos, con la ventaja de que los mejores resultados se encontraron a las concentraciones más bajas del producto, lo cual permite reducir aun más los costos de los medios de cultivo (Diosdado, 1997).

Gómez *et al.*, (1996), trabajando con la variedad de papaya Maradol Rojo, encontraron que la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos, fue favorecida por las concentraciones 0.01, 0.005 y 0.001 mg. L⁻¹ de Biobras-6 en combinación con 0.2 mg. L⁻¹ de 6-BAP, tanto para el número de plantas como para la cantidad de conglomerados embriogénicos que formaron plantas, afirmando que ningún tratamiento fue inhibido por la aplicación del producto, lo que demuestra su actividad biológica *in vitro*, actuando como una citoquinina. Estos autores también encontraron que en el proceso de adaptación de estas plantas, con aplicaciones foliares del producto de 0.05 y 0.01 mg. L⁻¹, a partir de plantas obtenidas en un medio con Biobras-6, los porcentajes de sobrevivencia fueron significativamente mayores. Se valora que este resultado es de una importancia relevante pues en el ámbito mundial existen problemas con la adaptación de este cultivo.

De igual forma con el análogo de brasinoesteroide DAA-6, Moré *et al.* (1996) encontraron que en el proceso de callogénesis de la papa, la concentración de 0.25 mg. L⁻¹ en combinación con 3 mg. L⁻¹ de 2,4-D presentó el mejor comportamiento en cuanto a masa fresca, apariencia y coloración del callo y que, para el caso del análogo MH5, menos estudiado, las concentraciones de 0.1 y 0.001 mg. L⁻¹ brindaron los mejores resultados; así como que 0.01 mg. L⁻¹ del producto produjo 52% de enraizamiento. En la formación de callos de *Coffea canephora* (var. Pierre) se obtuvieron los mejores resultados cuando se empleó la concentración de 0.01 mg. L⁻¹ de DAA-6 y del MH-5 destacándose este último por aportar los mayores resultados de masa fresca (García, 1998).

2.2.3 Los oligogalacturónidos

Los oligopectatos son oligosacarinas (polisacáridos) solubles en agua, definidas estructuralmente como fragmentos de los polisacáridos de la pared celular (Fry, 1990). Estudios realizados han demostrado no sólo el papel del oligopectato en el mecanismo de defensa de las plantas, sino también como biorregulador del crecimiento y el desarrollo *in vitro* de callos. Estos productos también pueden funcionar en las plantas como transmisores de señales moleculares que regulan el crecimiento, la diferenciación y la adaptación al ambiente, al desencadenar los procesos fisiológicos de regeneración y división de la pared celular; ya que ellos promueven en las células vegetales la síntesis de importantes sustancias que actúan en estos procesos (Diosdado, 1997; Cabrera, 1999a).

Entre las oligosacarinas, puede citarse el grupo de oligopectatos producidos en Cuba por la degradación de la pectina de los frutos cítricos, que son activos biológicamente a muy bajas concentraciones (Cabrera *et al.*, 1999b). Estos compuestos se han obtenido también de las paredes de hongos patógenos, de células vegetales o sintetizados por bacterias simbiotes de plantas (Cabrera, 1999a). La introducción de los oligogalacturonidos en las tecnologías de regeneración *in vitro* pudiera constituir una alternativa promisoría para mejorar la eficiencia económica del proceso con insumos nacionales, al elevar los coeficientes de multiplicación y obtener plántulas con un desarrollo vegetativo adecuado (González, 1999).

Actualmente, se desconoce el mecanismo por el cual las oligosacarinas podrían regular la morfogénesis, aunque existen evidencias de que las oligosacarinas de origen fúngico probablemente se unen a un receptor presente en la membrana, mientras que las derivadas de plantas parecen actuar mediante un mecanismo que no implica receptores específicos; posiblemente, interactúan con la membrana plasmática y provocan cambios en sus propiedades físicas (Aldington *et al.*, 1991). Los cambios provocados por las oligosacarinas en la expresión morfogénica de los explantes dependen de la concentración relativa de auxinas y citoquininas, del pH del medio y la variación del pH durante el período de cultivo (Tran Thanh Van y Trinh, 1990). Varios autores han probado la influencia de varias dosis de

oligopectato utilizándolo como sustituto de auxinas y citoquininas para conocer su efectividad en diversos procesos morfogénéticos (Plana, 1998 y Cevallos, 2000)

Existen numerosas evidencias sobre el efecto del Pectimorf, Da Costa, (1997) observó cambios favorables en la textura, consistencia y contenido de proteínas totales en callos de *Coffea canephora* (Robusta var.), cuando se sustituyó la kinetina por el oligopectato Pectimorf, así mismo, en ensayos realizados en naranjo agrio, caña de azúcar y café, por Diosdado (1997), González (1997) y Cevallos (1998), respectivamente; se obtuvo una estimulación del vigor de los brotes vegetativos regenerados y un favorable enraizamiento de los mismos en presencia del Pectimorf. En cultivos como la caña de azúcar, el Pectimorf estimuló el crecimiento y regeneración de los callos e incrementó el coeficiente de multiplicación en comparación con el 25 por ciento de la concentración de BAP utilizada en el medio control (Benitez, 1998).

2.2.4 Origen, causas y naturaleza de la variación en el cultivo *in vitro*

La mayor desventaja o ventaja del cultivo de tejidos o células vegetales *in vitro* consiste en el riesgo de que se produzcan mutaciones o variaciones genéticas entre las plantas regeneradas (Smulders *et al.*, 1995). El término variación somaclonal fue descrito por Larkin and Scowcroft (1981), refiriéndose a las variaciones genotípicas heredables observadas en plantas regeneradas provenientes de alguna forma del cultivo de células, que se transmite por vía sexual a la descendencia. Además de la variación somaclonal, se puede presentar también una variación de tipo epigenética, como resultado de un cambio en la expresión genética, esta última es reversible y no hereditaria (Swartz, 1991).

En numerosos cultivos se han reportado variaciones somaclonales al detectar características diferenciales en el vigor de los regenerantes, el hábito de crecimiento, la calidad de los frutos y el rendimiento, entre otros (Sala *et al.*, 1990 y Morales, 1996). Dicha variación somaclonal es especialmente interesante y ventajosa en plantas que presentan poca variación en forma natural, o en las que la variación de forma natural es difícil o imposible de inducir, por lo que constituye

una fuente adicional de variación genética rápida y eficiente, permitiendo obtener plantas resistentes a estreses bióticos y abióticos (Pérez de la Vega, 1997); en cambio, esta variación es indeseable o desventajosa cuando se produce bajo un sistema de propagación vegetativa *in vitro* o de transformación genética ya que la aparición de plantas fuera de tipo reduce la calidad del material de plantación o transformado.

El uso de esta técnica no es muy frecuente, debido a su carácter aleatorio y la fuerte influencia del genotipo en cuanto a la aparición de alteraciones genéticas. La utilización de marcadores moleculares (Smulders et al., 1995 y Arencibia, 1997) y tests de selección *in vitro* puede ayudar en la discriminación y evaluación de estas variantes somaclonales (Labrada, 1999 y García, 2000). Su uso agrícola ha permitido contar con cultivares de tomate tolerantes a la salinidad y a la sequía (Sala et al., 1990), resistentes a *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*, *Alternaria solani* (Roduva et al., 1994), *Clavibacter michiganense* (Zakir et al., 1996) y virus del mosaico del tabaco (Zhuk, 1994).

Las mutaciones que se originan de la variación somaclonal pueden ser consecuencia directa del cultivo *in vitro* o pueden estar ya presentes entre las células puestas en cultivo (Ramulu, 1991). Se puede decir que el material inicial tiene un efecto importante sobre la producción de mutaciones. Se le ha prestado especial atención al estudio de las aberraciones cromosómicas, en particular, la poliploidía. El interés por ésta surgió después del descubrimiento de la endopoliploidía en tejidos diferenciados en un amplio rango de plantas, un hecho que sugirió la hipótesis de que al menos parte de la variabilidad genética recuperada *in vitro* podría estar derivada de modificaciones genómicas preexistentes en las células diferenciadas de los explantes iniciales. Se debe subrayar también que, debido a la selección diplóntica, pocas de las modificaciones que existen en los cromosomas y el genoma a nivel celular o de tejido persisten en las plantas regeneradas y aún menor número sobrevive la primera meiosis (D'Amato, 1965 citado por Buiatti and Bogani, 1998).

La frecuencia y rango de las mutaciones se ven afectados, como se discute por algunos autores (Buiatti and Bogani, 1998), por la duración y las condiciones del

cultivo *in vitro*. Esto fue mostrado a nivel citológico en los inicios de la investigación en cultivo de tejidos, y más recientemente, por medio de la comparación de las frecuencias de mutaciones y análisis molecular. Citando solo algunos ejemplos, se encontró que la poliploidía aumentaba con el tiempo en el cultivo *in vitro* de un sistema heterocigoto de *Nicotiana tabacum* (Lorz and Scowcroft, 1983), se observaron bandas polimórficas de RAPD en cultivos de larga duración de tomate, pero no en cultivos de corta duración (Rus-Kortekaas *et al.*, 1994). En términos generales se comenta que, cuanto más se rompe la estructura organizativa de una planta, mayor es la posibilidad de que se produzca una mutación, como es la producción de brotes adventicios a partir de callos, células y protoplastos (González, 1993). Los efectos fenotípicos de estas mutaciones son generalmente evaluados después de la primera generación sexual y para utilizarlos en la mejora genética deben ser bien caracterizados.

En muchos casos, esta variabilidad es producida por factores externos, como resultado del uso de reguladores del crecimiento, que incrementan las posibilidades de que se produzcan mutantes. En la bibliografía se ha indicado que el uso de algunos reguladores, como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalacético (ANA) y citoquininas sintéticas, inducen inestabilidad cromosómica en el cultivo y en la posterior regeneración de plantas (Singh, 1993). Por ejemplo, cuando se producen células aneuploides en *Nicotiana tabacum* y en los híbridos de caña de azúcar cultivados *in vitro*, se asume que las auxinas ANA y 2,4-D son las responsables de la aparición de este fenómeno; ya que ello no ocurre *in vivo* normalmente (Sala, 1990). Se plantea que entre los múltiples efectos que puede causar el 2,4D esta la estimulación de la síntesis de ADN que puede resultar en endoreduplicación, la reducción del índice mitótico y el incremento del crossing-over (Rosu y Petrescu, 1995) .

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Genética y Mejoramiento de las plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ubicado en el municipio San José de Las Lajas, de la provincia La Habana.

3.1 Aspectos generales del cultivo in vitro

3.1.1 Material Vegetal

Para realizar estos experimentos se partió de semillas de los cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) Amalia (Alvarez *et al.*, 1997), Campbell-28, Lignon, Rilia y Floradel; todos de gran calidad e interés económico (MINAGRI, 1990).

3.1.2 Medio basal

El medio basal (MB) consistió en sales minerales de Murashige y Skoog (1962); suplementado con 2% de agar Gel Rite, sacarosa comercial, Tiamina e Inositol como aditivo orgánico (Cano *et al.*, 1995; Fuentes *et al.*, 1998 y Alvarez *et al.*, 1999b), (Tabla 1). El pH se ajustó a 5.8, previo a la adición del agente solidificante. La esterilización se llevo a cabo en autoclave por espacio de 20 minutos a 121⁰C con 1.5 atmósferas de presión.

Tabla 1. Composición del medio presentado por Murashige y Skoog (1962), utilizado como medio básico en este estudio

	Elementos	mg. L ⁻¹
Macroelementos	CaCl ₂ x2H ₂ O	440.0
	KNO ₃	1900.0

	KH_2PO_4	170.0
	NH_4NO_3	1650.0
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	37.3

	Elementos	mg. L ⁻¹
Microelementos	$\text{CoCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	H_3BO_3	5.2
	KI	0.83
	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{ZnO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Suplementos	Tiamina	0.1
	Inositol	100.0
	Sacarosa	30 000

3.1.3 Esterilización de las semillas

Las semillas en todos los experimentos fueron esterilizadas superficialmente con agua jabonosa incluyendo dos gotas de Tween 80%, posteriormente fueron lavadas con agua destilada y llevadas al flujo laminar (ESI FLUFRANCE), donde se sumergieron en solución de cloro comercial al 50% (3% de cloro activo) durante 15 minutos y se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril hasta eliminar el agente desinfectante (Alvarez *et al.*, 1999b).

Una vez desinfectadas las semillas fueron colocadas sobre la superficie del medio de cultivo MB, contenido en pomos de vidrio a razón de 20 ml por recipiente.

3.1.4 Tipos de explante utilizados Hipocótilos y Cotiledones

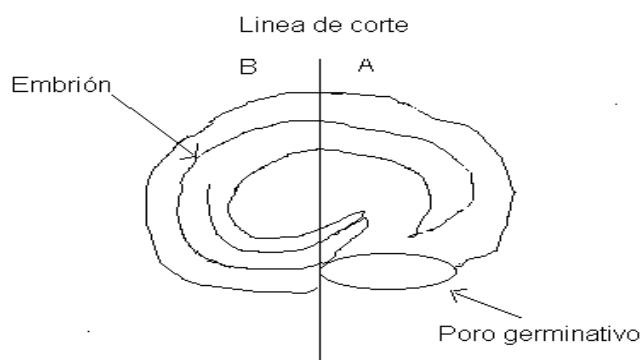
Los hipocótilos y cotiledones fueron obtenidos a partir de germinados cultivados *in vitro* en MB (Cano *et al.*, 1995; Fuentes *et al.*, 1998 y Alvarez *et al.*, 1999b). Entre

los 7 y 10 días posteriores a la germinación, los cotiledones de las plantas germinadas estaban perfectamente desarrollados, en este estadio se seccionaron los segmentos apicales de los hipocótilos (1 cm) y la zona central de las hojas cotiledonares.

Semillas cortadas

Las semillas enteras se imbibieron en cámaras húmedas (a razón de 25 semillas por cámara) preparadas con placas petri, papel de filtro y 10 ml de agua destilada y estéril por placa. Al cabo del tiempo estipulado para cada tratamiento las semillas fueron cortadas en dos partes, quedando divididas según indica la figura 1; la porción A (SC) fue usada como explante (Ezura *et al.*, 1993), consistente en la parte más próxima de la plúmula y la radícula del embrión.

Figura 1. Preparación de explantes provenientes de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* . Mill). La parte A fue cultivada como explante



3.1.5 Condiciones de incubación

La incubación se realizó en un cuarto de crecimiento a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ según lo recomendado por Cano *et al.*, (1995), con fotoperíodo de 16 horas luz y aproximadamente 4000 Lux, suministrados por tubos fluorescentes.

3.2 Descripción de los experimentos realizados con diferentes reguladores del crecimiento y tipos de explante

3.2.1 Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y organogénesis en hipocótilos y cotiledones del cultivar Amalia.

Este experimento se realizó con el objetivo de conocer el efecto de las bajas concentraciones de Bencilamino purina (BAP) y de dos nuevos reguladores del crecimiento de producción nacional en los procesos de callogénesis y organogénesis del tomate. El Pectimorf, es un oligopectato producido en el Laboratorio de Oligosacarinas del INCA; y el Biobras-6 más conocido por BB6, análogo de brasinoesteroide sintetizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la UH. Para ello, se tomaron los segmentos apicales de hipocotilos y hojas cotiledonares del cultivar Amalia como explantes. Las concentraciones y combinaciones utilizadas se muestran en la Tabla 2, las que fueron adicionadas al medio basal (MB).

Tabla 2. Composición de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo ensayados

Tratamientos	Reguladores del Crecimiento		
	BAP (mg.L ⁻¹)	Pectimorf (mg.L ⁻¹)	Biobras-6 (mg.L ⁻¹)
B ₁	0.25	-	-
B ₂	0.5	-	-
B ₃	1	-	-
P ₁	-	1	-
P ₂	-	5	-
P ₃	-	10	-
P ₄	-	15	-
P ₃ +B ₁	0.25	10	-
P ₃ +B ₂	0.5	10	-
P ₃ +B ₃	1	10	-
BB6 ₁	-	-	10 ⁻⁴
BB6 ₂	-	-	10 ⁻³
BB6 ₃	-	-	10 ⁻²

BB6₄	-	-	10 ⁻¹
BB6₄+ B₁	0.25	-	10 ⁻⁴
BB6₄+B₂	0.5	-	10 ⁻⁴
BB6₄+B₃	1	-	10 ⁻⁴

3.2.2 Efecto de la imbibición en agua de semillas del cultivar Amalia en la callogénesis y organogénesis *in vitro*

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto que produce en el proceso morfogénético *in vitro* del tomate la imbibición previa, en agua, de las semillas que serán usadas como explantes. Las semillas del cultivar Amalia previamente desinfectadas, se imbibieron en agua destilada y estéril durante 24, 48 y 72 horas (T₁, T₂, T₃, respectivamente). Transcurrido este tiempo se cortaron las semillas y se colocó la SC directamente sobre el medio de cultivo (MB), a razón de 5 explantes por pomo (Figura 2). En cada tratamiento se utilizaron 10 pomos.

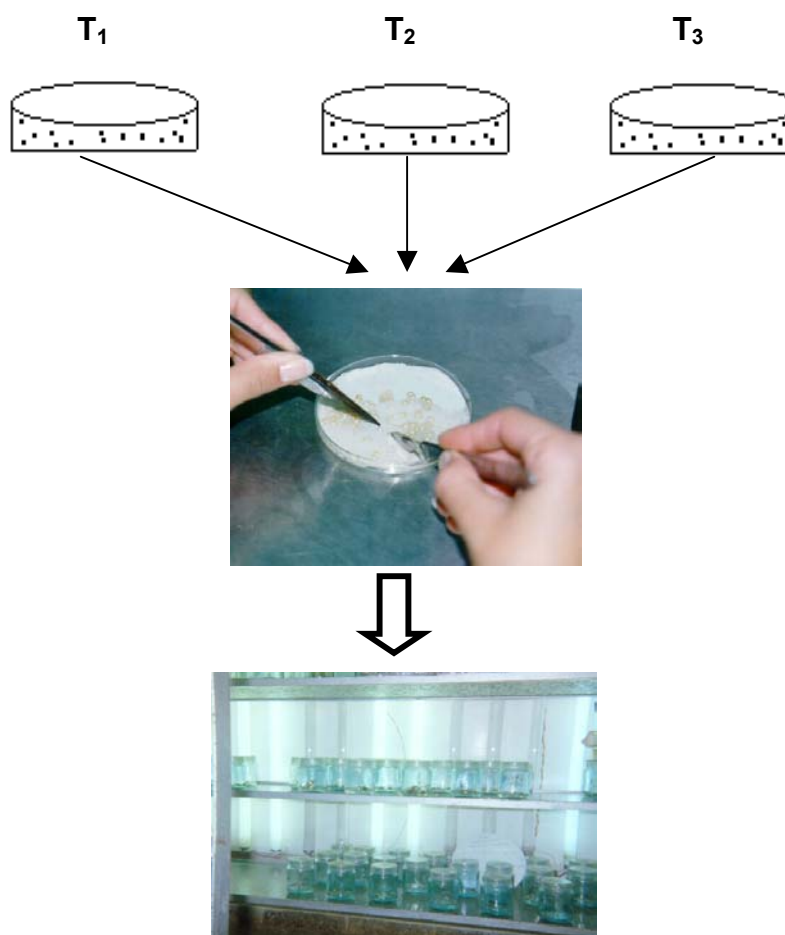


Figura 2. Proceso de imbibición, corte y cultivo de las semillas del cultivar Amalia

3.2.3 Regeneración de plantas partiendo de semillas cortadas (SC) de diferentes cultivares en ausencia de reguladores del crecimiento

Se usaron 5 genotipos diferentes de tomate cultivado con interés económico (Campbell-28, Amalia, Lignon, Rilia y Floradel); con el objetivo de conocer el efecto del genotipo en la morfogénesis *in vitro* utilizando el procedimiento de la semilla cortada. Las semillas de estos cultivares fueron previamente desinfectadas y precultivadas en agua destilada y estéril durante 48 horas, que fue el tratamiento escogido en el experimento 3.2.2. Al cabo de este tiempo, las SC se colocaron directamente sobre el medio de cultivo (MB) a razón de 5 explantes por pomo. En cada tratamiento se utilizaron 10 pomos.

3.2.4 Imbibición de semillas en BAP, Ácido Giberelico, Pectimorf y Biobras-6 y cultivo de SC en ausencia de reguladores del crecimiento

Buscando mejorar la eficiencia de la regeneración *in vitro* del cultivar Amalia, se estudió el efecto que tiene en este proceso la imbibición de las semillas enteras en soluciones con diferentes reguladores del crecimiento. Con este objetivo se utilizaron diferentes concentraciones de Bencilamino purina (BAP), Ácido Giberélico (AG), Pectimorf (P), Biobras-6 ((BB6) y un control con agua destilada y esteril (H₂O), según aparecen en la tabla 3. Después de 48 horas de imbibición, las SC fueron colocadas directamente sobre el medio de cultivo MB a razón de 5 explantes por pomo. En cada tratamiento se utilizaron 10 pomos.

Tabla 3. Concentraciones de reguladores del crecimiento utilizadas para imbibir semillas del cultivar Amalia

Tratamiento	Reguladores del Crecimiento (mg.L ⁻¹)
H ₂ O	-

BAP	2
AG₁	1
AG₂	2
P₃	10
BB6₁	10 ⁻⁴
BB6₂	10 ⁻³
BB6₃	10 ⁻²

3.2.5 Imbibición de semillas en agua y cultivo de SC en medios suplementados con Pectimorf, Biobras-6, BAP y Zeatina.

Semillas del cultivar Amalia fueron precultivadas siguiendo el mismo procedimiento del experimento 3.2.1; colocándose posteriormente las SC en medios de cultivo MB suplementados con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento como Pectimorf (P), Biobras-6 (BB6), Bencilamino purina (BAP) y Zeatina (Z); utilizados indistintamente (Tabla 4) a razón de 5 explantes por pomo. En cada tratamiento se utilizaron 10 pomos.

Tabla 4. Concentración de reguladores del crecimiento utilizadas en los medios de cultivo.

Tratamientos	Reguladores del Crecimiento (mg.L-1)			
	Pectimorf	BB6	BAP	Zeatina
Control	-	-	-	-
P₃	10	-	-	-
BB6₁	-	10 ⁻⁴	-	-
BAP	-	-	2	-
Z	-	-	-	2

3.3 Enraizamiento y adaptación de los regenerantes

Los brotes obtenidos, tanto por regeneración directa como indirecta, en cada tratamiento del experimento 3.2.3, fueron subcultivados a medio fresco cuando alcanzaron 1 cm de longitud para que continuaran su desarrollo y comenzaran a enraizar. A los 15 días ya habían emitido un adecuado sistema radical. Se inició una fase de pre-adaptación en los cuartos de cultivo, al permitir un gradual intercambio entre las vitroplántulas y el medio de cultivo con la eliminación del sellado de los pomos; continuando con el destape del sellado de los mismos en condiciones de laboratorio donde se mantuvieron por 2 días. Al cabo de este tiempo, el sistema radical de las vitroplántulas fue enjuagado con agua común para eliminar los restos del medio de cultivo previo al trasplante de las mismas.

La adaptación *ex vitro* del material proveniente del laboratorio se realizó a partir del trasplante de las vitroplántulas a bandejas plásticas (cepellones) de 72 alveolos con una capacidad de 47.61 cm³ que contenían sustrato compuesto por Litonita y Cachaza en una proporción 1:1 (Lara, 1999). Todos los requerimientos técnicos para la adaptación se realizaron según las recomendaciones de González (1998) y Casanova (1999).

3.4 Evaluaciones y análisis estadístico

3.4.1 Callogénesis.

Después de tres semanas de cultivo (21 días) en todos los experimentos se llevó a cabo una valoración cualitativa, en 50 explantes por tratamiento; de los siguientes aspectos:

Desarrollo del callo: según escala 1 (Alvarez *et al.*, 1999b)

Escala 1:

Callo abundante (CA): rodea completamente al explante formando una masa abundante.

Poco callo (PC): callo escaso formado en la zona de corte del explante.

Ausencia del callo (AC): no hubo respuesta al tratamiento.

Tipo de callo:

Morfogenético (M): Abundante formación de yemas y brotes.

Nodular (N): Compactos y duros con abultamiento de color verde en la superficie.

Friable (F): Blandos, acuosos y sueltos.

Color del callo: según escala 2 (Alvarez *et al.*, 1999b).

Escala 2:

Crema (C).

Verde claro(VC).

Mixto (M): callo con zonas de diferentes tonalidades.

Al mismo tiempo, se evaluó el número de explantes con callo en cada tratamiento. Los resultados fueron procesados mediante una comparación de proporciones a través de la Prueba de Shi cuadrado y la comparación de la dódima de rangos múltiples de Duncan al 5%, en caso de existir diferencias significativas entre las medias (Duncan, 1951).

3.4.2 Organogénesis

El número de yemas y brotes por explante se transformaron a $\sqrt{x}+1$, los resultados fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, modelo fijo (Snedecor y Cochran, 1971); docimándose las medias según la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%, en caso de existir diferencias significativas entre las medias.

El número de explantes con brotes, brotes anormales, yemas y raíces fueron expresados en porcentos y procesados mediante una comparación de proporciones; a través de la Prueba de Shi cuadrado y en caso de existir diferencias significativas entre las medias se docimaron por Pruebas de Duncan al 5%.

3.4.3 Adaptación a condiciones *ex vitro*

El enraizamiento de los brotes fue evaluado cualitativamente siguiendo los patrones establecidos para el desarrollo radical *in vitro* (Taiz y Zeiger, 1991).

El conteo del número de hojas y las mediciones de la altura de las plantas (cm) se efectuaron al momento de iniciar el trasplante a condiciones *ex vitro*, a los 15 y 30 días después.

Para determinar las diferencias entre tratamientos los resultados fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, modelo fijo (Snedecor y Cochran, 1971); docimándose las medias según la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%, en caso de existir diferencias significativas entre las medias. Estos valores fueron procesados con ayuda del paquete graficador Sigmaplot 2.0.

La duración del período de adaptación de las vitroplántulas fue determinada atendiendo al comportamiento de las variables evaluadas y los patrones establecidos para el desarrollo de plántulas de tomate en los semilleros (MINAGRI, 1983; Lara, 1999).

3.5 Caracterización histológica de la regeneración *in vitro* a partir de semillas cortadas

3.5.1 Microscopio óptico

Esta técnica se realizó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Fisiología Vegetal del INCA y en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. El material vegetal escogido para el monitoreo histológico fueron las SC. Desde el inicio del cultivo *in vitro* de los explantes, se seleccionaron 10 muestras diariamente hasta el momento en que comenzaron a emerger los brotes. Secciones frescas de segmentos apicales de germinados de SC de la variedad Amalia, fueron cortadas en forma longitudinal. Las secciones fueron fijadas en solución de zafranina y fotografiadas en un microscopio Leica.

3.5.2 Microscopio electrónico de barrido

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Química-Física del CIGB. Segmentos apicales de germinados de SC de la variedad Amalia fueron tomados

a los 7 y 11 días de cultivo; se fijaron en Glutaldehído al 2.5% en buffer fosfato 0.1 M pH 7.3 por 1 hora a 4°C, posteriormente, se lavaron en el mismo buffer (Fosfato 0.1M) por 1 hora a 4°C.

Se posfijaron en Tetraoxido de Osmium (OsO₄) al 1% por 1 hora a 4°C. Se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto por una noche a temperatura ambiente.

El punto crítico se realizó en un equipo Samdey-PVT-3B de la marca Tousimis U.S.A. Para la evaporación se utilizó el Ion Sputter JFC-1100 Jeul con una capa de aproximadamente 400 Å.

Las muestras fueron observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido Jeul-Jeeni. JMS-T330.

3.6 Análisis de la estabilidad genética de las vitroplántulas

3.6.1 Estudio bioquímico

Para conocer las posibles afectaciones genéticas del material vegetal regenerado en el epígrafe 3.2.2, se realizó un análisis comparativo de los perfiles electroforéticos de isoenzimas en hojas (primer trifoliolo desarrollado), de 40 vitroplántulas regeneradas a partir de SC en medio MB (epígrafe 3.2.2) y de vitroplántulas del cultivar Amalia germinadas *in vitro* en medio MB.

Para la preparación de los extractos se tomaron muestras de 2g de tejido foliar y se homogeneizaron en frío con buffer que contenía Tris-HCl 0.05M a pH 7.2, sacarosa 10% y 14μM de ditriitol en proporción 1:2. El extracto fue centrifugado a 12 000 r.p.m. a una temperatura de 0°C durante 10 minutos, sometiéndose entonces el sobrenadante a electroforesis (Florido, 1999).

En todos los casos, las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos, se efectuaron en geles de poliacrilamida al 10% con buffer Tris-HCl 0.375M pH 8.9 y buffer Tris-Glicina 0.025M-0.019M pH 8.3 en los compartimentos.

El tiempo de corrida en cada caso estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de Kolrhauch hasta aproximadamente 6 cm del inicio. Se utilizó una

intensidad de corriente constante de 25 mA, en una cámara de electroforesis vertical Hoefer Mighty Small II (SE 245).

Después de efectuada la separación se realizaron las tinciones específicas para la caracterización en los sistemas Peroxidasa (Prx), Malato deshidrogenasa (Mdh), Glutamato oxalato transaminasa (Got), Esterasa (Est) y Anhidrasa carbónica (AC), (tabla 5).

Tabla 5 . Sistemas isoenzimáticos utilizados

Tipo de enzima	Sistema enzimático	Nomenclatura	Método de tinción
Oxidorreductasas	Prx	E.C.1.11.1.7	Iglesias, 1986
	Mdh	E.C.1.1.1.37	Wendel y Weeden, 1989
Transferasas	Got	E.C.2.6.1.1	Wendel y Weeden, 1989
Hidrolasas	Est	E.C.3.1.1.-	Iglesias, 1986
Liasas	AC	E.C.4.2.1.1	González, 1990

La posición relativa de cada banda fue establecida sobre la base de la distancia media de migración obtenida, dividida entre la distancia de migración del azul de bromofenol (Rf). Cada banda se caracterizó por un valor numérico de 0 (ausencia de la banda) y 1 (presencia de la banda).

3.6.2 Estudio citogenético

En este estudio se analizó el cariotipo de 20 vitroplántulas adaptadas a condiciones *ex vitro* y seleccionadas al azar del tratamiento T₂ (epígrafe 3.4), del cultivar Amalia. Para ello, se tomaron raíces apicales de 1 cm de longitud de cada plántula, las que fueron pretratadas con 8-hidroxiquinolina durante 4 horas, y después de ser lavadas con agua destilada, se fijaron en etanol-ácido acético en una proporción 3:1.

Las raíces fijadas se hidrolizaron en ácido clorhídrico 1 normal a 60°C durante 12 minutos, antes y después de este proceso fueron lavadas. Se sometieron posteriormente a la coloración con hematoxilina-laca crómica durante 1 hora y a

continuación los ápices se colocaron en portaobjetos con ácido acético a 45% para realizar el *squash* (Morales, 1997; Xiqués, 1998).

El conteo cromosómico se realizó en 50 células por planta con ayuda de un microscopio óptico Leitz, las mejores preparaciones fueron fotografiadas.

3.7 Análisis económico

Este análisis se realizó con el fin de conocer el efecto económico del nuevo protocolo de regeneración *in vitro* que se propone en este trabajo para este cultivo en ausencia de reguladores del crecimiento y con la incorporación al medio de biorreguladores cubanos al protocolo de regeneración a partir de hipocótilos recomendado por Alvarez *et al.*, (1999b), para el cultivar Amalia.

En el análisis se tuvieron en cuenta los gastos que implica la utilización de las citoquininas comerciales y demás componentes del medio de cultivo (tabla 6), según los precios que informa SIGMA (1999); mientras que para el Pectimorf se partió del costo de producción actual, reflejado en el informe final del proyecto titulado “Obtención y purificación de oligogalacturónidos bioactivos a partir de la pectina cítrica, su aplicación en la sustitución de hormonas vegetales utilizadas en la micropropagación *in vitro* de diferentes especies de plantas” (Iglesias, 1998). Los valores que se reflejan son en moneda libremente convertible e incluyen hasta la fase final de obtención de vitroplántulas con 4 pares de hojas.

Tabla 6. Componentes del medio de cultivo utilizados para el análisis económico

Reactivo	Cantidad	Precio (usd)
Medio de cultivo Murashigue y Skoog, (1962)	1L	1.80
Gel Rite	250g	44.80
BAP	100mg	8.30
Pectimorf	100mg	0.47

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y la organogénesis en hipocótilos del cultivar Amalia

En aquellos tratamientos donde se le agregó al medio de cultivo diferentes dosis de BAP se observó un cambio de coloración en los hipocótilos durante la primera semana de cultivo, estos se tornaron de un color verde intenso y comenzaron a ganar en longitud y grosor. Al mismo tiempo, en algunos explantes del tratamiento B₁ aparecieron raíces espaciadamente, que fueron aumentando en cantidad y longitud hasta estar presentes en la mayor parte de los explantes e este tratamiento (Tabla 7).

Durante este ensayo pudimos observar (Tabla 7), que las tres concentraciones de BAP agregadas al medio de cultivo favorecieron la aparición de callo en los extremos apicales del explante; con poco crecimiento, textura compacta y algunos abultamientos de color verde oscuro en la superficie, sin diferencias significativas entre si entre los tratamientos en cuanto a formación de callos, en que se distinguen los altos valores obtenidos con la adición de bajas dosis de BAP a los medios de cultivo; estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios realizados con dosis mayores de 1mg.L⁻¹ de este regulador (Santana, 1985b; Alvarez *et al.*, 1999b).

Tabla 7. Efecto de las diferentes combinaciones de BAP en la morfogénesis *in vitro*, de segmentos apicales de hipocótilos de tomate, cultivar Amalia

Tratamientos	Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (Brotes/exp totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)

B₁	1.70±0.05	1.54	76	100	80 a
B₂	1.70±0.05	1.54	76	93	0 b
B₃	1.67±0.04	1.58	86	100	0 b
ESx±	n.s	0.06 n.s	7.30-02E n.s	2.69-02E n.s	8.07-02E n.s

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

*** significativo para $p < 0.001$

La formación de brotes adventicios fue muy favorecida con la presencia del BAP en los medios de cultivo (figura 3). Los brotes comenzaron a emerger a partir de los 16 días de cultivo, principalmente de la zona de corte e indirectamente desde los callos en más del 50% de los explantes de los tres tratamientos (figura 3 a y b). Aunque no hubo diferencias significativas entre las variantes aplicadas en cuanto al número de brotes por explante, es necesario destacar que la dosis de 0.5 mg.L^{-1} de BAP aportó 2 brotes por explante (tabla 7). Resultados similares han sido reportados por otros investigadores (Mirghis *et al.*, 1995), los que coinciden en reafirmar el comportamiento recalcitrante de la especie ante la inducción de la morfogénesis.

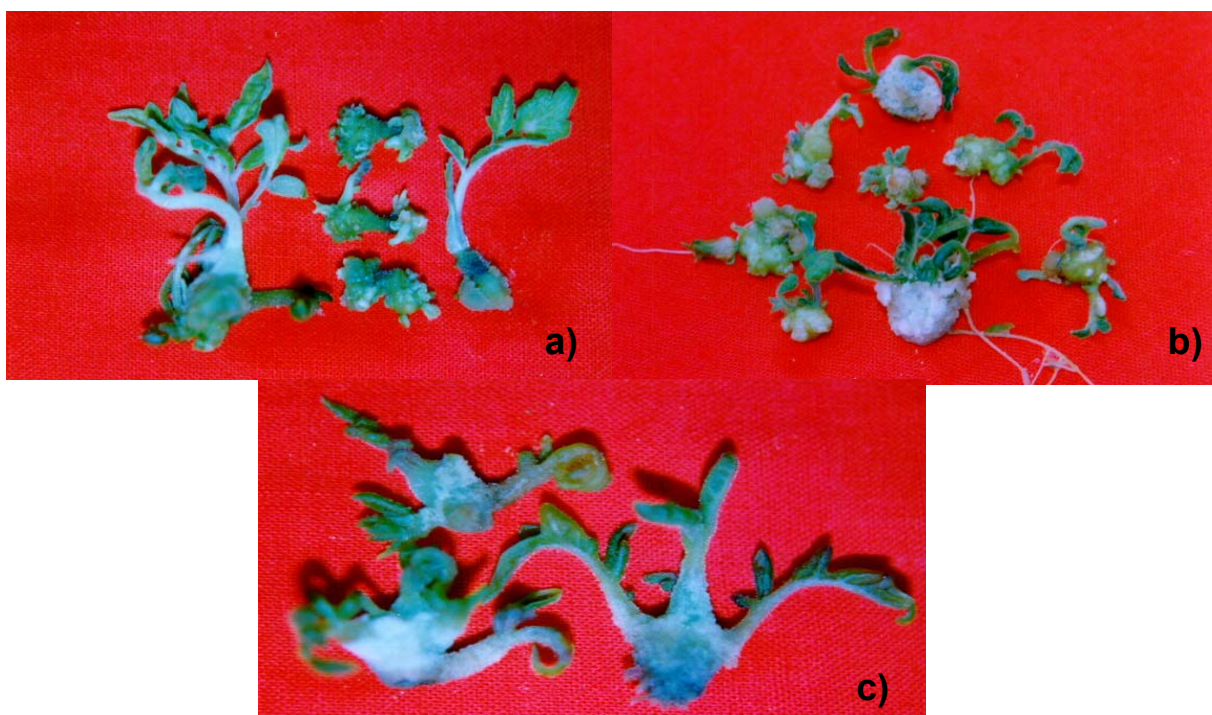


Figura 3. Regeneración in vitro de hipocótilos cultivados en medios suplementados con BAP. a) Regeneración directa, b) Regeneración indirecta, c) Brotes anormales

Es necesario destacar que en la medida que se elevó la concentración de BAP en el medio de cultivo se hizo más frecuente la aparición de hojas y brotes anormales; caracterizados por un excesivo grosor de sus hojas y tallos, que en algunos casos estuvo acompañado por la ausencia de la yema apical (figura 3c).

El enraizamiento resultó el proceso menos frecuente, como se puede observar en

la tabla 7, sólo en el tratamiento B₁ se formaron raíces en el 80% de los explantes; evidenciando un aparente desbalance hormonal al formarse éstas primero que los brotes.

De igual forma, a los 7 días de cultivados los hipocótilos en medios con Pectimorf, éstos estaban engrosados, con un color



Figura 4 . Formación de callos en hipocótilos del cultivar Amalia cultivados en medios suplementados con Pectimorf

verde intenso; momento a partir del cual comenzaron a aparecer raicillas en uno de los extremos del explante, llegando a ser múltiples. A medida que se engrosó el extremo apical de los hipocótilos, aparecieron callosidades de cicatrización, que en algunos casos, resultaron ser callos morfogénéticos de poco crecimiento y textura compacta, como se observa en la figura 4.

La adición del Pectimorf al medio de cultivo estimuló la formación de callos en cultivos como Café, Caña de azúcar y *Anthurium cubense*, (Garbey *et al.*, 1998; Santos 1998; Cevallos, 2000).

El mayor porcentaje de explantes con callo se observó en los tratamientos P₂ y P₃ (Tabla 8), siendo estas variantes las que aportaron una mayor frecuencia de regeneración, destacándose el tratamiento P₃ con una eficiencia de regeneración de 2.64 brotes por explante. En la tabla 8 se muestra como en dosis menores de 10 mg.L⁻¹ de Pectimorf no ocurrió la regeneración de brotes; mientras que en dosis superiores aun cuando se mantuvo el 100% de los explantes con callos, disminuyó la frecuencia y eficiencia de regeneración, lo cual demuestra que a esta concentración se promueve una fuerte actividad morfogénética en los segmentos apicales de los hipocótilos.

En los ensayos realizados con este nuevo regulador se observó una marcada estimulación del vigor de los brotes vegetativos obtenidos, coincidiendo con la respuesta obtenida en cultivos como café, ajo, caña de azúcar, plátano, tabaco y cítricos (Diosdado, 1997; González *et al.*, 1999 y Cevallos, 2000).

Tabla 8. Efecto del Pectimorf en la morfogénesis in vitro de los hipocótilos tomate, cultivar Amalia

Tratamientos	Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (Brotes/exp totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)

P₁	0±0.04 c	0 d	0 c	30 b	33 b
P₂	1.75±0.04 b	1.40 b	80 ab	30 b	33 b
P₃	2.67±0.04 a	2.67 a	100 a	100 a	100 a
P₄	1.71±0.06 b	0.80 c	46 b	100 a	100 a
ESx±	***	0.07***	0.12***	0.12***	0.12***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

*** significativo para $p < 0.001$

Al discutir estos resultados se pone en evidencia la semejanza del proceso inducido por la presencia del Pectimorf con el descrito en el bioensayo anterior, donde se utilizó el BAP como regulador del crecimiento. González (1999), realizó un bioensayo clásico en la inducción de callos y crecimiento de brotes de tabaco utilizando el Pectimorf, donde demostró un efecto de tipo citoquinínico, ello unido a los resultados obtenidos en este mismo sentido por Garbey *et al.*, (1998) con callos de *Saccharum officinarum* L., al sustituir la kinetina por Pectimorf confirman el tipo de acción reguladora que ejerce este oligopeptato.

La introducción de los oligogalacturonidos en las tecnologías de regeneración *in vitro* pudiera constituir una promisorio alternativa para mejorar la eficiencia económica del proceso con insumos nacionales, al elevar los coeficientes de multiplicación y obtener plántulas con un desarrollo vegetativo adecuado (Diosdado, 1997; Cabrera, 1999a).

Los resultados del experimento donde se combinó la acción del Pectimorf con el BAP, demostraron que la unión de estos desencadenó una actividad morfogénica con características similares a la observada en presencia del oligopeptato; cuando se utilizaron 10 mg.L⁻¹ del bioproducto y 0.5 mg.L⁻¹ de BAP (P₃+B₂) se obtuvo un 100% de explantes con callos, resultado logrado con la adición de solo 10 mg.L⁻¹ de Pectimorf en el experimento anterior (tabla 9)(Figura 5).



Figura 5. Formación de brotes a partir de callos en hipocótilos cultivados en presencia de Pectimorf combinado con BAP

La capacidad organogénica de los hipocótilos sometidos a estos tratamientos (Tabla 9), no difirió significativamente entre sí en cuanto al porcentaje de explantes con brotes, ni al número de brotes por explante; no mostrando una superioridad numérica en cuanto a su desarrollo si la comparamos con la respuesta obtenida con la sola presencia del oligopectato en el medio de cultivo. Estos resultados indican que si bien se esperaba que el BAP debía incrementar la respuesta

regenerativa de este tipo de explante en su unión con el oligopectato, la disminuyó; lo que pudiera estar motivado por una acción de desbalance hormonal creada por el exceso de citoquinina en el medio de cultivo, que provoca un bloqueo en la respuesta del explante.

Tabla 9. Acción del Pectimorf y BAP en la morfogénesis in vitro del tomate

Tratamientos	Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración	Frecuencia explantes regenerado (%)	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)

		(Brotos/exp totales)			
P ₃ +B ₁	1.41±0.07	1.04	10	83 a	10 b
P ₃ +B ₂	1.50±0.04	1.12	23	100 a	3 b
P ₃ +B ₃	1.44±0.04	1.16	36	16 b	66 a
ESx±	n.s	0.04 n.s	7.72-02E n.s	8.6-02E***	8.07-02E***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

*** significativo para $p < 0.001$

En la Tabla 9, se observa que la formación de raíces tuvo un comportamiento con una tendencia no esperada, a pesar del aumento de la concentración de citoquininas en el medio de cultivo se incremento el porcentaje de explantes con raíces; este comportamiento pudiera deberse a un desbalance hormonal intrínseco causado por la adición de combinaciones inadecuadas para este tipo de explantes de estos reguladores del crecimiento.

Los oligopectatos son oligosacarinas consideradas actualmente como reguladores endógenos del desarrollo y la morfogénesis de las plantas; éstos regulan la síntesis y acción de las hormonas en los distintos procesos de organogénesis y el crecimiento (Aldington *et al.*, 1991; Aldington y Fry, 1993a; Messiaen y Van Astem, 1993).

Los oligopectatos pudieran llevar información y ser portadores de mensajes químicos, que en este caso pueden desencadenar procesos fisiológicos de regeneración y división de la pared celular, ya que ellos promueven en las células vegetales la síntesis de importantes sustancias que actúan en estos procesos (Diosdado, 1997; Cabrera, 2000).

Tabla 10. Caracterización del proceso morfogénético ocasionado por la presencia de Biobras-6 en hipocótilos del cultivar Amalia

Tratamiento	Brotos/exp	Eficiencia de	Frecuenci	Explantos	Explantos
-------------	------------	---------------	-----------	-----------	-----------

s	regenerado	regeneración (Brotos/exp totales)	a explantos regenerado (%)	con callo (%)	con raíces (%)
BB₁	1.48	1.33	64	0	64
BB₂	1.57	1.48	28	0.7	42
BB₃	1.4	1.12	21	14	35
BB₄	1	1.09	21	14	57
ESx±	n.s	0.07 n.s	0.12**	8.17-02E n.s	0.12 n.s

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

Al adicionar al medio de cultivo basal donde se cultivaban hipocótilos el análogo de brasinoesteroide Biobras-6, se observó una pobre y casi nula formación de callo, con un notable enraizamiento en todas las combinaciones probadas por uno de los extremos de los explantes (Tabla 10).



Figura 6. Formación de callos a partir de hipocótilos cultivados en medios suplementados con Biobras-6 y BAP

En la tabla 10 se expone el comportamiento del proceso organogénico y la formación de callo ante la acción del Biobras-6. Este análogo de brasinoesteroide a concentraciones mayores de 10^{-4} mg.L⁻¹ (BB₁), mantuvo constante la formación de brotes y el número de brotes por explantes. Sí bien, la eficiencia de regeneración no fue

superior a la de otros experimentos donde se usaron diferentes reguladores, se observó regeneración directa a partir de los segmentos apicales de hipocótilos. González *et al.*, (1998) sugieren una posible acción de los brasinoesteroides como promotores de la diferenciación celular, aunque aún se desconozcan los mecanismos por los cuales se llevan a cabo.

Los resultados hasta aquí descritos demuestran que este análogo de brasinoesteroide, en cualquiera de las concentraciones aplicadas, no incrementó los valores de las variables morfogénicas que describen a un eficiente proceso de regeneración, pero cabe señalar los notables resultados alcanzados en la regeneración directa de más del 50% de los explantes del tratamiento BB₆₁ (tabla 10).

Las respuestas de este bioensayo se unen a las obtenidas a través de múltiples investigaciones, sobre la capacidad de los brasinoesteroides para activar a muy bajas concentraciones los procesos metabólicos y el crecimiento vegetal (Núñez, 1999; García, 1998); lo que abre nuevas perspectivas en su utilización como sustituto de las hormonas de crecimiento en los diferentes procesos biológicos.

Es necesario destacar que el Biobras-6 fue también efectivo en los procesos morfogénicos del cítrico, arroz, caña de azúcar, papa y café; con la ventaja de que los mejores resultados se encontraron a las concentraciones más bajas del producto (González *et al.*, 1995; Diosdado, 1997; Moré *et al.*, 1998 y García, 1998).

El uso de 10^{-4} mg.L⁻¹ de Biobras-6 combinado con diferentes dosis de BAP como suplemento del medio de cultivo favoreció la formación de callos de abundante crecimiento, morfogénicos y de color verde claro en todos los tratamientos ensayados (Figura 6). Como se destaca en la tabla 11, a medida que se aumentó la concentración de BAP en el medio de cultivo se obtuvo un mayor porcentaje de explantes con callo. Este resultado evidenció el comportamiento superior de estas variantes ante aquellas donde se utilizó solamente Biobras-6 como estimulador de la morfogénesis *in vitro*, evidenciándose una acción sinérgica entre estos dos reguladores.

Tabla 11. Efecto de la acción del Biobras-6 combinado con BAP en la morfogénesis *in vitro* del tomate

Tratamientos	Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (Brotes/exp totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callo (%)
BB ₁ +B ₁	1.68±0.05 a	1.61a	90 a	70 b
BB ₁ +B ₂	1.41±0.09 b	1.12 b	30 b	100 a
BB ₁ +B ₃	0±0.05 c	0 c	0 c	100 a
ESx±	***	0.07***	0.15***	9.48-02*

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan (p<0.05)

*** significativo para<0.001

Gómez *et al.*,(1996), trabajando con la variedad de papaya Maradol Rojo, encontraron regeneración de plantas a partir de embriones somáticos favorecida por las concentraciones de 10^{-4} mg.L⁻¹ de BB6 en combinación con 0.2 mg.L⁻¹ de BAP, tanto para el número de plantas como para la cantidad de conglomerados que formaron plantas. De igual manera, en este experimento la regeneración de brotes ocurrió en mayor medida en aquellos tratamientos donde era menor la concentración de BAP en el medio, destacándose el BB₁+B₁ con una mayor

frecuencia y eficiencia (Tabla 11). Es necesario destacar que no hubo formación de raíces en los tratamientos ensayados en este experimento.

4.2 Efecto del BAP, Pectimorf y Biobras-6 sobre la callogénesis y la organogénesis en cotiledones del cultivar Amalia



Figura 7. Regeneración de brotes a partir de cotiledones cultivados en medios suplementados con bajas concentraciones de BAP

Después de 10 días de cultivados los cotiledones en diferentes concentraciones de BAP, estos estaban engrosados, con una coloración verde intensa y a partir de la zona de corte comenzó a formarse un tejido compacto de cicatrización a ambos extremos de las hojas cotiledonales; pasados los 16 días, no habían proliferado en crecimiento y emergían múltiples yemas, de las que se desarrollaron brotes de color verde intenso, como los mostrados en la figura 7.

La primera respuesta del tejido ante el medio de cultivo está dada por la interacción de los niveles endógenos y exógenos de hormonas. Diferentes autores, como Torrelli *et al.*, (1996) y Fuentes *et al.*, (1998), encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración de plantas de tomate, estando ésta determinada, en gran medida, por el tipo de explante usado, aún cuando se utilizan diferentes explantes de una misma planta.

En este experimento se presentó una frecuencia de regeneración de un 100% en todas las variantes, sin que estuviera precedida por la formación de callos; por lo que se evidencia una respuesta muy específica de regeneración directa en las hojas cotiledonares.

En la figura 8, se puede observar que la mayor eficiencia de regeneración se alcanzó en el tratamiento B₂, con 3.78 brotes por explante, resultado que no difirió estadísticamente del logrado en el tratamiento B₃ y fue superior al obtenido por Fuentes *et al.*, (1998), cuando obtenían regeneración de brotes (2.75 brotes por explante regenerado) con una frecuencia de un 57% a partir de cotiledones en medio complementado con 0.5 mg.L⁻¹ de Zeatina y 0.1mg.L⁻¹ de AIA.

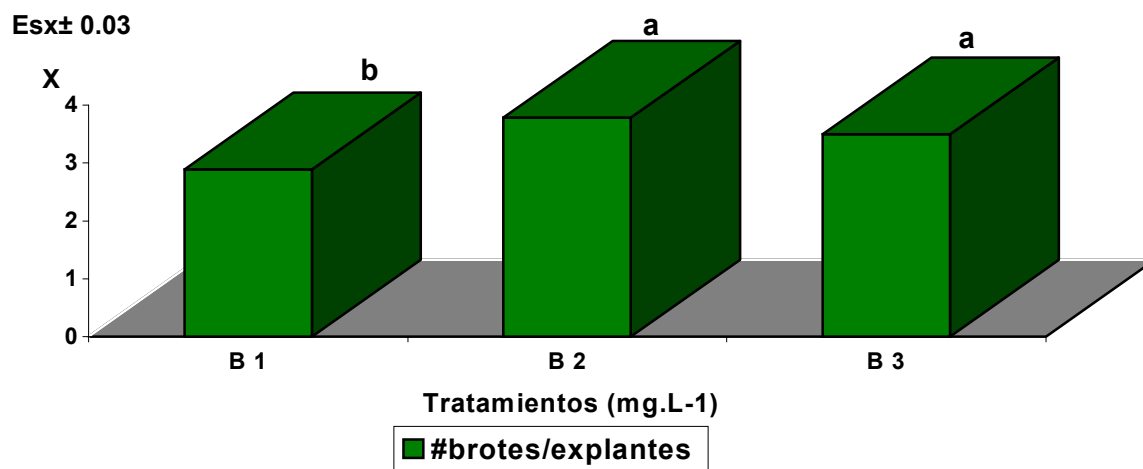


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en la regeneración in vitro de hojas cotiledonares de tomate

Desde los primeros días de iniciado el cultivo de los cotiledones en el medio suplementado con Pectimorf, se incrementó el crecimiento en longitud y grosor de los explantes, tornándose éstos de un color verde intenso. A medida que avanzó el tiempo de cultivo, algunos explantes de los tratamientos P₂, P₃ y P₄ (Tabla 12), comenzaron a enraizar en uno de los extremos del mismo, llegando a emitir largas raíces.

Tabla 12. Actividad morfogénica causada por la acción del Pectimorf en hojas cotiledonares del cultivar Amalia

Tratamientos	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)
P ₁	0 b	0
P ₂	0 b	13

P₃	0 b	13
P₄	26 a	26
ESx±	6.44-02E***	8.77-02E n.s

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

*** significativo para $p < 0.001$

Este experimento demostró claramente que el Pectimorf en las dosis estudiadas no favoreció el desarrollo de brotes en hojas cotiledonares de tomate. Solo con la mayor de las dosis estudiadas (P_4), se pudo observar una incipiente formación de callo que alcanzo al 26% de los explantes bajo ese tratamiento (Tabla 12), sin que se tuvieran indicios de regeneración alguna durante el tiempo de cultivo. Esta respuesta fue inferior a la obtenida cuando utilizábamos segmentos apicales de hipocótilos como explantes cultivados en medios suplementados con iguales combinaciones de reguladores, lo que denota una respuesta diferencial de cada explante causada por diferencias endógenas del balance hormonal.



Figura 9. Regeneración indirecta en hojas cotiledonares cultivadas en medios suplementados con Pectimorf y BAP

La presencia del oligopectato combinado con concentraciones menores de 1mg.L^{-1} de BAP, permitió incrementar la respuesta de los

explantes en cuanto a frecuencia de regeneración se refiere en comparación con la obtenida con esta misma combinación de reguladores aplicada a los segmentos apicales de hipocótilos.

En los tres tratamientos de este experimento se formaron callos de abundante crecimiento y color verde en más de la mitad de los explantes, destacándose P_3+B_1 con el 100% de los explantes con callos. Las variantes P_3+B_1 y P_3+B_2 , provocaron la diferenciación de brotes, con valores muy pobres y similares estadísticamente; como se puede observar en la tabla 13, la eficiencia de regeneración no fue aceptable en los dos casos. La causa de esta reacción pudiera deberse al agotamiento de los nutrientes en el medio, después de tres semanas de cultivo; lo que conduce a un desequilibrio hormonal, provocando la necesidad de un subcultivo de los callos a medios ricos en citoquininas.

La variante P_3+B_3 , fue la única donde se observó el enraizamiento de uno de los extremos de la hoja cotiledonal (figura 9). Esta respuesta pudiera estar inducida por alta concentración de citoquinina presente en el medio de cultivo.

Tabla 13. Proceso morfogénico inducido en hojas cotiledonares de tomate por la combinación de Pectimorf y BAP en el medio de cultivo

Tratamientos	Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (Brotes/exp totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)
P_3+B_1	1 a	1 a	100 a	100 a	0 b
P_3+B_2	1 a	1 a	93 a	66 b	0 b
P_3+B_3	0 b	0 b	0 b	50 b	10 a
$ESx\pm$	0***	0 n.s	7.72-02E***	8.17-02E***	3.27-02E**

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p<0.05$)

** significativo para $p<0.01$

*** significativo para $p<0.001$

De todos los factores implicados en la respuesta morfogénica, se sabe que el limitante fundamental de la inducción del mismo es la concentración hormonal. Estudios de correlación entre los niveles hormonales endógenos y procesos fisiológicos, así como experimentos sobre los efectos de las hormonas aplicadas exógenamente lo corroboran (Zorzoli *et al.*, 1994; Ricci *et al.*, 1999).

La adición de Biobras-6 en los medios de cultivo bloqueó el proceso morfogénico *in vitro* de las hojas cotiledonares de tomate, solo se observó una incipiente formación de callo de muy poco crecimiento en la zona de corte, de coloración crema y textura compacta que no alcanzó más del 5% de los explantes en el tratamiento BB6₂ (Tabla 14).

La formación de raíces fue el fenómeno más común observado en presencia del brasinólido (Tabla 14), acompañado de un proceso de oxidación irreversible que impidió la formación de estructuras y favoreció la necrosis de los explantes.

Tabla 14. Efecto del Biobras-6 en hojas cotiledonares de tomate cultivadas *in vitro*

Tratamientos	Explantes con callo (%)	Explantes con raíces (%)
BB6 ₁	0	50 a
BB6 ₂	0	10 b
BB6 ₃	5	70 a
BB6 ₄	0	75 a
ESx±	2.48-02E n.s	0.11***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

*** significativo para $p < 0.001$

El uso del Biobras-6 combinado con BAP en los medios de cultivo donde se sembraron hojas cotiledonares de tomate cultivar Amalia, mostró mejores resultados en la formación de callos que otros experimentos ensayados con anterioridad con este biorregulador (Tabla 15). Los callos desarrollados eran de color verde claro, friables y de crecimiento abundante, destacándose el tratamiento BB6₄+B₁ con el 100% de los explantes con callo.

Tabla 15. Efecto de la adición del Biobras-6 combinado con BAP en la morfogénesis in vitro de las hojas cotiledonares del cultivar Amalia

Tratamientos	# Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (# Brotes/exp totales)	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Explantes con callo (%)
BB6 ₄ +B1	1.08±0.08	0.2	20	100
BB6₄+B2	1.12±0.06	0.3	30	70
BB6₄+B3	1.2±0.06	0.5	40	60
ESx±	n.s	0.07 n.s	0.14 n.s	0.13 n.s

La regeneración de brotes fue muy incipiente, sólo se formaron a partir de los callos, con una menor eficiencia y sin diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 15). A medida que aumentó la concentración de BAP en el medio de cultivo, se incrementó tanto el porcentaje de explantes con brotes como el número de brotes por explante.

Cuando se estudió la respuesta de segmentos apicales de hipocótilos a la adición de estas mismas combinaciones de Biobras-6 y BAP (epígrafe 4.1), se obtuvo una respuesta inversa a la de este experimento, en cuanto a la formación de callos se refiere; mientras que en las hojas cotiledonares no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las variables evaluadas. Diferentes autores, como Santana (1985b), Torrelli *et al.*, (1996), encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate, estando ésta determinada, en gran medida, por las condiciones de cultivo y el tipo de explante usado, aún cuando se utilizan diferentes partes de una misma planta.

4.3 Nuevo protocolo de regeneración tomando como explante semillas cortadas

4.3.1 Imbibición de semillas en agua y cultivo en ausencia de reguladores del crecimiento, cultivar Amalia

Transcurridos de tres días de sembradas las SC en medio basal se observó la emisión de la radícula y comenzaron a elongarse los hipocótilos sin las hojas cotiledonares, que en algunas ocasiones quedaban junto a la radícula producto del fraccionamiento de la semilla.

En la siguiente semana, sobre la zona apical del hipocótilo, se inició un proceso de cicatrización en la zona de corte, que en algunos explantes concluyó con la formación de callos de poco crecimiento, compactos y de color verde. Según se puede observar en la tabla 16, mientras mayor fue el tiempo de imbibición de las semillas en agua se incrementó el porcentaje de explantes con callos; alcanzando al 100% en T₃.

Al mismo tiempo, en aquellos explantes donde no hubo una proliferación de callo en la zona de cicatrización, comenzaron a desarrollarse puntos de color verde,

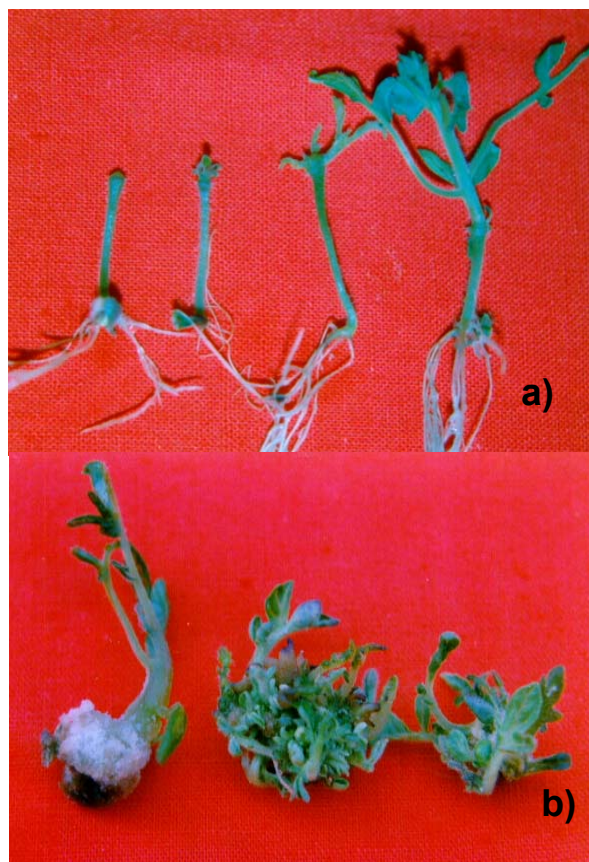


Figura 10. Regeneración en SC del cultivar Amalia cultivadas en MS sin reguladores del crecimiento. a) Regeneración directa a partir de SC, b) Regeneración en callos de SC subcultivados a MB frescos

que entre los 12 y 14 días de cultivo diferenciaron en yemas y brotes (Figura 10a). Entre todos los tiempos de imbibición probados en este experimento no hubo diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de regeneración; aunque fue notable el tratamiento T₂ donde el 100% de los explantes formó brotes con una eficiencia de 1.58 brotes por explante, en un medio sin reguladores del crecimiento sin diferencias significativas en la eficiencia de regeneración (Tabla 16).

Ezura *et al.*, (1993) reportaron un alto porcentaje de diferenciación de brotes (60%) cuando precultivaron semillas

de pimiento (c.v Shinsakigake-2) desde 5 horas hasta 5 días en condiciones semejantes. Estos autores recomendaron esta nueva metodología de cultivo para esta Solanacea, por ser más eficientes que otros protocolos ensayados con anterioridad (Arroya y Revilla, 1991).

Es importante detallar que un pequeño porcentaje de los explantes que elongaron emitieron un solo brote desde el centro de la superficie de corte de los hipocótilos, los que fueron despreciados de la colección de datos por considerarse un posible error de corte (epígrafe 3.1.4).

Tabla 16. Efecto de la imbibición de las semillas en la morfogénesis in vitro del tomate

Tratamientos	# Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (# Brotes/exp totales)	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Explantos con callo (%)
Control	1.75±0.07 b	1.44 b	69	25 b
T ₁	2±0.07 b	1.37 b	63	31 b
T ₂	1.58±0.06 b	1.58 ab	100	56 b
T ₃	2.57±0.06 a	1.72 ab	81	100 a
ESx±	**	0.09**	0.10 n.s	0.12***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

*** significativo para $p < 0.001$

Posteriormente, en algunos de los callos comenzaron a diferenciarse yemas y brotes con características semejantes a los obtenidos por regeneración directa, al igual que en los callos que se subcultivaron a medio fresco (Figura 10b). En algunos casos se subcultivó la parte apical del hipocótilo en que no se había apreciado regeneración o que las yemas no habían diferenciado aún, lográndose el inicio de la misma a la semana del subcultivo en medio MB fresco.

En este trabajo se evaluó el porcentaje de explantes con yema después del primer subcultivo, encontrándose que no había diferencias entre los tres

tratamientos ensayados en cuanto a esta variable se refiere (Tabla 17), solo en el tratamiento Control no ocurrió formación de yemas. De manera contraria a lo que resulta durante el primer cultivo, el mayor número de yemas por explantes se alcanzó en el tratamiento T₁ con 2.81 y fue disminuyendo a medida que aumentó el tiempo de imbibición (Tabla 17). Esta respuesta demuestra la influencia de la imbibición de las semillas en el tiempo de formación de las yemas que darán lugar a brotes.

Tabla 17. Formación de yemas en SC subcultivadas a medio fresco

Tratamientos	# Yemas/explantes totales	Frecuencia de explantes con Yemas (%)
Control	0±0.04 d	0 b
T ₁	2.81±0.04 a	100 a
T ₂	2.41±0.05 b	100 a
T ₃	1.94±0.04 c	100 a
ESx±	**	0.11***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

*** significativo para $p < 0.001$

En un análisis de los resultados obtenidos con esta nueva metodología, observamos que el tratamiento T₂ resultó ser el que aportó valores más altos de eficiencia y frecuencia de regeneración; ya que el 100% de los explantes tuvo regeneración en el primer cultivo y continuó el proceso de regeneración después del primer subcultivo, aumentando el número de yemas por explante de forma considerable, por lo que fue el tratamiento que se escogió para posteriores experimentos (Tabla 16 y 17).

Al activar los mecanismos de diferenciación de brotes y yemas adventicias en fases tan tempranas obteniendo los brotes o callos con yemas en menor tiempo, sin reguladores del crecimiento; se disminuyen entre otros los riesgos por infestación, además de la simpleza y poca manipulación de que es objeto los

explantes, la variabilidad genética inducida por las prolongadas condiciones de cultivo y el uso de reguladores del crecimiento lo que hace este protocolo de regeneración superior en muchos aspectos a los tradicionales para el cultivo en que se hacen los primeros subcultivos entre la tercera y cuarta semana, además de los riesgos de variabilidad genética y alta frecuencia de plantas anormales que le son inherentes.

4.3.1.1 Caracterización histológica de la regeneración

En la primera semana de cultivo se observaron cambios en la estructura de la zona de corte (figura 14a), las células del parénquima cortical (PC) que habían sufrido desprendimiento y ruptura por causa del corte mecánico habían formado un tejido de cicatrización con la emisión de súber que recubría la zona dañada. En la figura 14b, podemos observar como las células de la epidermis (CE) que se desprendieron a causa del corte continuaron su crecimiento.

A los 11 días de cultivados los explantes en la superficie de cicatrización (figura 14c), se detectó la proliferación de células meristemáticas (CM) caracterizadas por su pequeño tamaño y forma isodiamétrica, agrupadas en tres conjuntos bien diferenciados por la escasez de espacios intercelulares entre las células que los conforman; así como la presencia de incipientes brotes vegetativos (BV), los que al ser observados a un mayor aumento se destacaban por el gran desarrollo del primordio foliar (PF) (figura 14d).

Las fotomicrografías obtenidas a partir del estudio realizado en el MEB, permitieron esclarecer el origen de los regenerantes diferenciados a partir de SC; demostrando que estos son producto del estímulo causado por la ruptura mecánica de la dominancia apical que permitió la rediferenciación de este tejido y no por las condiciones de cultivo o posibles errores en el corte de los explantes.

Después de 14 días de cultivo se practicaron cortes a mano alzada en la superficie de corte de SC, detectándose la presencia de múltiples brotes (figura 14e), bien desarrollados (figura 14f).

Es necesario destacar, que los patrones de desarrollo encontrados en el proceso de regeneración de brotes a partir de SC tuvieron plena coincidencia con las

observaciones morfológicas realizadas en experimentos anteriores; así como con los estudios realizados por Ezura *et al.*, (1993), en este tipo de explante para *Capsicum annumm* L.

4.3.1.2 Análisis de la estabilidad genética de las vitroplántulas

4.3.1.2.1 Análisis bioquímico

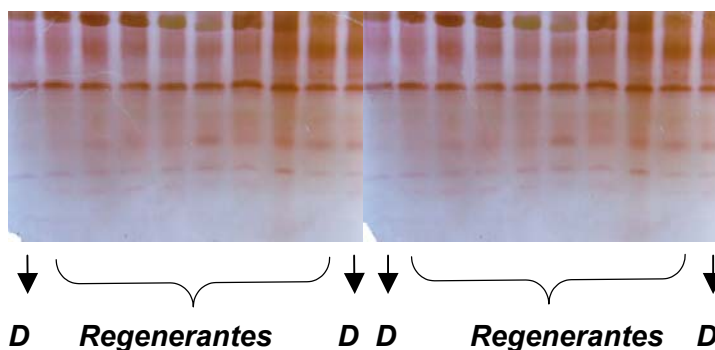
Los electroforetogramas isoenzimáticos obtenidos, después de revelados los geles con la tinción específica para cada sistema, se observan en las figuras 15, 16, 17, 18 y 19 para los sistemas AC, Mdh, Prx, Est y GOT.

Se reveló la presencia de actividad enzimática en el sistema AC (figura 15), la cual estuvo caracterizada por la presencia de 2 s gruesas, tanto en los regenerantes como en el donante. Aunque no se cuenta con evidencias de su caracterización en tomate, se sabe que esta es una de las más abundantes proteínas solubles y que en plantas C3, se encuentra fundamentalmente en los cloroplastos y su peso promedio está comprendido entre 140-250 kDa (Maleau y Coleman, 1991).

De igual modo, el material examinado, presentó similitud electroforética en el sistema Mdh (Figura 16), sistema que está incluido en los mapas genéticos del cultivo (Lan, Paterson y Wing, 1993; TGC, 1990, 1994) y que se caracteriza por la presencia de tres fracciones (0.106, 0.318, 0.376 y 0.435) bien delimitadas. En el tomate se conoce que este sistema puede ser tanto monomérico como dimérico, y que presenta 4 isoformas polimórficas, de las cuales solamente han sido mapeadas Mdh-1, Mdh-3 y Mdh-4, ubicadas en los cromosomas 3, 7 y 12, respectivamente (Chetelat y de Verna, 1993).

Valor Banda

Rf		No.
0.107	— —	9
0.214	— —	8
0.321	— —	7
0.357	— —	6



0.428	—	—	5
0.464	—	—	4
0.536	—	—	3
0.625	—	—	2
0.678	—	—	1
(+)	D	R	

Figura 15. Zimograma AC de los regenerantes (R) y del cultivar Amalia (D)

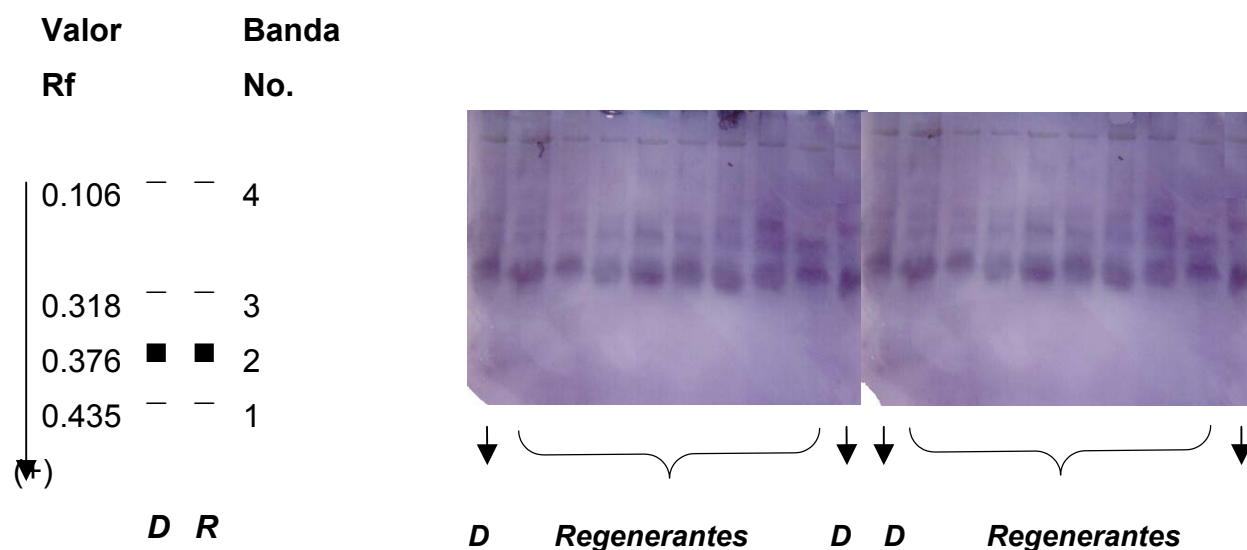
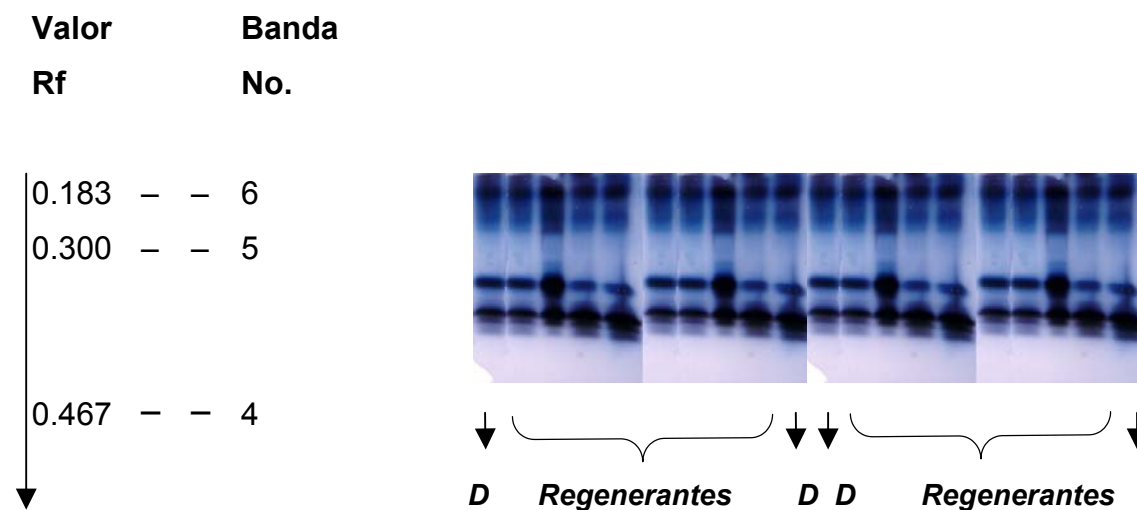


Figura 16. Zimograma Mdh de los regenerantes (R) y del cultivar Amalia(D)

En el diagrama electroforético de isoenzimas Prx (Figura 17), se constató la existencia de alta actividad enzimática en el material analizado, este sistema presentó un total de seis bandas bien definidas y características de la especie *Lycopersicon* (Florido, 1999).



0.550 – – 3
 0.583 – – 2
 0.630 – – 1

(+)

D R

Figura 17. Zimograma Prx de los regenerantes(R) y del cultivar Amalia (D)

Diversos estudios de mapeo del cultivo (TGC, 1990, 1994), han permitido conocer que el mismo presenta ocho isoformas Prx, que codifican para un complejo de bandas, siendo uno de los más usados en estudios bioquímicos, tanto en *Lycopersicon* como en otros géneros de plantas, por ser de los más polimórficos y por la estabilidad y reproducibilidad de sus bandas, además del importante papel que desempeñan las isoenzimas Prx en la diferenciación celular y su relación con la resistencia a factores adversos tanto bióticos como abióticos (González, 1989; Zheng y Cheng, 1993; González, 1993; Iglesias, 1995, y Alcazar *et al.*, 1995; Gracia, 1998).

Morales *et al.*, (1998), plantearon que uno de los sistemas más apropiados para la caracterización isoenzimática de somaclones de tomate fueron las Est, debido a su marcado polimorfismo. Cuando se analizó el perfil isoenzimático de ésta en las vitroplántulas en comparación con el cultivar Amalia no se observó polimorfismo alguno (Figura 18). Lo que confirma la no existencia de variaciones genéticas asociadas a este sistema por el procedimiento de regeneración empleado.

Con respecto a las enzimas Est, se debe señalar que están constituidas por un grupo complejo de proteínas asociadas con proteínas intracelulares específicas (Iglesias, 1986, González, 1989; Fernández, 1999, comunicación personal, TGC, 1994), que presentan un total de ocho sitios polimórficos en el cultivo (TGC, 1990, 1994)..

Valor	Banda
Rf	No.

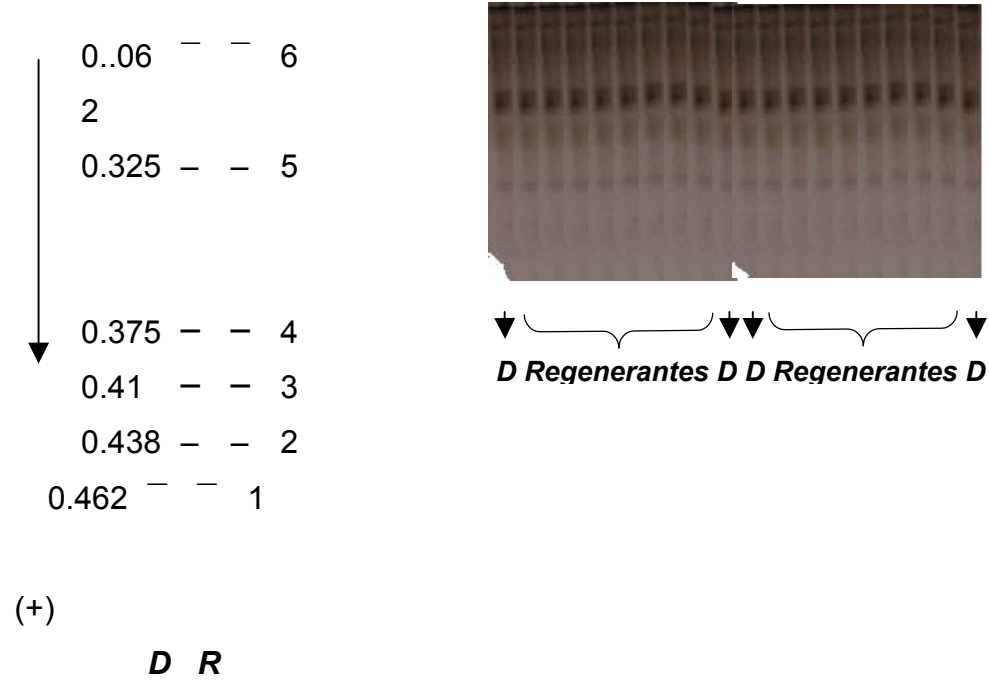


Figura 18. Zimograma Est de los regenerantes (R) y del cultivar Amalia (D)

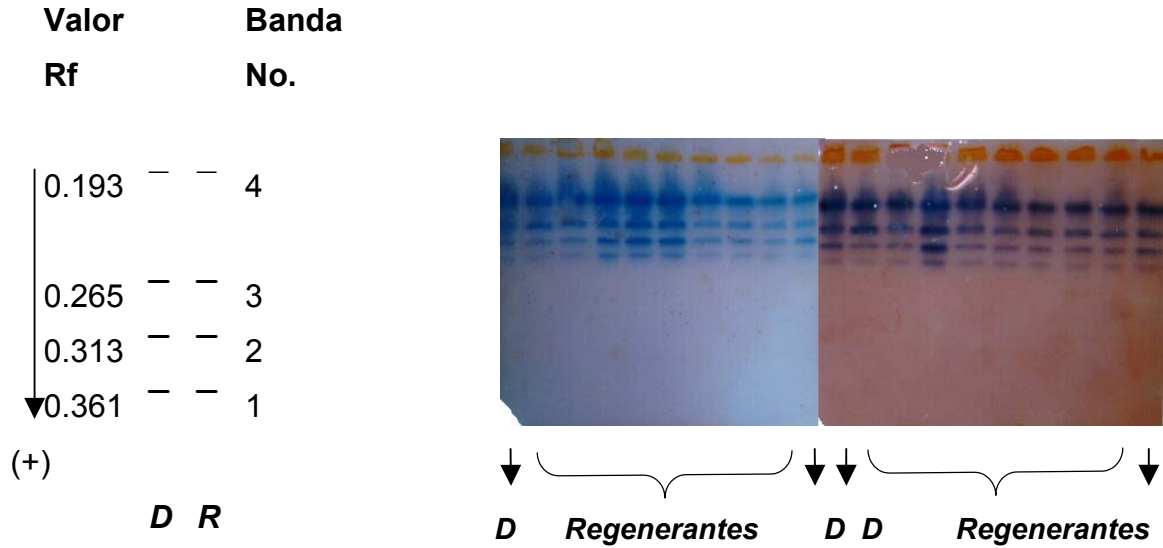


Figura 19. Zimograma Got de los regenerantes (R) y del cultivar Amalia (D)

Los resultados bioquímicos obtenidos del análisis enzimático analizado no reveló variaciones apreciables en el patrón electroforético del sistema Got (figura 18). Vondnishharova (1993), utilizó este sistema para detectar la variabilidad híbrida de

semillas de tomate; mientras que Santana (1993), encontró estabilidad en el proceso de embriogénesis somática del café.

4.3.1.2.2 Estudio citogenético de las vitroplántulas.

El conteo cromosómico (Figura 20), en células de las vitroplántulas y del cultivar Amalia reflejó igual número ($2n=24$); lo que corrobora los resultados obtenidos mediante los análisis isoenzimáticos realizados en el anterior epígrafe, no detectándose por ninguno de los estudios inducción de variabilidad genética debido a las condiciones de cultivo *in vitro*. Los regenerantes analizados

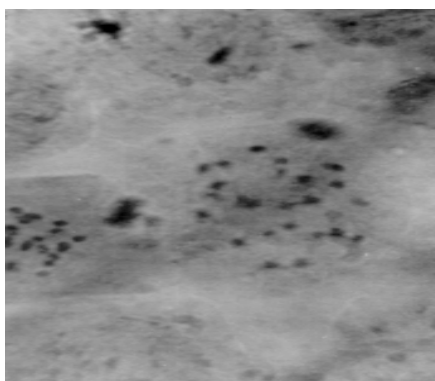


Figura 20. Cromosomas observados durante la mitosis $2n=24$, aumento

mantuvieron el cariotipo de la especie *Lycopersicon esculentum* (Morales 1997 y Xiquez, 1998) para células diploides.

En el análisis del cariotipo pudo observarse, tanto en el donante como en los regenerantes, dos cromosomas de mayor tamaño que el resto, lo que coincide con lo planteado por Khush y Rick (1968) citado por Xiquez (1997).

Evans y Sharp (1983), Maliza (1984) y Morales (1997); se refirieron a la variabilidad genética detectada en plantas de tomate regeneradas por cultivo de tejidos, detectándose células poliploides y diploides en el mismo genotipo, en cambio, no fue observado este fenómeno en ninguna de las vitroplántulas obtenidas de sC en ausencia de reguladores del crecimiento.

Ezura *et al.*, (1993), al practicar un conteo de cromosomas en células de la raíz de plántulas de pimienta, obtenidas por igual metodología que la empleada en este estudio no encontraron diferencias entre el número de cromosomas de las plantas del cultivar donante y el de las regeneradas, lo que fue confirmado para el tomate en el cultivar Amalia.

Existen muchos factores que inciden en el adecuado desarrollo de una metodología de regeneración *in vitro*; entre ellos se encuentra el genotipo de la especie de que se trate, el medio de cultivo, las hormonas utilizadas, la concentración de oxígeno en el medio y la metodología de trabajo, entre otros (Singh, 1993; Rosu y Petrescu, 1995). Cualquiera de estos factores pudiera haber

incidido en la manifestación o aparición de una mutación que afectara la división celular, provocando en la mitosis una distribución desigual de los cromosomas, bien por fallos en la formación del huso acromático o en su unión al centrómero, aparición de cromosomas retardados o de no-disyunción mitótica de las cromátidas hermanas (Xiquéz, 1998).

Se debe tener en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos con la nueva metodología de regeneración propuesta que al activar los mecanismos de diferenciación de brotes y yemas adventicias en fases tan tempranas y en ausencia de reguladores del crecimiento, se disminuyen los riesgos de variabilidad genética inducida por las condiciones de cultivo; entre otros muchos a los que se ven expuestos los explantes tomados en fases posteriores del desarrollo vegetativo.

4.3.1.3 Adaptación de vitroplántulas a condiciones ex vitro

Los brotes provenientes de SC que fueron subcultivados en medio basal (MB), (epígrafe 4.3), a los 7 días ya presentaban un sistema radical completamente desarrollado y habían emitido de 3 a 4 hojas verdaderas, como se aprecia en la figura 12. En la figura 13 (A y B), se muestra como en el momento del inicio de este experimento las vitroplántulas tenían aproximadamente 4 pares de hojas y una altura de 5 cm.

Al colocar las vitroplántulas en el sustrato recomendado a tal efecto (Lara, 1999) y bajo condiciones controladas (Casanova, 1999), estas mantuvieron un crecimiento acelerado con características individuales en cada tratamiento. Como se demuestra en la figura 13, a los 15 días de establecidas las plantas en condiciones *ex vitro* ya estaban totalmente adaptadas (Figura 12b); habían sido capaces, no solamente de sobrevivir sino de continuar su crecimiento. En este estadio las plántulas de los tratamientos T_1 y T_3 tenían un número de hojas y altura semejantes, a diferencia de las plántulas del tratamiento T_2 , que presentaban valores superiores.

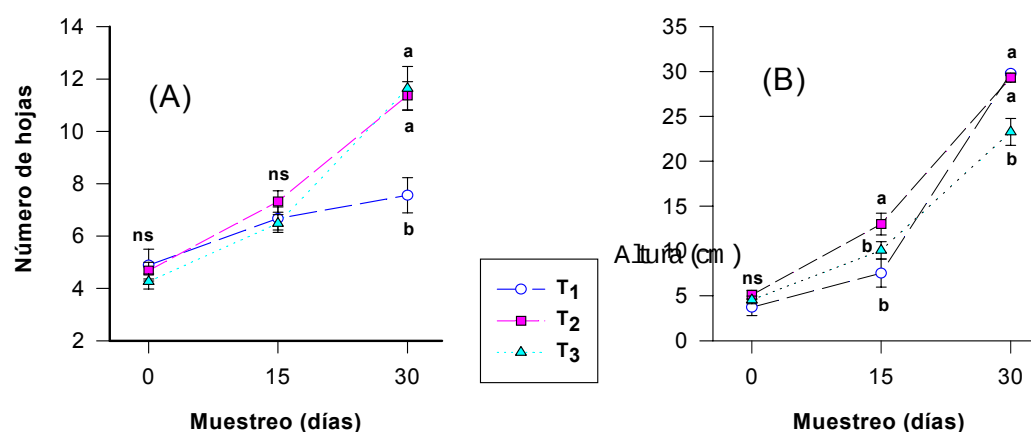


Figura 12. Caracterización del proceso de adaptación de las vitroplántulas de tomate. a) vitroplántulas enraizadas, b) vitroplántulas a los 15 días en condiciones ex vitro, c) vitroplántulas adaptadas a los 30 días de sembradas en condiciones ex vitro

El número de hojas emitidas es un parámetro importante del desarrollo biológico del cultivo, por ser la aparición de la cuarta hoja verdadera en el cultivo del tomate el marcador fenológico, que según Verde y Alvarez (1994), divide en dos subfases la etapa vegetativa, debiendo realizarse el transplante con posterioridad a la emisión de dicha hoja. Desde el inicio de la adaptación, la variable número de hojas mantuvo un crecimiento constante en los tres tratamientos estudiados; desde los 15 días las plántulas de T_2 y T_3 comenzaron a emitir un mayor número de hojas que T_1 , que terminó el período evaluativo con un promedio de 7 hojas/plántula (Figura 13 A).

La altura de las plantas en la fase de semillero es uno de los parámetros de crecimiento que tiene un valor determinante en su aptitud para el transplante (Lara, 1999). Al final del período evaluativo, 30 días, las plántulas de las variantes T_1 y T_2 no eran diferentes en cuanto a su altura (29 cm), difiriendo de aquellas del tratamiento T_3 que presentaban menor longitud (Figura 13 B).

Las evaluaciones mostradas (Figura 13), indican que antes de los 30 días las



Figuras 13 . Comportamiento del número de hojas (A) y la altura (B) de vitroplantas de tomate durante el período de adaptación.

vitroplántulas aclimatadas presentaban un tamaño acorde a lo establecido en el Instructivo Técnico del cultivo para semilleros (MINAGRI, 1983), donde se establece que una postura de calidad debe tener una altura entre los 15 y 18 cm. En un análisis general del comportamiento de las dos variables evaluadas, el tratamiento T_2 fue el que alcanzó mayores valores de crecimiento y actividad fisiológica (Figura 12 y 13). La tabla 21, denota que los tratamientos T_2 y T_3 alcanzaron los mayores porcentajes de supervivencia, aunque no hubo diferencias entre las vitroplántulas de los tres tratamientos en cuanto a este índice se refiere; indicando valores muy superiores a los obtenidos en este proceso en otros cultivos (González, 1998).

Tabla 21. Supervivencia de las vitroplántulas adaptadas.

Tratamientos	Supervivencia de las Vitroplantas (%)
T1	66.6±0.12
T2	86.4±7.83-02E
T3	88±7.34-02E
ESx±	n.s

4.3.1.4 Análisis económico.

Si se comparan los costos del nuevo protocolo de regeneración con los incurridos al utilizar segmentos apicales de hipocótilos como explantes cultivados en medios suplementados con BAP (Alvarez *et al.*, 1999b), comprobaremos la eficiencia de este (tabla 21).

Cuando se usan concentraciones de 2 mg.L⁻¹ de BAP para suplementar el medio de cultivo para segmentos apicales de hipocótilos (Alvarez *et al.*, 1999b), los gastos se elevaron cuantiosamente (tabla 21). Ello se debe, fundamentalmente, al consumo de medio de cultivo en la fase de germinación de las semillas para obtener la plantas asépticas de las que se extraerán los segmentos apicales de hipocótilos y el uso del BAP como regulador del crecimiento en el medio de cultivo en que se siembran los explantes.

Sin embargo, cuando se utilizan SC como explantes se disminuyen los gastos, ya que no se requiere medio basal inicial para la obtención del explante en el medio de cultivo no se emplean reguladores del crecimiento. Se estima un ahorro del 50.5%, al dejar de consumirse 438.3 usd por cada 100 L de medio utilizado. Cabe señalar, que con esta metodología el tiempo total de cultivo de los explantes se reduce a casi la mitad con el consiguiente ahorro en cuanto a insumos de laboratorio, mano de obra y energía eléctrica se refiere.

Con este análisis se comprueba que el nuevo protocolo de regeneración no sólo tiene ventajas en el aspecto biológico, sino también desde el punto de vista

económico al ser mucho más simple, en cuanto a manipulación y ahorro de reactivos.

Tabla 21. Gastos incurridos en la preparación de 100 L de medio de cultivo, para la regeneración in vitro de explantes de tomate.

Metodologías de cultivo	Germinación de semillas y cultivo de segmentos de hipocótilos.	Precultivo de semillas y siembra de SC
Suplementos del medio	BAP	Control
Gastos (usd)	868.3	430
Ahorro(usd)	0	438.3
% Ahorro Total	0	50.48

4.3.1.5 Aplicación a diferentes cultivares de tomate.

Cuando las semillas de diferentes cultivares fueron procesadas siguiendo igual metodología que con la variedad Amalia, se encontró un desarrollo morfogénico *in vitro* muy similar en la mayoría de los cultivares. En todos los cultivares hubo formación de callo, destacándose Campbell 28, seguido de Amalia y Lignon, ambos sin diferencias significativas, en cambio, en los cultivares Floradel y Rilia predominó la regeneración directa a partir de la zona de cicatrización. Como se puede observar en la tabla 18, en los cultivares Campbell 28, Amalia, Lignon y Floradel en más del 50% de los explantes hubo diferenciación de brotes con una eficiencia similar entre ellos y en menor grado en el cultivar Rilia.

Sin embargo, se observó heterogeneidad entre los brotes en cuanto a su morfología (Figura 11). Ello pudiera deberse, fundamentalmente, a las marcadas diferencias existentes entre los genotipos estudiados, lo cual influye en su crecimiento y desarrollo bajo determinadas condiciones de cultivo.

Tabla 18. Respuesta morfogénica in vitro a partir de SC de diferentes cultivares de tomate

Tratamientos	# Brotes/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (# Brotes/exp totales)	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Explantos con callo (%)
Campbell 28	1.45±0.06 b	1.31 ab	69 a	100 a
Amalia	1.5±0.06 b	1.27 ab	54 ab	62 ab
Lignon	1.55±0.06 b	1.38 a	69 a	62 ab
Rilia	1.57±0.12 b	1.09 b	15 b	0 c
Floradel	1.88±0.06 a	1.48 a	54 ab	46 b
ESx±	-	0.09**	0.01***	0.14***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

*** significativo para $p < 0.001$

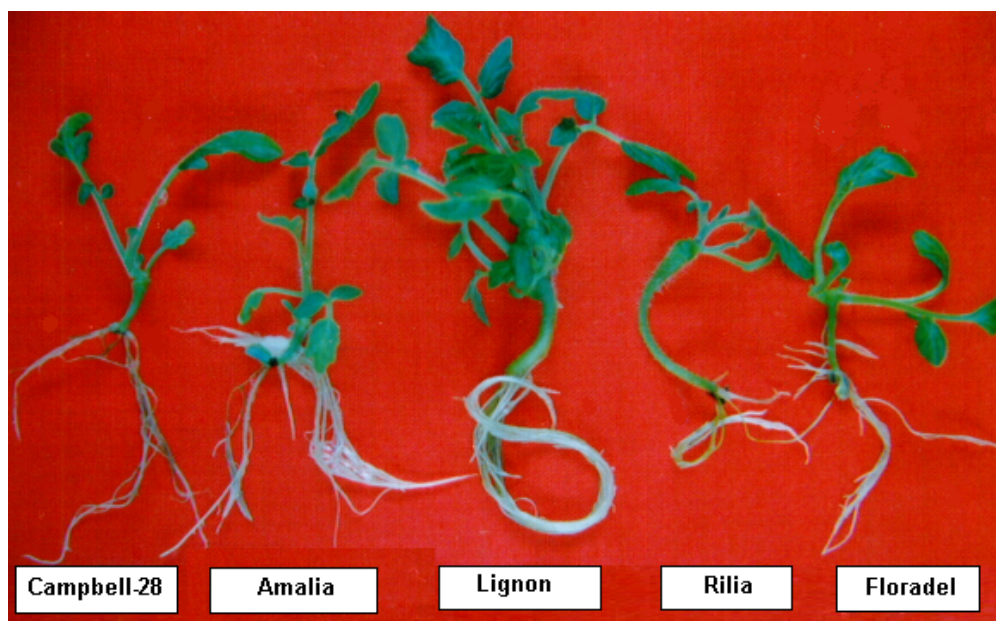


Figura 11. Regeneración in vitro a partir SC de diferentes cultivares de tomate.

Cuando se realiza un análisis general de los resultados obtenidos en este experimento se denota una mayor frecuencia y eficiencia de regeneración *in vitro* en los cultivares Campbell 28, Amalia y Lignon, si se compara con los valores resultantes para estas variedades en trabajos publicados por Demmel *et al.*, (1993); Branca *et al.*, (1994); Alvarez (1999a), donde se utilizaban como fuente de explantes hipocótilos, cotiledones y hojas.

Como se puede constatar, los explantes de Rilia tuvieron una inferior respuesta en comparación con el resto, tanto en función de callo como en regeneración de brotes, en cambio, la mayoría de los cultivares tuvo una respuesta morfogénica similar, lo que indica que la emisión de brotes en SC de tomate no es un caso particular del cultivar Amalia, sino que se puede hacer extensivo este protocolo de regeneración a otros genotipos de tomate.

4.3.2 Imbibición de las semillas en BAP, Ácido Giberelico, Pectimorf y Biobras-6 y cultivo de SC en ausencia de reguladores del crecimiento, cultivar Amalia.

Cuando se precultivaron las semillas por 48 horas en presencia de reguladores del crecimiento, la formación de callo se inició en igual tiempo que cuando se imbiben en agua, sin embargo, hubo diferente respuesta morfogénica por la acción de cada uno de estos. Las variantes donde se adicionó BAP, AG₂, Pectimorf y BB6₃ fueron las más destacadas en cuanto a la formación de callo, con más del 50% de sus explantes con callos (Tabla 19), de coloración verde clara, duros y actividad morfogénica.

La regeneración de órganos ocurrió de forma directa partiendo de la zona de corte, o de forma indirecta diferenciándose yemas y brotes desde los callos. Como se describe en la tabla 19, con excepción del BB6₂ en más del 50% de los explantes de todos los tratamientos se formaron brotes, sin que hubiera diferencias estadísticas entre las variantes estudiadas.

Cuando las semillas fueron imbibidas en Pectimorf (10 mg.L⁻¹) y BB6₁ el número de brotes por explante fue de 1.6; pero esta respuesta no varió significativamente de la obtenida cuando se usaron H₂O, BAP o AG. Aunque es necesario destacar

que cuando se utilizó la concentración de 1 mg.L^{-1} de AG el 100% de los explantes resultaron de apariencia anormal (Tabla 19).

Tabla 19. Efecto de la imbibición de las semillas del cultivar Amalia en reguladores del crecimiento

Tratamientos	# Brotos/exp regenerado	Eficiencia de regeneración (# Brotos/exp totales)	Frecuencia de explantes regenerados (%)	%Brotos anormales	Explantes con callo (%)
H ₂ O (Control)	1.58±0.06	1.58 a	100a	0 b	56 a
B	1.58±0.06	1.46 ab	78 b	0 b	93 a
AG₁	1.6±0.07	1.43 ab	71 b	100 a	0 b
AG₂	1.7±0.07	1.46 ab	64 b	0 b	86 a
P ₃	2.13±0.06	1.6 a	78 b	0 b	57 a
BB6₁	2.35±0.06	1.61 a	78 b	0 b	78 a
BB6 ₂	1.67±0.12	1.13 c	21 c	0 b	14 b
BB6₃	1.38±0.08	1.3 bc	57 b	0 b	0 b
ESx±	n.s	0.09**	0.12**	9.35- 02E***	0.13***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

*** significativo para $p < 0.001$

En las variantes donde las semillas fueron imbibidas en H₂O, BAP, Pectimorf y BB6₁ se registraron los mayores valores en las variables evaluadas (Tabla 19). Resulta muy interesante desde el punto de vista de la eficiencia de un protocolo de regeneración la superioridad en cuanto a la frecuencia de regeneración se refiere del control; el hecho de que no existieran marcadas diferencias al proceso que se

induce por cualquiera de estos tres reguladores o agua, conlleva a resolver una de las principales problemáticas de la regeneración *in vitro* de este cultivo, que es obtener regenerantes normales sin reguladores del crecimiento en la solución de imbibición de las semillas (Cano *et al.*, 1998; Pratta *et al.*, 1997).

4.3.3 Imbibición de semillas en agua y cultivo de Scv en medios suplementados con Pectimorf, Biobras-6, BAP y Zeatina

El cultivo de las SC imbibidas previamente en agua sobre medio basal (MB), suplementado con diferentes reguladores del crecimiento no cambió sustancialmente el proceso morfogénico observado en ausencia de reguladores del crecimiento, en cuanto a etapas y duración se refiere. Los valores presentados en la tabla 20, resultan de interés, pues se muestra que el tratamiento control con un 60% de explantes con callo no difirió estadísticamente del tratamiento con zeatina y Pectimorf, no teniendo lugar la formación de callo en presencia de BAP y BB6 a las concentraciones de 2 y 10^{-4} mg.L⁻¹, respectivamente.

Tabla 20. Efecto de diferentes combinaciones hormonales en el cultivo de SC del cultivar Amalia

Tratamientos	# Brotes/explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (# Brotes/explantes totales)	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Frecuencia de brotes anormales (%)	Explantes con callo (%)
MB (Control)	1.72±0.08 b	1.43	60	0 c	60 ab
P	1.68±0.07 b	1.54	80	20 bc	30 bc
BB6	1.72±0.08 b	1.43	60	10 bc	0 c

BAP	1.62±0.12 b	1.19	30	50 b	0 c
Z	2.03±0.08 a	1.62	50	100 a	100 a
ESx±	*	0.13 n.s	0.16 n.s	0.15***	0.15***

Medias con letras semejantes son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ($p < 0.05$)

** significativo para $p < 0.01$

*** significativo para $p < 0.001$

La diferenciación de los brotes fue igual o mayor del 50% en los tratamientos donde se suplementó el medio con Pectimorf (10 mg.L^{-1}), BB6 ($10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$), Zeatina (2 mg.L^{-1}) y en el control (Tabla 20), los tratamientos con Pectimorf y BB6 se caracterizaron por una mayor ocurrencia de regeneración directa. De acuerdo al criterio de numerosos investigadores, cuando la morfogénesis ocurre por vía directa no se presentan muchas mutaciones espontáneas, mientras que la regeneración de plantas partiendo de callo puede incluir una gran variación genética por cambios estructurales o numéricos al nivel de cromosomas (Stafford, 1991; Morales, 1997; Pratta *et al.*, 1997).

A pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la eficiencia de regeneración, la variante más destacada fue la Z con 2.03 brotes regenerados por explante, con el inconveniente de que el 100% de los brotes tenían apariencia anormal (Tabla 20). Sería importante comentar que en el medio donde se adicionó la dosis de 2 mg.L^{-1} de BAP, el 50% de los brotes regenerados presentaban anormalidades; mientras que cuando se utilizó el Pectimorf y el Biobras-6 este fenómeno fue mínimo, el 20 y 10%, respectivamente. Si comparamos este indicador en los diferentes tratamientos con el control, podemos afirmar que los reguladores del crecimiento comerciales tiendan a incrementar la frecuencia de plántulas con anormalidades. En la bibliografía, diferentes autores (Arce-Montoya, 1994 y Morales, 1998), han indicado que el uso de reguladores del crecimiento, como el 2.4D, ANA y algunas citoquininas sintéticas, producen un fuerte incremento de mutaciones en las células cultivadas.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

1. El uso del Pectimorf a concentraciones de 10 mg.L^{-1} favoreció la regeneración *in vitro* en segmentos apicales de hipocótilos del cultivar Amalia, superando a la formación de callos, frecuencia y eficiencia de regeneración obtenida con el uso del BAP como suplemento al medio basal MS recomendado para este cultivar.
2. En las hojas cotiledonares del cultivar Amalia se lograron los mejores resultados en cuanto a regeneración directa con el uso del BAP a concentraciones de 0.5 y 1 mg.L^{-1} , mientras que con la combinación de Biobras-6 ($10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$) y BAP (0.25 mg.L^{-1}) se obtuvieron brotes a partir de callos de crecimiento abundante.
3. El uso combinado del Pectimorf (10 mg.L^{-1}) y el Biobras-6 (10^{-3} , 10^{-2} , $10^{-1} \text{ mg.L}^{-1}$) con BAP (0.25 , 0.5 y 1 mg.L^{-1}) no favoreció el incremento de la frecuencia y la eficiencia de regeneración en segmentos apicales de hipocótilos y hojas cotiledonares.
4. La imbibición de las semillas de tomate durante 48 horas en agua antes de ser cortadas y cultivadas en medio basal en ausencia de reguladores del crecimiento aportó los mejores resultados en cuanto a eficiencia y frecuencia de regeneración se refiere, no observándose un efecto adicional cuando se imbibieron las semillas en soluciones BAP (2 mg.L^{-1}), Ácido Giberélico (1 , 2 mg.L^{-1}); Pectimorf (10 mg.L^{-1}) y Biobras-6 (10^{-4} , 10^{-3} , $10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$) o se sembraron las SC en medio basal suplementado con BAP (2 mg.L^{-1}), Pectimorf (10 mg.L^{-1}), Biobras-6 ($10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$) y Zeatina (2 mg.L^{-1}).
5. El protocolo de regeneración a partir de semillas cortadas en ausencia de reguladores del crecimiento se aplicó a los cultivares de tomate Amalia, Campbell 28, Lignon, Rilia y Floradel presentando una respuesta

cuantitativamente similar, lo que demostró la efectividad de esta metodología para diferentes genotipos de la especie.

6. El estudio histológico permitió constatar la formación inicial de los brotes adventicios en la superficie de corte de las semillas cortadas del cultivar de tomate Amalia a los 14 días.
7. El análisis morfológico, bioquímico y citogenético de los regenerantes obtenidos a partir de SC y las plántulas del cultivar Amalia no detectaron variaciones de origen genético.
8. El proceso de pre-adaptación *in vitro* y las condiciones *ex vitro* contribuyeron favorablemente a la adaptación de las vitroplántulas, obteniéndose una alta sobrevivencia y una rápida adaptación (15 días).
9. El uso de las SC como explantes cultivados en ausencia de reguladores del crecimiento implicó un ahorro del 50.48% de los gastos incurridos en comparación con la metodología de regeneración *in vitro* recomendada para el cultivar Amalia; así como una mayor simplificación del proceso, rápida obtención de regenerantes normales y aplicabilidad a otros cultivares.

6. RECOMENDACIONES

Tomando en consideración los resultados alcanzados en el presente trabajo se recomienda:

1. Utilizar el Pectimorf a concentraciones de 10 mg. L^{-1} como activador de los procesos morfogénéticos *in vitro* en segmentos apicales de hipocótilos, en sustitución del BAP para el cultivar Amalia.
2. Continuar los estudios de la actividad biológica del Biobras-6 a concentraciones menores de $10^{-4} \text{ mg. L}^{-1}$ en segmentos apicales de hipocótilos y SC de tomate.
3. Utilizar el BAP a concentraciones de 0.5 y 1 mg. L^{-1} como activador de los procesos morfogénéticos *in vitro* en hojas cotiledonares del cultivar Amalia.
4. Aplicar el nuevo protocolo de regeneración, a partir de SC en ausencia de reguladores del crecimiento, en los procesos de manipulación genética de plantas de tomate.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abelson, H. and Hines, P. (1999). The Plant revolution. **Science** 285:367-368.
- Agramonte, D. /et al/. (1996). Empleo de sustancias bioestimuladoras (Biobras-6 y Biobras-16) en la fase de adaptación de vitroplantulas de papa (*Solanum tuberosum* L.). En Resúmenes: X Seminario Científico INCA, La Habana.
- Aldington, S and Fry, C.(1993). Oligosaccharins. **Adv. Bot. Res** 19:1-10.
- Aldington, S., McDougall, G. J., y Fry, S. (1991). Structure activity relationships of biologically active oligosaccharides. **Plant, Cell and Environment**. 14:625-636.
- Alonso, E. (1990). Síntesis de análogos espirostánicos de brasinoesteroides. (Tesis de Dr. Ciencias Químicas). UH, La Habana.
- Alvarez, M. /et al/. (1994). Establecimiento de métodos de screening de variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por su tolerancia a altas temperaturas. En: XII Forum de Ciencia y Técnica. ISCAH.
- Alvarez, M. /et al/. (1999a). Obtención de nuevos genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) por métodos biotecnológicos y nucleares con tolerancia a estrés abiótico y biótico. Proyecto CITMA. (Cod 300073).
- Alvarez, M. /et al/. (1999b). Radiosensibilidad a rayos gamma ^{60}Co en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) variedad Amalia. **Cultivos Tropicales** 20(4):35-39.
- Alvarez, M; Armas de, G; Martínez, B. (1997). Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. **Cultivos Tropicales** 18(1): 82.
- Alvarez-Morales A. (1995). Implementation of biosafety regulation in developing country the case of Mexico. **African Crop Science Journal** 3:309-314.
- Arce-Johnson P. /et al/. (1999). Floral dip: un método fácil de transformación de *Arabidopsis Thaliana*. En: Métodos en Biología Molecular Vegetal. First International INIA-CARRILLANCA Workshop and Course on Plant Biotechnology. 66-71p.
- Arce-Montoya, M. (1994). Causas de la variación genética en el cultivo de tejidos vegetales. **Biotecnología**. 4:3-6.

- Arrencibia, A. /et al/. (1998). Field performance and genome analysis of insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.) plants. En: Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de La Habana. Junio 1-5. 231 pp.
- Arrencibia, A. (1997). Transformación genética de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.): Producción de plantas resistentes al ataque del borer (*Diatraea sacharalis* Fab.). (Tesis de Dr. Ciencias Agrícolas). INCA, La Habana.
- Arrieta, J.G. (1996) Transgenic potato expressing two antifungal proteins. **Biotec. Aplicada** 13:121.
- Arroya, R and Revilla, M. (1991). In vitro plant regeneration cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant cell Rep** 10:414-416.
- Arzatefernandez, A.M. /et al/. (1997). Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. Anther culture. **Plant Sci.** 123(1-2): 179-187.
- AVRDC (1994). Identification of Genetic markers linked to heat tolerance in tomato by RAPDs. **AVRDC Progress Report**. 206-209.
- AVRDC (1997). Characterization of tomato CLN 1639 F₇ recombinant inbred lines to verify heat tolerance for the identification of molecular markers linked to heat tolerance. **AVRDC Report**. 68-69p.
- Backs-Husemann, D; Reinert. (1970). Embryobildung durch isoiliante ein zellzellen ays gewebe kulturen von *Daucus carota*. **Protoplasma** 70:40-60.
- Bachem, C. /et al/. (1996). Visualization of differential gene expretion using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant J.** 9:745-753.
- Barker, H and Harrison, B. D. (1984). Expression of genes for resistance to potato virus Y, potato plants and protoplast. **Ann. Appl. Biol** 105:531-545.
- Benitez, D. (1998). Actividad biológica del Pectimorf sobre el desarrollo de callos de *Saccharum officinarum* L. de la variedad C-8751. (Tesis de Diploma). UH, La Habana.
- Betchold N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993). In plant *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Life Sciences** 316:1194-1199.

- Bliss, F.(1993). Biotechnology and Plant breeding. **Acta Hortic** 336:23-31 in. **Ag. Biotech** 6(5):317.
- Bonnema, A; O'Connell, M. (1992). Molecular analysis of the nuclear organellar genotype of somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon chilense*. **Plant Cell Report** 10(12):629-632.
- Branca. C. /et al/. (1994). Early phases in *in vitro* culture of tomato cotyledons starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma** 182:59-64.
- Bretó, M.P.; Asíns, M.J.; Carbonell, E.A. (1994). Salt tolerance in *Lycopersicon* species. III. Detection of quantitative trait loci by means of molecular markers. **Theor.Appl.Genet** 88: 395-401.
- Brunetti, A /et al/. (1997). High expression of truncated viral rep protein confers resistance to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 10:571-579.
- Buiatti, M; Bogani, P. (1998). Marcadores moleculares en la variación somaclonal de plantas hortícolas. En: Aplicación de la biotecnología a la mejora de hortícolas. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 9-29p.
- Cabrera, J. C. (1999a). Obtención de una mezcla de (1-4) α -D oligogalacturonidos bioactivos a partir de un grupo de subproductos de la industria cítrica. (Tesis de Dr. Ciencias Químicas). UH. La Habana.
- Cabrera, J.C. (1999b). Nuevo biorregulador cubano de origen péptico para la micropropagación y la morfogénesis. Resúmenes de evento BIOVEG'99. Abril 19-23. Ciego de Avila. Cuba.
- Cabrera-Ponce, J.L., Vegas-García, A y Herrera-Estrella, L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. **Plant Cell Rep.** 15:1-7.
- Campos, H. /et al/. (1999). Análisis RAPD de ADN genómico en plantas. En: Métodos en Biología Molecular Vegetal. First International -CARRILLANCA Workshop and Course on Plant Biotechnology. 33-35p.
- Campos, H. (1995a). Marcadores moleculares, conceptos. **AgroSur** 23(1):68-75.

- Campos, H. (1995b). Marcadores moleculares: aplicaciones al mejoramiento genético de las plantas. **AgroSur** 23(2):173-185.
- Cano, A. E. /et al/. (1998). Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 53:19-26.
- Casanova, A. (1999). Guía técnica para la producción de plántulas de hortalizas en cepellones. La Habana: MINAGRI: IIHLD. 7p
- Cevallos, A.M. (1998). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp). Determinación de marcadores morfo-histológicos y bioquímicos. (Tesis de Maestría). UH, La Habana.
- Cevallos, A.M. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del cafeto (*Coffea* spp.), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares (Tesis de Dr. Ciencias Agrícolas). INCA, La Habana.
- Cisneros, A. /et al/. (1998). Mutagénesis en Piña con el uso de las radiaciones gamma de ^{60}Co . En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO'98, La Habana.
- Clouse, S.D. (1996). Plant hormones: Brassinoosteroids in the spotlight. **Current Biol.** 5(6): 658-661.
- Compton, M and Veilleux, R. (1991). Variation for genetic recombination among tomato plants regenerated from three tissue culture systems. **Genome** 34(5):810-817.
- Cornide, M. T; León, O. (1998). Principales aplicaciones de los marcadores moleculares en la genética y selección de las plantas. C. Habana. 84p.
- Cuartero, J; Sánchez, A. (1998). La investigación en biotecnología desde el punto de vista de la mejora de especies hortícolas. En: Aplicación de la biotecnología a la mejora de plantas hortícolas. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 47-59p
- Cuba, M. (1997). Aspectos generales sobre la transformación genética de plantas. **Cultivos Tropicales** 19(1):36-46.

- Cuba, M. (1998). Enzimas de restricción y la biobalística en la transformación genética del tabaco (*Nicotiana tabacum*). (Tesis de Maestría). UH, La Habana.
- Chagué, V. /et al/. (1996). Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-5 in tomato by bulked segregant analysis. **Theor. Appl. Genet.** 92: 1045-1051.
- Chamberlain, J.R; Huges, C.E; Galwey, N.W.(1996). Patterns of isozyme variation in the *Leucaena shannonii alliane*). **Silvae Genetica** 45(1):1-7.
- Chetelat, R.T and de Verna, J.W. (1993). Map location of malate dehydrogenase-1 (Mdh-1), a new isozyme marker for 3L. **TGC Report.** 43: 13.
- Christou, P. (1995). Strategies for variety independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particles bombardment. **Euphytica** 85:13-27.
- Da Costa, S. (1998). Efecto de la actividad de un oligopeptato en el proceso de callogénesis *in vitro* de *Coffea canephora* var. Robusta. (Tesis de Diploma) UNAH, La Habana.
- Dandekar, A. (1992). Transformation. En: Biotechnology of perennial fruit crops.- Cambridge: University Press Ed. 141-168p.
- De Jong , A. /et al/. (1993) Rhizobium oligosacharides rescue a carrot somatic embryo mutant. **Plan Cell** 5:615-620.
- Demmel, M; Moriconi, D; Mentaberry, A. (1993). Regeneración directa de seis variedades argentinas de tomate. En: Resúmenes I Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal. REDBIO-Argentina.
- Diosdado, E. (1997). Efecto de biorreguladores en el proceso de embriogénesis somática y cultivo y fusión de protoplastos en el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). (Tesis de Dr. Ciencias Biológicas). UH, La Habana.
- Duncan, D. (1951). A significance test for differences between ranked treatment in analysis of variance. **Virginia J. Sci** 2: 171-189.
- El Farash, E. / et al/. (1993). Genotype explants age and explant type as affecting callus and shoot regeneration in tomato. **Assiut Journal of Agricultural Sciences** 24(3):3-14.

- El-Enany, A. (1997). Shoot regeneration and protein síntesis in tomato tissue cultures. **Biología Plantarum** 39(2), 303-308p.
- Encina C. /et al/. (1998). Aplicaciones del cultivo de tejidos a la mejora de especies hortícolas. En: Aplicación de la biotecnología a la mejora de hortícolas. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.29-37p.
- Ezura, H; Nishimiya, S; Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plant independent of exogeneous growth regulators in bell peper (*Capsicum annumm* L.). **Plant Cell Reports** 12:676-680.
- Fernández, R.(1999). Selección asistida por marcadores genéticos: estrategias actuales en la mejora de las plantas. (Conferencia). INCA , 15-16 enero. La Habana.
- Florido, M. (1999). Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate para su tolerancia al calor. (Tesis de Maestría). UH, La Habana.
- Foolad, M.R.; Jones, R.A.; Rodríguez, R.F. (1993). RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic map. **Plant Cell Rep.**12: 293-297.
- Fry, S. C. (1990). Roles of the primary cell wall in morphogenesis. En: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Dordrecht. 504-513p.
- Fuentes, A. D. /et al/. (1998). Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. **Biot. Aplicada** 15:242-245.
- Ganal, M.W. /et al/. (1995). Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (Hero) against *Globodera rostochiensis* in tomato. **Mol. Plant Microbe Interact.** 8(6): 886-891.
- Garbey, P. /et al/. (1998). Efecto del Pectimorf sobre callos de *Sacharum officinarum* L. En: Programa y Resúmenes XI Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. 17-20 nov, La Habana.
- García, A. (1998). Variaciones bioquímicas en callos de arroz sometidos a estrés hídrico. En: Programa y Resúmenes XI Seminario Científico INCA. Taller de ABIOTIC'98. nov 17-20, La Habana.

- García, A. (2000). Simulación del estrés hídrico con PEG-6000 y determinación de indicadores para la selección de genotipos de arroz con tolerancia estas condiciones. (Tesis de Maestría). UH, La Habana.
- García, D. B. (1998). Actividad biológica de análogos de brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en cafeto (*Coffea canephora* Pierra). (Tesis de Maestría). UH, La Habana.
- Gepts, P. (1994). Análisis molecular del proceso de domesticación en plantas: El ejemplo del frijol (*Phaseolus vulgaris*). En: 11 Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética, Monterrey, Nueva León, México, p 4-28.
- Gidekel, M; Barrientos L. (1999). Biotecnología de plantas, nuevos desafíos para el próximo milenio. En: Métodos en Biología Molecular Vegetal. First International INIA-CARRILLANCA Workshop and Course on Plant Biotechnology. 1-6p.
- Gill, R. /et al/. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Journal of Plant Physiology** 147:2, 273-276p.
- Gómez, R. (1998). Propagación vegetativa de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. IBP. 13-22p
- Gómez, R. /et al/. (1996). Empleo de sustancias biorreguladoras (Biobras-6) en la conversión y adaptación de plantas de frutabomba (*Carica papaya* L.) var Maradol Roja obtenidas a partir de embriones somáticos. En Resúmenes IV Coloquio Internac. Biotecnología de Plantas, Santa Clara.
- Gonzáles, R. L. (1994). Propiedad intelectual y bioseguridad , condicionantes o prerequisites para el acceso a la biotecnología?. **Bitechnology** 12, February. 27p.
- González , J. (1998).Sustratos más empleados en la aclimatización de plántulas en *in vitro* e *in vivo*. Conferencia.- Ciego de Avila: Centro de Bioplasmas. 4p.
- González, C. (1989). Comportamiento genético bioquímico de la lima persa SRA-58 (*Citrus latifolia* Tan). Sobre diferentes patrones en Cuba. (Tesis de Dr. Ciencias Biológicas). UH. Cuba.

- González, M. A; Merrys, A; Nuñez, M. (1994). Utilización del brasinoesteroide como posible sustituto de citoquininas *in vitro* . En: Resúmenes IX Seminario Científico del INCA. La Habana.
- González, M.C. (1993). Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo del arroz. (Tesis de Dr. Ciencias Agrícolas). INCA., La Habana.
- González, S. (1999). Actividad biológica del Pectimorf en el cultivo *in vitro* de callos y ápices de tabaco. En: Resúmenes: II Taller de productos bioactivos y III de Brasinoesteroides. INCA, 28 de octubre. La Habana.
- González, S. /et al/. (1998). Actividad biológica de diferentes brasinoesteroides en *Rhaphanus sativus* L. y *Saccharum officinarum* L. Programa y Resúmenes XI Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. 17-20 nov, La Habana.
- Gutérrez, A; Gidekel, M and Mujica, L. (1999). Estudio de la expresión diferencial. En: Métodos en Biología Molecular Vegetal. First International INIA-CARRILLANCA Workshop and Course on Plant Biotechnology. 7-26p.
- Habu, Y. /et al/. (1997). Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. Biochemical and Biophysical Research Communications. 234: 516-521.
- Harada, S. /et al/. (1995). Genetic analysis of the trait of sucrose accumulator in tomato fruit using molecular marker. **Breed. Sci.** 45: 429-434.
- Hernández, M. M. (1994). Empleo de brassinoesteroides para la diferenciación de callos de papa (*Solanum tuberosum* L.). Resúmenes IX Seminario Científico INCA, La Habana.
- Herrera-Estrella, L. (1999a). Plant genetic transformation: technology and applications. En: Métodos en Biología Molecular Vegetal. First International INIA-CARRILLANCA Workshop and Course on Plant Biotechnology. 58-65p.
- Herrera-Estrella, L. (1999b). Agricultura para tierras marginales: plantas transgénicas hacia el tercer milenio. En: Resúmenes Plant Biotechnology Towards The Third Millennium. CIGB, Dic 6-10. La Habana.

- Hidrobo, J .R. (1996). Caracterización del proceso de callogénesis y embriogénesis somática en papa (*Solanum tuberosum*). (Tesis de Diploma). ISCAH, La Habana.
- Hinchee, M. A. /et al/.(1988). Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated ADN transfer. **Biotech** 6:915-920.
- Hossain, M; Imarishi, S; Egashina, H. (1995). An improvement of tomato protoplast culture for rapid plant regeneration. **Plant Cell and Tissue Organ Culture** 42:141-146.
- Iglesias, L. (1986). Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). (Tesis de Dr. Ciencias Agrícolas). INCA, La Habana.
- Iglesias, L. (1994). Utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el mejoramiento genético de la papa. **Cultivos Tropicales** 15(2):108-121.
- Iglesias, R. /et al/. (1998). Obtención y purificación de oligogalacturónidos bioactivos a partir de la pectina cítrica, su aplicación en la sustitución de hormonas vegetales utilizadas en la micropropagación *in vitro* de diferentes especies de plantas. Proyecto de Investigación y Desarrollo MES. (Cod: 00300078).
- IIHLD (1997). Memorias 25 aniversario. Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova. La Habana. Cuba.**
- Khripach, V. A; Zhabinskii, V.N; De Groot, A.E. (1999). Brassinosteroids: a new class of plant hormones. En: Physiological mode of action of brassinosteroids. Academic Press Ed. 219-235p.
- Kibanadal, N; Miyazaki, N. (1998). Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. Peruvianum* complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. **Plant Cell Rep** 17(6-7):508-514p.
- Kitto, S. L. (1997). Comercial micropropagation . **HortScience** 32(6).
- Kobayashí, R; Stommel, J; Sinden, S. (1996). Somatic hybridation between *Solanum ochroanthum* and *Lycopersicon esculentum*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 45(1):73:78.

- Komamine, A. /et al/. (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures. Physiology, biochemistry and molecular biology. En: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Acad Publishers Ed, The Netherlands. 307-313p.
- Kozel, M. G. /et al/. (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringensis*. **Biotech.**11:194-200.
- Labrada, M. (1999). Selección *in vitro* en condiciones salinas de arroz (*Oryza sativa* L.) obtenidas a través del uso combinado de técnicas biotecnológicas y nucleares. (Tesis de Maestría).IBP, Santa Clara.
- Labrada, M; Millán, A y De la Cruz, G. (1994). Influencia de los brasinoesteroides en la tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.). Resúmenes IX Seminario Científico INCA, La Habana.
- Lacadena, J. (1996). Citogenética. Complutense s.a, Ed. 931p.
- Lara, D. O. (1999). Evaluación de sustratos y biofertilizantes para el cultivo para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) utilizando la tecnología de cepellones. (Tesis de Maestría). INCA, La Habana.
- Lech, M; Miczynski, K; Pindel, A. (1996). Comparison of regeneration potentials in tissue cultures of primitive and cultivated tomato species (*Lycopersicon* sp). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 65(1/2)53-56.
- Lefrançois, C; Chupeau, Y; Bourgin, J. P. (1993). Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon*. **Theor Appl Genet** 86(5): 533-546.
- León, O. (1998). Marcadores moleculares: principales tipos, fases moleculares, ventajas y limitaciones. En: Usos de los marcadores moleculares en la genética y selección de las plantas. C. Habana. 1-18p.
- Li, J. /et al/. (1996) A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. **Science** 272:398-401.
- Liang, P; Averbouk, A; Pardee, A. (1993). Distribution and cloning of cDNAs by means of differential display: refinements and optimizations. **Nucleic Acids Research** 21:3269-3275.

- Lorz, H and Scowcroft, W. R. S. (1983). Variability among plants and their progeny regenerated from protoplast of *Nicotiana tabacum*. **Theor Appl Genet** 66:67-75.
- Lukse, E; Dinkova, T. D y Ramos, M. (1997). Aspectos bioquímicos-moleculares de la embriogénesis somática en plantas. **Ciencias Biológicas** 27(1-2-3):13-17.
- Lu-Rui Ju; Huang-Jianhua; Sun Yuefang. (1997). Callus formation and plantlet regeneration from cotyledon and hypocotyl of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Acta Horticultural-Shanghai** 13(2):16-18.
- Lyndon, R.F. (1990). Plant development. The cellular basis. Unwin Hyman, London.
- Maliepaard, C. /et al/.(1995). Mapping of QTLs for glandular trichome densities and *Trialeurodes vaporariorum* (greenhouse whitefly) resistance in an F2 from *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* f. glabratum. **Heredity** 75: 425-433.
- Mantarroyos, A.A.V. /et al/. (1998). Caracterización isoenzimática de variedades de yuca pertenecientes al banco de germoplasma del IPA. En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de La Habana. Junio 1-5. 295p.
- Martelli, G. /et al/. (1993). Isozyme analysis of somaclonal variation among regenerants from apple rootstock leaf tissue. **Acta Horticulturae**.336: 381-387.
- Martin, G. B. (1994). Analysis of the molecular basis of *Pseudomonas syringae* p.v. tomato resistance in tomato. **Euphytica** 79:187-194.
- Mayumi, K and Shibaoka, H. (1995). A possible double role for brassinolide in the recommendation of cortical microtubules in the epidermal cell of cortical microtubules in the epidermal cell of azuki bean epicotyls. **Plant Cell Physiol** 36(1):173-181.
- McCormick, S. /et al./. (1986).Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep.** 5:81-84.
- McKersie, B. D; Brown, D. C. W. (1996). Somatic embriogenesis and artificial seeds in forage legumes. **Seed Science Research** 6:109-126.

- Menéndez, A; García, E. G y Nieto, S.M. (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. **Plant Cell Rep** 13:197-202.
- Menéndez, E. /et al./. (1996). *Agrobacterium* mediated transformation for the production of transgenic cabbage (*Brassica oleracea*) cv. Hércules plants. **Biotech. Aplicada** 13:142-143.
- Messiaen, J and Van Astem, P. (1993). Defence gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. **Plant Cell Physiol** 34:1117-1123.
- Milach, S.C.K.; Rines, H.W.; Phillips, R.L. (1997). Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. **Theor.Appl.Genet.** 95: 783-790.
- MINAGRI. (1983). Instructivo técnico del cultivo de los semilleros. La Habana. 47p
- MINAGRI. (1990). Instructivo técnico del tomate. Buró de Información Científica Técnica .
- MINAGRI. (1999). Plenaria de la Asociación Nacional de Cultivos Varios. Informe final de la campaña de frío de hortalizas 1998-1999. Holguín, julio 30-31.
- Mirghis, E. /et al./. (1995). Análisis de cultivares y híbridos de tomate para la formación de callos y regeneración *in vitro*. **Acta Horticulturae** 4. 12p .
- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture an alternative for production of useful metabolites. **FAO-Agricultural Services Bulletin** 108. 87p.
- Mohamed-Yassen, Y and Abdallah-Hemeida, A. (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato from cotyledon and hypocotyl explants. En: Resúmenes Plant Biotechnology Towards The Third Millenium. CIGB, Dic 6-10. La Habana.
- Money, T. /et al./. (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 24:2616-2617.
- Morales, C. /et al./. (1996). Variabilidad en somaclones de tomate provenientes del cultivar Campbell-28. **Cultivos Tropicales** 17(1): 67-71.
- Morales, C. M. (1997). Caracterización biométrica, citogenética e isoenzimática de somaclones de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). (Tesis de Maestría). UH, La Habana.

- Morales, M.R.; Crespo, M.C.; Cordero, S.A. (1997). El locus Pgi-2 en la identificación de variedades tetraploides de *Medicago sativa* y de otras especies del mismo género. **Invest. Agraria. Prod. Prot. Veg.** 12(1, 2 y 3): 15-25.
- Moré, O. /et al/. (1996). Efecto del DAA-6 sobre la callogénesis y formación de estructuras embrioidales en papa. Résumenes X Seminario Científico del INCA. La Habana.
- Moré, O. /et al/. (1997). Efecto del análogo de brasinoesteroide MH5 en el proceso de callogénesis en papa (*Solanum tuberosum* L.). Ponencia XII Forum de Ciencia y Técnica. ISCAH, La Habana.
- Murashige, T.; Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and biassays with the tobacco tissues cultures. **Physiol. Plantarum.**15: 473-497.
- Murry, L. E. /et al./ (1993).Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic virus. **Biotech.** 11:1559-1564.
- Newman, P. O; Krishnaraj, S; Saxena, P. K. (1996). Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): somatic embyogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. **International Journal of Plant Sciences** 157(5):554-560.
- Núñez, M. (1996). Los brasinoesteroides y su actividad biológica.INCA, La Habana.
- Núñez, M. (1999). Aplicaciones prácticas de los brasinoeteroides y sus análogos en la agricultura. **Cultivos Tropicales** 20(3):63-72.
- Ohmori, T.; Murata, M.; Motoyoshi, F. (1996). Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. **Theor.Appl.Genet.** 92: 151-156.
- Olodakoon, C. (1995). Determinación del potencial organogenico en los cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) Roma y Placero. (Tesis de Diploma). ISCAH, La Habana.
- Oramas, P. (1999). Obtención y caracterización molecular de plantas transgénicas de papa resistentes a las infecciones del PRLV. (Tesis Dr. Ciencias Biológicas). CIGB, C. Habana.

- Pérez , J. N. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. IBP. 321p.
- Pérez de la Vega, M. (1997). El uso de marcadores moleculares en genética vegetal y mejora. **Invest. Agr: Prod.Prot.Veg** 12(1, 2 y 3): 33-60.
- Pierik, R. L. M. (1990a). Propagación vegetativa. En: Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa Ed, Madrid. 325 p.
- Pierik, R. L. M. (1990b). Variación somaclonal. En: Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa Ed, Madrid. 589p.
- Pierik, R.L.N. (1987). In vitro culture of higher plants/ Dordrecht: Klumer Academic Publishers. 344p.
- Piven, N. M; Sanchez. M; Infante, D. (1994). Breeding tomato plants for regenerability in vitro. **In vitro** 30A, 3, Pt.2, 82.
- Plana, D. /et al/. (1998). Efecto del oligopeptato Pectimorf sobre explantes de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia. Programa y Resúmenes XI Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. 17-20 nov, La Habana.
- Pratta, G; Zorzol, R; Picardi, L. (1997). Intra and interspecific variability of *in vitro* culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). **Brazilian Journal of Genetics** 20:75-78.
- Prede, M. /et al/. (1998). Caracterización isoenzimática de plántulas de arroz (*Oriza sativa* L.) regeneradas *in vitro* bajo el efecto del DAA-6. En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de La Habana. Junio 1-5. La Habana. 238 p.
- Prince, J.P.; Pochard, E.; Tanksley, S.D. (1993). Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison synteny with tomato. **Genome**. 36(3): 404-417.
- Ramulu, K. (1991). Genetic variation in vitro cultures and regenerated plants in tomato and its implications. **Mogr. Theor. Appl. Genet.** 14: 259-275.
- Ramulu, K. /et al/. (1996). Microtoplast mediated transfer of single specific chromosomes between sexually incompatible plants. **Genome** 39(5)921-933.

- Ratushnayak, Y. /et al/. (1993). Fertile asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon peruvianum* var. *Dentatum* Dun. **Mol. Gen. Genet.** 236(2/3):427-432.
- Reinert, J. (1958). Untersuchungen über die morphogenese und gewebe-kulturen. **Ver. Dtsh. Bot. Ges** 71:15.
- Reinert, J; Backs-Husemenn, D and Zerben, H. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. **Nate CNRS** 261-268.
- Ricci, D; Fraternali, D; Giamperi, L; Manunta, A. (1996). Auxina structure and morphogenetic activity. **Revista EPPOS**, 20:5-12.
- Rodríguez, T; Nuñez, M y Vento. H. (1998). Influencia de un análogo de brasinoesteroides en la fase de multiplicación *in vitro* del banano (*Musa* spp.) var. Gran Enano. **Cultivos Tropicales** 19(2):19-22.
- Roduva, V; Stamova, L; Stancheva, J. (1994). Comparative study of tomato somaclones for resistance to *Fusarium oxysporum* sp. *radicis lycopersici* and *Alternaria solani*. **Acta Horticultural** 376:411-414.
- Rom, M. /et al/. (1995). Purity control of F1 hybrid tomato cultivars by RAPD marker. **Plant Breed.** 114: 188-190.
- Rosu, A; Petrescu, C. (1995). Obtaining somaclones by means of indirect adventitious organogenesis *in vitro* in different genotypes of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Anale Institutiei de Cercetari pentru Lugumiculture si Floricultura**. 13:37-44.
- Rus-Kortekaas, W. /et al/. (1993). Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. **Genome**. 37: 375-381.
- Sala, F. (1990). Somaclonal variation and chemically induced mutagenesis for the production of salt and drought tolerance in tomato. **Acta Horticulturae** 280. 353-360.
- Sandbrink, J.M. /et al/. (1995). Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. **Theor. Appl. Genet.** 90: 444-450.
- Sanford, J. C. (1987). Delivery of substances into cell and tissue using a particle bombardment process. **J. Part. Sci. And Tech.** 5:27-37.

- Santana, N. (1985a). Aplicación del cultivo *in vitro* en el mejoramiento del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). II Obtención de callos a partir de anteras. **Cultivo Tropicales** 7(1): 121-128.
- Santana, N. (1985b). Estudio sobre la formación de brotes en cultivo *in vitro* de hojas de tomate. **Cultivo Tropicales** 7(2): 117-122.
- Santana, N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.). (Tesis de Dr. Ciencias Agrícolas). INCA, La Habana.
- Santana, N. (1998). Establecimiento de una metodología para la producción de la semilla artificial de café (*Coffea* spp.). Informe Anual de Proyecto. INCA-CICY. 56p.
- Santos, J. (1998). Efecto de la actividad de un oligopeptato en el proceso de callogénesis *in vitro* de *Coffea canephora* var. (Trabajo de Diploma). ISCAH, La Habana.
- Sasse, J. (1997). Recent progress in brassinoesteroid research. **Physiol Plant** 100:696-700.
- Segura, B; Caballer, V. (1995). Aspectos económicos de la producción y comercialización del tomate. En: El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Barcelona y México. 671-694p.
- Segura, J. (1993). Morfogenesis *in vitro*. En: Cultivo de tejidos. 381-392p.
- Shoenmakers, H. (1993). Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. Plantenvredeling. Wageningen. 320p.
- SIGMA. (1999). Catalogo de productos químicos de laboratorio.
- Singh, R.J. (1993). Plant cytogenetics. CRC Press, Boca de Raton. 423p.
- Smith J y Smith O. (1992). Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**. 47:85-140.
- Smulders, M. J. M; Rus-Kortekaas. W; Vosman. B. (1995). Tissue culture induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plans. **Theor Appl. Genet.** 91(8): 1257-1264.
- Smulders, M.J.M.; Bredemeijer, G.; Rus-Kortekaas, W.; Arens, P.; Vosman, B. (1997). Use short microsatellites from database sequences to generate

- polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theor. Appl. Genet.** 97: 264-272.
- Snedecor, G; Cochran, W. (1971). Métodos estadísticos. Continental Ed. México. 702p.
- Song, W.; Henry, R.J. (1995). Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. **Genet. Res. Crop Evol.** 42: 273-281.
- Songstad, D. D.; Sommers, D. A; Griesbach, R. J. (1995). Advances in alternative ADN delivery techniques. **Plant Cell Tiss. and Organ Cult.** 40:1-15.
- Staffort, A. (1991). Genetics of cultured plants cells. In: **Plant Cell and Tissue Culture**. Iniv Press Ed. 251p.
- Suh, H.S.; Sato, Y.I.; Morishima, H. (1997). Genetic characterization of weedy rice (*Oriza sativa* L) based on morpho-physiology, isozymes and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** 94(3-4): 316-321.
- Sui, L.; Zee, F.; Manshardt, R.M.; Araddhya, M.K. (1997). Enzyme polymorphisms in *Canarium*. **Scientia Horticulturae**. 68(1-4): 197-206.
- Sulaiman, I.M.; Babu, C.R. (1996). Enzyme polymorphism analyses in three endangered species of himalaya poppy, *Meconopsis*. **Genet. Res. Crop Evol.** 43(4): 351-356.
- Swartz H. J. (1991). Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. En: Micropropagation. Technology and Application. Klumer Academic Publishers Ed. 423p.
- Taiz, L and Zeiger, E. (1991). Plant physiology. Benjamin/Cummings. Pub. Co. Inc., Redwood City. 589p.
- Taíz, L. (1998). Hormonas. En: Plant Physiology. Sinaver Associates, Inc Ed. 230-270p.
- Takahashi, T. /et al/. (1995). The DIMINUTO gene of arabidopsis is involved in regulating cell elongation. **Genes and Development** 9:97-107.
- Tanksley, S.D. /et al/. (1996a). Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theor Appl. Genet.** 92: 213-224.

- Tanksley, S.D. /et al/. (1996). Advantaced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. **Theor Appl.Genet.** 92: 213-224.
- Tanksley, S.D.; Nelson, J.C. (1996). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. **Theor. Appl.Genet.**92: 191-203.
- Torelli, A. /et al/. (1996). New potential markers of in vitro tomatoe morphogenesis identified by mRNA diferential display. **Plant Molecular Biology** 32:891-900.
- Tran Thanh Van, K., y Trinh, T. H. (1990).Organogenetic differentiation. En: Plant Tissue Culture, Applications and Limitation. Elsevier Ed, Amsterdam. 34-53pp.
- Tsatsakis, A. M and Shtilmam, M. I. (1993). Phytoactive polymers: new synthetic plant growth regulators. In: Morphogenesis in plants. Plenum Press Ed, New York.58-69p.
- Vain, P; Mullen, M; Finer, J. (1993). Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Report** 12:84-88.
- Vallejo, R. L; Polston, J. E. (1994). Comparison of médium, tissue type and genotype on *in vitro* plant regeneration of tomato. **Hortscience** 29(5):465.
- Van Ooijen, J.W. /et al/. (1994). An RFLP map of *Lycopersicon peruvianum*. **Theor Appl.Genet.** 89: 1007-1013.
- Vasil and Herrera-Estrella L. (1995). Molecular Biology: An important Tool for Crop Improvement and the Understanding of Plant Development. Secund International Training Course on the Analysis and Manipulation of the Plant Genome.
- Vasil I. (1998). Biotechnology and Food Security for the 21st century: A real Woorld Perspective. **Nature Biotechnology** 16: 399-400.
- Verde, G; Alvarez, M. (1994). Fenología del cultivar Campbell 28 y la forma silvestre Nagcarlan en siembra fuera de épocas. La Habana:BNCT-IDICT.
- Vos, P.; R. /et al/. (1995). AFLP: a new tecnique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23(21):4407-4414.

- Weaver, R.J. (1976). Nomenclatura y aspectos históricos. En: Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trillas Ed. 17-40p.
- Williamson, V.M. /et al/. (1994). A PCR- based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato. **Theor. Appl.Genet.**87: 757-763.
- Withers, L. A and Willians, J. T. (1984). Long term storage of germoplasm and germplasm exchange. **IAPC's and Biotechnology**. IRRI, Philippines.
- Xiquéz, X. /et al/. (1998). Estudio citogenético en somaclones de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). **Revista Biología** 12:21-27.
- Yamamoto, R. /et al/. (1997). Brassinosteroid induce entry into the final stage of thacheary element differentiation in cultured zinnia cell. **Plant Cell Physiol** 38(8):980-983.
- Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. **Trends Plant Sci.** 2(4):137-143.
- Zakir, T. /et al/. (1996). Use of gametoclinal and somaclonal variation for obtaining tomato forms resistens to *Claribacter michiganenese* sub sp. Michiganenese. En: Biotechnology: From Fundamental Concepts to Reality. World Congress on in vitro Biology. San Francisco, 22-27 June.
- Zambrano, A.Y.; Demcy, J.R.; González, V. (1998). Estabilidad genética en cultivares de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). En: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones de La Habana, junio 1-5. La Habana. 228 p.
- Zapata, B. (1994). Estudio morfohistológico y bioquímico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* var. Robusta. (Trabajo de Diploma). ISCAH, La Habana.
- Zhuk, I. P. (1994). Resistance of somatic clones of tomato to the tabacco-mosaic virus. **Mikrobiol** 55(6): 41-46.
- Zorzoli, R; Mroginski, L; Picardi, L. (1994). Evaluación de la capacidad de desdiferenciación y rediferenciación *in vitro* de cuatro genotipos de *Lycopersicon esculentum*. Mill. **AgriScientia** 11:55-60.