

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

**Estudio de la micropropagación de *Solanum lycopersicum* L
considerando el análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la bachiller Yanetza Andreina Linares
como requisito parcial para optar el título
de Licenciado en Biología

Tutores: Dra. Teresa Edith Vargas y Dr. Héctor Blanco.

CARACAS, VENEZUELA

Octubre, 2018

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, por darme principalmente salud, constancia y dedicación para poder culminar mi carrera. Por poner en mi camino todas las condiciones y personas que hicieron que todos estos años valieran la pena.

A toda mi familia, especialmente a mis padres, creo que no me alcanzaría la vida para agradecerles lo que soy, lo que me han dado, y lo que han hecho para hacer realidad todos mis sueños, por consentirme, por sus regaños, por sus enseñanzas, por su apoyo constante, por creer en mí, por ser no sólo mis padres, sino mis grandes amigos. Gracias por enseñarme que no venimos a esta vida a ser perfectos, y que realmente somos exitosos cuando alcanzamos SER FELICES. También y no menos importante, a mi Blanquito, por ser la mejor mascota del mundo, por acompañarme siempre, eres el regalo mas bello que me han dado.

A mi abuelo Cirilo Salas, que en vida, me hizo sentir una de sus nietas mas queridas, por ser el pilar de mi familia, por brindarnos una excelente educación, llena de buenos principios y valores y sobre todo por enseñarnos que la familia es el mejor tesoro que tenemos.

A Mi tía Rosa Linares, por ser mi segunda mamá, gracias por tanta dedicación, cuidado, regaños y amor durante tantos. A mi primos Robert Vargas, Benito Vargas, Anderson Vargas, Emil Vargas, por su apoyo, por consentirme tanto, por quererme tanto a su manera, por alegrarme la vida, porque no importa que necesite, ustedes siempre buscaran la manera de ayudarme. A mi ahijado Ezequiel Vargas, por ser el niño más especial del mundo, por ser tan dulce conmigo, regalarme tantos abrazos, besos, y mucho cariño.

A Andrea y Andreina, por no ser sólo mis primas, sino mis grandes amigas y mis hermanas, por ser parte de mi vida diaria a pesar de la distancia, por ser mis cómplices, por estar conmigo en las buenas y malas, por celebrar conmigo todos mis eventos importantes. Gracias por tanto, se que han hecho mas por mí que yo por ustedes.

A todos mis amigos que hicieron parte de mi vida universitaria, por darme los mejores momentos de mi vida dentro y fuera de la universidad, especialmente, a Valentina Duque (mi hermana putativa), Luis José Días y Michelle Ameruoso, por su amistad incondicional, por su apoyo, y tanto cariño, LOS ADORO.

A todos los profesores que formaron parte de mi carrera universitaria, gracias por todo lo que me enseñaron, algunos por ser tan buenos consejeros y amigos.

A Luis Hermoso, definitivamente una de las personas que siempre estuvo dispuesta a ayudarme cuando lo necesite, gracias por hacerme reír tanto. Igualmente, gracias por ser parte del inicio de este trabajo, por eso, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

Francisco Shutte, por proponer iniciar este trabajo, por apoyarme con material para llevarlo a cabo, igualmente por siempre estar a la orden y estar en mis presentaciones, muchas gracias.

A la profesora Eva de García, por permitirme estar en el laboratorio, por ayudarme en la realización y evaluación de este trabajo.

A mi querida mi profesora y tutora Edith Vargas, por permitirme trabajar con usted, por confiar en mí, por enseñarme tantas cosas, por estar disponible para mi en todo momento. Gracias por ser no sólo mi tutora, sino por ser mi mamá y mi amiga. Gracias también a Joaquin, por ofrecer “la

colita” cuando podía y hacerme reír tanto en el trayecto

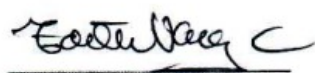
Gracias a mi profesor y tutor Héctor Blanco, por querer trabajar conmigo, por brindarme las herramientas y conocimientos para realizar un trabajo nuevo, hermoso y de calidad.

Gracias a los miembros de mi jurado, Andrea Menéndez, Iselen Trujillo, y Eva de García por su tiempo, dedicación y correcciones para que este trabajo fuese excelente.

**DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA
BR. YANETZA ANDREINA LINARES SALAS**

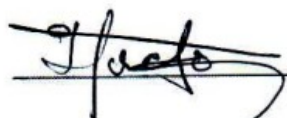
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Yanaetza Andreina Linares Salas, portadora de la cédula de identidad CI: V-21.618153, titulado **“Estudio de la micropropagación de *Solanum lycopersicum* L considerando el análisis del contenido de pigmentos fotosinéticos”** para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

Para dar de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 16 días del mes de Octubre del año 2018.



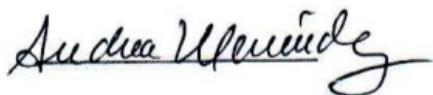
Dra. Teresa E. Vargas

Tutor



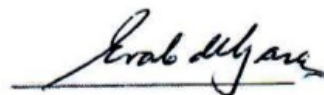
Dr. Héctor Blanco

Tutor



Dra. Andrea Menéndez

Jurado



Dra. Eva de García

Jurado

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas que representa una de las especies vegetales más importantes del mundo debido a su valor económico y cultural. Es una fuente importante de vitamina C, minerales como el fósforo y el potasio y carotenoides como el licopeno y el β -caroteno. Según cifras reportadas por la FAO en el 2016, la producción de tomate en Venezuela para ese año fue de 162.140 toneladas. Sin embargo, su cultivo en los últimos años se ha visto deteriorado debido a la falta de insumos o al alto costo de los mismos, como también debido a los factores ambientales y los agentes patógenos. En esta investigación, se estableció un sistema de propagación masiva *in vitro* de *Solanum lycopersicum* a partir de microesquejes. Los explantes se cultivaron en medio con sales de Murashige y Skoog (1962), tiamina $0,4 \text{ mgL}^{-1}$, mioinositol 100 mgL^{-1} , sacarosa 30 gL^{-1} y agar 8 gL^{-1} , probándose varios tratamientos (Medios M0, M1, M2 y M3). El mejor medio para el establecimiento y multiplicación de *S. lycopersicum* fue el medio M1 constituido por las sales MS + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de benciladenina (BA) + 1 mg L^{-1} de ácido indol-acético (AIA), observándose un promedio de 3,46 brotes/explante vía organogénesis indirecta. En este estudio, no fue necesario el uso de un medio especial para enraizamiento, ya que se produjeron raíces en todos los medios usados en todas las etapas del cultivo. La aclimatación de *S. lycopersicum* no fue exitosa bajo las condiciones estudiadas. Adicionalmente, se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos (PF) en las plantas obtenidas por germinación *in vitro* (control), las obtenidas a partir de microesquejes de plantas *in vitro* en fase de enraizamiento y las transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación. En el presente estudio, la no aclimatación de las vitroplantas de tomate, fue un impedimento para la determinación de la confiabilidad del contenido de PF como indicador de aclimatación *ex vitro*.

Palabras claves: *Solanum lycopersicum*, cultivo *in vitro*, microesquejes, organogénesis.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE TABLAS

II. ABREVIATURAS UTILIZADAS

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción botánica de *Solanum lycopersicum*

2.1.1 Taxonomía

2.1.2 Origen

2.1.3 Descripción botánica

2.2 Importancia económica del tomate

2.3 Cultivo tradicional del tomate

2.4 Cultivo *in vitro*

2.5 Pigmentos Fotosintéticos

2.5.1 Clorofilas

2.5.2 Carotenoides

2.5.3 Pigmentos fotosintéticos en plantas cultivadas *in vitro*

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

3.2 Objetivos Específicos

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Germinación de semillas de *S. lycopersicum*

4.1.1 Material Vegetal

4.1.2 Desinfección de las semillas

4.2 Multiplicación de *S. lycopersicum* a partir de microesquejes

4.2.1 Material vegetal

4.3 Elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*

4.4 Composición basal de los medios y condiciones para el cultivo in vitro

4.5 Etapa IV: Aclimatación

4.6 Extracción de pigmentos fotosintéticos

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Germinación de las semillas de *S. lycopersicum*

5.2 Multiplicación a partir de microesquejes de *S. lycopersicum*

5.3 Elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*

5.4 Aclimatación de *S. lycopersicum*

5.5 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

6. CONCLUSIONES

7. BIBLOGRAFÍA

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1. Composición de los medios de cultivo

Tabla #2. Parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*.

Tabla #3. Efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de multiplicación de *S. lycopersicum* a partir de microesquejes.

Tabla #4. Parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*.

Tabla #5. Contenido de pigmentos fotosintéticos extraídos de plantas germinadas, y de plantas micropropagadas tanto mantenidas *in vitro* como transferidas a condiciones *ex vitro* de *S. lycopersicum*.

II. ABREVIATURAS UTILIZADAS

2,4 D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftaleno-acético
AIA	Ácido indol-acético
BA	Bncil-adenina
°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
g L ⁻¹	Gramos por litros
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
IBA	Ácido indol-butírico
K	Cinetina
L	Litros
nm	Nanometros
mgL ⁻¹	Miligramos por litros
MS	Medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog 1962

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas, originaria de Suramérica que representa una de las especies vegetales más importantes del mundo debido a su valor económico y cultural, ya que, es ampliamente usado como alimento fresco y/o procesado a nivel doméstico e industrial. Es además, una fuente importante de vitamina C, minerales como el fósforo y el potasio y carotenoides como el licopeno y el β -caroteno (Cruz y col, 2009).

En Venezuela, las zonas de mayor siembra de tomate se encuentra en el Estado Lara, los andes, los llanos occidentales y el centro del país. El tomate producido es consumido mayormente como alimento fresco, también es cultivado para su uso industrial, para la fabricación de salsas, pastas, etc. Según cifras reportadas por la FAO en el 2016, la producción de tomate en Venezuela para ese año fue de 162.140 toneladas. El cultivo de tomate, en la actualidad, se ha visto deteriorado, lo que ha implicado un aumento significativo de su precio en el mercado. Una de las causas del deterioro en la producción de tomate es el factor clima, afectando con más intensidad ejes productivos localizados en los Llanos Centrales y Orientales del país, en estas regiones se redujo el área de siembra y se perdió gran parte de la superficie sembrada (Fedeagro, 2015)

El Nacional, 2017 reportó un grave deterioro en los campos venezolanos. En los Andes, por ejemplo, apenas se pudo sembrar el 25% de la superficie de la que generalmente se cultiva, bien sea debido a la falta de insumos o al alto costo de los mismos. Otra causa que puede ocasionar grandes pérdidas en la producción de tomate es la presencia de plagas y enfermedades. El tizón tardío, causado por el oomycete *Phytophthora infestans* Mont. De Bary, es la enfermedad de mayor importancia económica del tomate y de otras solanáceas que cada vez se hace más resistente a los agroquímicos y causa daños importantes a la producción (Botero y col, 2011).

En Venezuela, a fin de incrementar la productividad y disminuir los costos de producción, para obtener mayores ingresos del cultivo de tomate es necesario implementar tecnologías alternativas como la micropropagación *in vitro* del material genético de interés. Ésta técnica permite mantener la identidad genética y reducir la dependencia de las compañías semilleras para la adquisición de la semilla en cada ciclo (Ámbriz, 1995). Además, permite obtener en corto tiempo, en condiciones bien establecidas, un gran número de individuos, en un espacio reducido y se puede iniciar a partir de nudos y yemas. Además, existen técnicas de propagación de plantas *in vitro*; como la organogénesis y embriogénesis (Valderrama, 2011).

Las plantas cultivadas *in vitro* poseen características morfoanatómicas que las diferencian de aquellas sembradas en ambientes naturales (Molina y col, 2008). Éstas se producen en un ambiente aséptico, caracterizado por una baja intensidad lumínica (Pospíšilová, 1997), y por un medio nutritivo constituido por sacarosa (fuente de carbono) (Molina y col., 2008), por lo que el intercambio gaseoso asociado a la actividad fotosintética de las vitroplantas varía considerablemente (Isaac, 2010). Por estas razones las plantas *in vitro* no necesitan realizar plenamente la fotosíntesis, lo que desemboca en un aparato fotosintético deficiente (Rodríguez y col., 2008). Como consecuencia, en estas plantas se pueden desarrollar anormalidades morfológicas, anatómicas y fisiológicas que limitan la supervivencia de las plantas cuando son transferidas al ambiente *ex vitro* (Sabja, 2014).

Con lo expuesto anteriormente, el interés de este trabajo es establecer un sistema de micropropagación masiva de *S. lycopersicum* y determinar si el contenido de pigmentos fotosintéticos puede servir como un indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* de las plantas micropropagadas

2. ANTECEDENTES

2.1 Descripción botánica de *Solanum lycopersicum*

2.1.1 Taxonomía

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae
- Género: *Solanum*
- Especie: *S. Lycopersicum*
- Nombre científico: ***Solanum lycopersicum***
- Nombre común: tomate, jitomate.

2.1.2 Origen

Las especies del género *Solanum* tienen una distribución natural restringida a las áreas costeras y secas del Pacífico de América del Sur, de Ecuador a Chile, incluyendo las Galápagos. Sin embargo, no hay pruebas históricas o arqueológicas que indiquen que el tomate se cultivara en esa región antes de la llegada de los europeos. En cambio, existe evidencia histórica de que se cultivaba en México antes de la conquista, aunque era un producto de importancia secundaria, de donde además, proviene el nombre de tomate. Tomate proviene de la lengua náhuatl (azteca). En esa lengua la terminación *atl* significa agua, mientras que *tomal* o *tomohuac* significa gordura. Entonces, tomate quiere decir “agua gorda” (León, 2000).

2.1.3 Descripción botánica de *Solanum lycopersicum*

Son plantas herbáceas anuales o perennes, autógamas, de porte erecto y de hasta más de 1.5m de altura, vellosas e inermes; la ramificación, muy abundante desde la base, sigue en la parte

superior de los tallos (León, 2000). El eje central de la planta y sus ramas son de crecimiento monopoidal y llevan en el ápice una yema vegetativa, de modo que crecen indeterminadamente (León, 1968).

Sistema radical: Constituido por una raíz principal que puede alcanzar hasta 50-60 cm de profundidad, provista de una gran cantidad de ramificaciones secundarias y reforzado por la presencia de un gran número de raíces adventicias desde la base de los tallos (Salas, 2001).

El tallo: Es anguloso y pubescente. En las primeras fases de crecimiento es herbáceo y en estado adulto, leñoso. Las yemas axilares producen ramas sucesivas, mientras que las terminales desarrollan flores. El desarrollo del tallo es variable en función de los distintos cultivares, existiendo dos tipos fundamentales de crecimiento:

- Cultivares con tallo de desarrollo determinado o definido, en los que el crecimiento del tallo principal, una vez que ha producido lateralmente varios “pisos” de inflorescencia, detiene su crecimiento como consecuencia de la formación de una inflorescencia.
- Cultivares con tallos de desarrollo indeterminado o indefinido, que tienen la particularidad de poseer siempre en su ápice un meristemo de crecimiento que produce un alargamiento continuado del tallo principal, originando florescencias solamente en posición lateral, normalmente cada tres hojas (INIA, 2005).

Hojas: Se disponen sobre los tallos alternadamente y son compuestas e imparipinnadas, con folíolos de 7 a 9 peciolados, lobulados y con borde dentado.

Flor: Consta de 5 o más sépalos, 5 pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal y 5 estambres que se alternan con los pétalos. Los estambres están soldados por las anteras y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo y evitan la polinización cruzada. El ovario es bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias denominadas comúnmente como “racimos”.

Fruto: Baya globosa o piriforme , de color rojo cuando se encuentra maduro, y es bi o pluricarpelar. Está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Salas, 2001).

2.2 Importancia económica del tomate

- **Producción y consumo a nivel mundial**

El tomate es una de las hortalizas que más se explotan a nivel mundial y que además posee un gran valor económico, aumentando continuamente su cultivo, producción y comercio (CATIE, 1990) .

En Centroamérica, la superficie dedicada a la siembra es de 21.000 ha/año. Su cultivo genera una alta entrada de divisas, especialmente en Guatemala y Panamá; emplea una gran cantidad de mano de obra y promueve una considerable actividad económica dedicada a su producción, mercado y agroindustria. Asimismo, tiene un considerable valor nutricional para la población centroamericana, siendo una fuente importante de vitaminas y minerales, con un consumo *per cápita* diario de 30 g por habitante. A pesar de que las explotaciones tomateras son intensivas y tecnificadas, los rendimientos son bajos (12.75 ton/ha) en comparación con el norte de América y Europa (CATIE, 1990).

Según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), para el 2016, China es el primer productor mundial de tomate con 56.308.914 toneladas anuales, seguido por India con 18.399.000 toneladas anuales, y Estados Unidos es el tercer productor mundial con 13.038.410 toneladas anuales. La producción estadounidense de tomate está orientada a dos mercados diferenciados: el de consumo en fresco y el de consumo procesado (puré o pasta, y salsa). California es el principal estado productor de tomate rojo; aporta el 35 % de la producción estadounidense de tomate fresco y el 95 % del tomate para procesamiento (NASS, 2016).

Egipto y Turquía se ubican entre los países que registran los mayores niveles de consumo *per cápita* a nivel mundial, con alrededor de 90 kilogramos por persona por año (FIRA, 2016).

- **Comercio internacional**

En el 2014 hubo una importante exportación de tomate en los que se destacan países como México y Holanda, con un 19.7 y 14.5 % del volumen mundial exportado respectivamente. España es el tercer exportador mundial, con el 12.3 % de las ventas mundiales. Otros importantes exportadores, como Turquía (7.5 %), Jordania (6.6 %) y Marruecos (6.2 %), registraron un dinamismo sobresaliente en el crecimiento de sus ventas al exterior, con aumentos a tasa anuales de 9.5, 8.1 y 8.8 %, respectivamente. En 2014, el 52.7 % del volumen mundial importado se concentró en cuatro países: Estados Unidos (22.1 %), Federación Rusa (12.1 %), Alemania (10.6 %) y Francia (7.9 %) (FIRA, 2016).

- **Importancia en Venezuela**

La producción nacional de tomate está destinada en su mayor parte al consumo fresco y una mínima proporción es destinada al uso industrial y procesamiento de pasta de tomate. Es por ello que éste es un rubro de mucho valor para la población venezolana.

Según cifras reportadas en el 2016 por el Instituto Nacional de Nutrición, el tomate en Venezuela tiene un consumo *per cápita* de 7, 1 kilogramos anuales (Agropatria, 2016), y la producción para ese mismo año fue de 162.140 toneladas (FAO, 2016).

Sin embargo, en Venezuela, la producción de tomate se ha visto deteriorada en los últimos años. Fuentes como El Nacional en el 2017, reportó que hubo un gran deterioro de la producción de tomate y otras hortalizas debido a la falta de insumos (semillas, repuestos para maquinarias, agroquímicos, y fertilizantes) o al alto costo de los mismos.

2.3 Cultivo tradicional de tomate

El tomate se propaga a partir de semillas. Para el cultivo de tomate es de gran importancia tener en cuenta las condiciones del terreno como, la calidad del suelo, y la selección de las mejores semillas con la finalidad de aumentar la producción. La temperatura óptima para su desarrollo entre 23 y 25°C, como promedio. Requiere de un buen suministro de humedad; el exceso o déficit produce desórdenes fisiológicos y aumenta el riesgo de enfermedades.

Las semillas de tomate primero son sembradas en una bandeja de germinación, en donde crecen hasta un tamaño ideal para luego hacer el trasplante a suelo firme. Las bandejas contienen tierra

preparada con sustrato bien abonado, en donde crecerán las plántulas. Una vez que son sembradas, las semillas germinan al cabo de una semana y aproximadamente en 25 días o un mes, se tienen pequeñas plantas listas para sembrar en el campo (Escobar y Lee, 2009).

Las áreas de mayor producción de tomate en Venezuela, se localizan en los estados: Aragua, Carabobo, Guárico, Lara, Monagas, Portuguesa y Zulia. Sin embargo, una de las principales tierras para el cultivo de hortalizas se localizan en Quibor, Edo. Lara, en donde se viene produciendo tomate en grandes extensiones de monocultivo (INIA, 2005).

- **Tipos de tomate sembrados en Venezuela**

Tomate perita: es ampliamente cultivado a campo abierto en Venezuela, su uso es principalmente para hacer salsas tanto a nivel casero como industrialmente. Se cultiva en toda la cordillera Andinocostera en la época de lluvias y en las vegas (llanura o valle de inundación) de los grandes ríos llaneros como el Guárico y el Tiznados en la época seca. Se cosecha con la mínima madurez (de verde a pintón) por lo que se requiere recolectarlo varias veces a la semana durante un periodo largo de aproximadamente dos meses, el valor varía por el tamaño, la dureza, la madurez, el brillo y la forma.

Tomate manzano: Su crecimiento es indeterminado y es cultivado en las zonas tropicales principalmente dentro de los invernaderos, su uso es para consumo fresco en ensaladas.

Tomate Cherry: Caracterizado por su reducido tamaño y diámetro no mayor a 3 cm. Por lo general crecen en climas cálidos y tropicales. El tomate cherry tiene a su vez varios tipos o cultivares como tomate naranja, morado o negro (Rodríguez, 2007)

2.4 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo de diferentes partes de la planta bajo condiciones asépticas. Los aspectos fundamentales en el cultivo de tejidos son: el aislamiento de fragmentos de tejidos u órganos de una planta, previamente desinfectados, para posteriormente ser transferidos a un medio apropiado que permita expresar su capacidad morfogénica (López, 1990).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales, existen diferentes técnicas de propagación *in vitro*: 1) La micropropagación, que es una técnica que permite obtener en corto tiempo, en condiciones bien establecidas, un gran número de individuos, en un espacio reducido y se puede iniciar a partir de nudos, yemas y meristemas (Valderrama, 2011), 2) la organogénesis, proceso morfogénico, en el cual, se pueden obtener tallos, raíces o flores a partir de cualquier tejido somático, y puede ocurrir de manera directa (sin la formación previa de callo) o de manera indirecta (con la formación previa de callo) y 3) La embriogénesis somática, que es un proceso morfogénico en el cual se induce la formación de embriones a partir de la siembra de tejidos o células somáticas, y al igual que la organogénesis puede ocurrir de manera directa e indirecta si hay la formación previa de callo (Radice, 2010).

Los callos son masas no organizadas de células diferenciadas y no diferenciadas que se forman como consecuencia de una herida en la planta o inducida en el explante cultivado en un medio provisto de factores de crecimiento (Zaid y col, 2004). Una de las características importantes de callo, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas (Lallana y col, 2003).

La relación auxina/ citocinina (hormonas vegetales) regula la formación de callo y la morfogénesis en cultivos de tejidos y su efecto varía según la especie, genotipo, el tejido o las condiciones de cultivo (Pérez y cornejo, 2014). Las citocininas son las hormonas estimuladoras de la división y diferenciación que intervienen en procesos de desarrollo de las plantas; mientras que la auxina es la principal hormona en el control del desarrollo de la raíz (Valderrama, 2011).

Una micropropagación eficiente de una especie debe tener tres pasos fundamentales: el establecimiento aséptico del cultivo, su multiplicación, el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (Murashige, 1974).

En la fase 0 (fase preparativa), se debe tener en cuenta el estado fitosanitario, genético y fisiológico de la planta madre ya que tiene una gran influencia sobre la calidad posterior de las plantas hijas (Derebergh y Maene, citado por Jiménez, 1998). La fase I consiste en el establecimiento *in vitro* de los cultivos asépticos y fisiológicamente vigorosos en los cuales se espera la inducción del proceso morfo-génico (Jiménez, 1998). La fase II se caracteriza por la producción del mayor número posible de propágulos a partir de explantes ya establecidos *in vitro*. La fase III tiene como objetivo producir una planta autótrofa que pueda sobrevivir a las condiciones de trasplante siendo capaz de absorber nutrientes del suelo. La fase IV (aclimatación) corresponde a la transferencia de las plantas al medio ambiente (Kikorian, 1991). Además, existen factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación como: la planta que dona el explante, el explante, factores físicos como la luz y la temperatura, los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo (Villalobos y Thorpe, 2001).

La micropropagación tiene múltiples usos y aunque normalmente está relacionada con la multiplicación masiva de plantas, también es importante en el mejoramiento genético de las

mismas. La aplicación de la micropropagación en el mejoramiento de plantas presenta grandes ventajas. Puede ser usada con el fin de acelerar los programas de mejoramiento genético para inducir variabilidad, o bien obtener híbridos imposibles de obtener por métodos convencionales. Además es una vía para la obtención de plantas más sanas y libres de patógenos (Torres, 1989).

Bahurupe y col. (2013), desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas *in vitro* de variedad de tomate 'Dhanashree'. En sus resultados observaron que la iniciación más temprana de callo fue dentro de 6.73 días en los brotes y en 7,53 días en los hipocótilo. Los brotes mostraron una inducción del 100% del callo cuando los cultivaron en medio MS suplementado con 2,0 mgL⁻¹ benciladenina (BA) y 0,2 mgL⁻¹ de ácido indolacético (AIA). La mayor frecuencia de regeneración (78,40 y 74,93 %) y número máximo de brotes por explante (4,90 y 4,33) se obtuvo a partir de hipocotilo y de brotes respectivamente. Los brotes desarrollados fueron sometidos a enraizamiento en medio MS carente de reguladores de crecimiento.

Hussain y col. (2014), realizaron una evaluación del nitrato de plata en la inducción de callos y en la regeneración de brotes en 3 genotipos de tomate (*S. lycopersicum*) a partir de hipocotilos y de segmentos de hojas. La frecuencia máxima de inducción de callos fue observada en hipocotilos, mientras que la frecuencia de regeneración de brotes *in vitro* y el número de brotes por explante fueron significativamente mayores cuando se usaron discos de hojas. Encontraron que la frecuencia de inducción de callos incrementó con la administración de 10-15 mgL⁻¹ de AgNO₃ en los medios basales de MS junto con 2,0 mgL⁻¹ de IAA, 2,5 mgL⁻¹ de BA (91,33 %) en el genotipo Río Grande, seguido por Roma (88.33 %) y Moneymaker (82.66 %). Del mismo modo la mayor frecuencia de regeneración de brotes *in vitro* (96.66, 92.66 y 90 %) se registró en Río Grande, Roma y Moneymaker respectivamente en medios MS fortificados con 0,1 mgL⁻¹ de AIA, 1.0 mgL⁻¹ de Zeatina y 2,0 mgL⁻¹ de BA junto con 8-10 mgL⁻¹ de AgNO₃.

Khaliluev y col. (2014), estudiaron la influencia del genotipo, tipo de explante y componente del medio de cultivo en la inducción de callos y regeneración de brotes de tomate, usando como explantes cotiledones e hipocotilos. Para la inducción de la respuesta morfogénica, cultivaron los explantes en un medio MS sin reguladores de crecimiento (medio control) y también los cultivaron con diferentes combinaciones y concentraciones de Zeatina y BA y AIA. La mayor frecuencia de inducción de brotes (68,81 %) así como de número promedio de explantes (3,19) se observó para la mayoría de los genotipos estudiados durante el cultivo de cotiledones en el medio de cultivo que contenía 2mgL^{-1} de Zeatina en combinación con $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de AIA.

Gerszberg y col. (2016), establecieron un sistema de regeneración para tres cultivares de tomates polacos ('Lubań', 'Malinowy Warszawski' y 'Rumba Ożarowska') a partir de hipocotilos y cotiledones. Los explantes se cultivaron en 10 medios de regeneración diferentes (medio basal MS o B5 (Medio de cultivo de Gamborg), y con diferentes combinaciones de BA y AIA). Encontraron que la capacidad de regeneración era sustancialmente dependiente de los cultivares, así como en el tipo de explante. Los mejores explantes para inducir la regeneración de brotes fueron cotiledones, seguido por hipocotilos. También observaron que la mejor formulación del medio para la regeneración de brotes a partir de los explantes utilizados fue el medio MS suplementado con 2 mgL^{-1} de BA y $0,1\text{ mgL}^{-1}$ de AIA. Este procedimiento ocurrió vía organogénesis indirecta.

Durrani y col. (2017), evaluaron el efecto del tipo de explante y de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo en diferentes cultivares de tomate. Para su investigación usaron los cultivares Rio Grande, Moneymaker y Galaweree a partir de cotiledones e hipocotilos. Rio Grande fue el cultivar con mayor frecuencia de inducción de callo (93,3 %), en un medio constituido con 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} ANA, seguido de Moneymaker (46.67 %) en un medio

de inducción de callo que contenía 0.5 mgL^{-1} BA, 0.5 mgL^{-1} ANA, 0.5 mgL^{-1} AIA y 1 mgL^{-1} de K a partir de hipocotilos. Igualmente estos investigadores encontraron que el medio que contenía 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} ANA obtuvo una inducción máxima de callos en hipocotilos con un 34.1 % y un 27.23 % en cotiledones. Los callos exitosamente proliferados se transfirieron a 7 tipos de medios de inducción de brotes. El medio que contenía 1 mgL^{-1} de BA y 0.1 mgL^{-1} de ANA mostró el número máximo de brotes a partir de callo. Los callos con formación de brotes los transfirieron a medios de multiplicación que contenían 2 mgL^{-1} AIA, 0.2 mgL^{-1} de BA, en donde todos los callos mostraron multiplicación de brotes.

Kumar y col. (2018), desarrollaron un protocolo eficiente para la regeneración *in vitro* a través de la embriogénesis somática y la organogénesis en los genotipos de tomate Roma, Punjab Ratta y Castle Rock, usando hipocotilos y hojas como explantes. Los explantes fueron cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de hormonas, obteniendo como resultado que la callogénesis máxima en los explantes de hipocotilo (76 %) y de hoja (86 %) se obtuvo en medio MS suplementado con 2,4-D (2 mgL^{-1}) y K (0.5 mgL^{-1}). Luego los callos se cultivaron en medio MS con diferentes concentraciones de BA ($2-2.5 \text{ mgL}^{-1}$) y ANA ($0.25-0.5 \text{ mgL}^{-1}$) para la regeneración de brotes. Sin embargo, los callos no respondieron ante los tratamientos probados. En la regeneración directa de plantas a través de la organogénesis, cultivaron brotes e hipocotilos en un medio MS suplementado con Zeatina (1 mgL^{-1}) + AIA (0.1 mgL^{-1}) y BA (2 mgL^{-1}) + ANA (0.2 mgL^{-1}). La máxima regeneración directa de plantas la obtuvieron tanto de los brotes (81,66 %) como de los hipocotilos (73,33 %) del genotipo Punjab Ratta en medio MS suplementado con Zeatina (1 mgL^{-1}) + AIA (0.1 mgL^{-1}). También observaron que el enraizamiento se indujo a la mitad de MS y 0.1 mgL^{-1} de IBA.

Calderon (1982), estudió la regeneración *in vitro* de plantas de tomate a partir de hipocotilos y

segmentos de hojas jóvenes de tomate, utilizando como medio de cultivo un medio MS suplementado con diferentes combinaciones de AIA y BA. En sus resultados, el mayor número de brotes/explante fue obtenido con el medio MS + 2 mgL⁻¹ de BA + 0.5 mgL⁻¹ AIA, ocurriendo vía organogénesis indirecta. El enraizamiento en este estudio fue inducido en un medio MS con y sin 0.1 mgL de AIA.

Contreras y Almeida (2003), realizaron varios ensayos para la propagación clonal de tomate de árbol. Cultivaron cotiledones e hipocotilos de plantas germinadas *in vitro* en medio MS suplementado con BA (2,0-3,5-5,0 mgL⁻¹) + AIA (0,5-0,75-10 mgL⁻¹) y sólo Zeatina (1,0 – 2,0 mgL⁻¹). Estos autores obtuvieron que, después de la tercera semana tanto en los cotiledones como en los hipocotilos hubo desarrollo de pequeñas protuberancias, las cuales se diferenciaron directamente como yemas en los medios que contenían 2,0 mgL⁻¹ de BA + 0,5 mgL⁻¹ de AIA y 2,0 mgL⁻¹ de Zeatina. A partir de ambos explantes, se obtuvieron entre 70 y 415 yemas, las cuales fueron cultivadas en medio MS libre de hormonas, en donde ocurrió el alargamiento del vástago y enraizamiento. El trasplante de las plantas lo realizaron cuando éstas alcanzaron entre 2 y 4 cm de altura, en recipientes con mezcla de sustrato semi-estéril (tierra negra y arena) en proporciones iguales.

2.5 Pigmentos fotosintéticos

2.5.1 Clorofilas

La clorofila es un pigmento de color verde que presenta estructuras policíclicas planas, formada por 4 anillos pirrólicos unidos por medio de puentes de metilo (-CH=) lo que constituye una porfirina. La posición central está ocupada por Mg^{+2} , el anillo IV esta esterificado con un alcohol (fitol) cadena de 20 átomos de carbono con un doble enlace ($C_{20}H_{39}OH$) (Stryer, 2002). La clorofila captura la energía de la luz en longitudes de onda que abarcan el espectro del visible (400 a 700 nm), tiene dos picos máximos de absorción ubicados en el azul y el rojo, y absorbe muy poco en el verde (el cual es reflejado). Al incidir la luz en la molécula de clorofila esta se excita por la absorción de la energía cuantizada, y, luego, la energía es canalizada hacia reacciones de biosíntesis (Lozano, 1997).

En general los cloroplastos contienen tanto clorofila a como clorofila b pero la mayoría contiene el doble de clorofila a que de b. Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región PAR 18 (Radiación Fotosintéticamente Activa) (Stryer, 2002, Hernández, 2002). Las clorofilas son extraídas generalmente de sus complejos lipoproteicos con solventes polares como acetona, metanol o etanol (Cáceres y col, 2015).

2.5.2 Carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides formados por ocho unidades de isopreno (C_5H_8), es decir, moléculas de 40 átomos de carbono con un sistema de dobles enlaces conjugados lo que otorga intensos colores. En su mayoría son solubles en solventes apolares. Sus coloraciones oscilan entre el amarillo (β -caroteno) y el rojo (licopeno). Se encuentran unidos a proteínas mediante enlaces no covalentes (Matos y col. 2002). Los carotenoides tienen dos funciones: capturar la energía en su condición de pigmento accesorio (absorbiendo energía lumínica en la región 400-500 nm) y disipar el exceso de energía y los estados excitados del oxígeno en las membranas vegetales en condiciones de alta radiación (Cáceres y col, 2015). En plantas y algas los carotenoides se encuentran en las membranas tilacoides de los cloroplastos. La regulación de la carotenogénesis está estrechamente unida al metabolismo de la clorofila, a la reorganización de las estructuras de membrana y a la estimulación lumínica (Stryer, 2002).

El contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área de las hojas, constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia (Huang y col., 2004; García y col., 2005 citado por Suárez y col, 2017).

2.5.3 Pigmentos fotosintéticos en plantas cultivadas *in vitro*

Las plantas cultivadas *in vitro* tienen, en general, limitada capacidad fotosintética a causa de las bajas concentraciones de CO_2 y baja PPFD (Densidad de flujo fotónico fotosintético). Además, los medios de cultivo generalmente contienen sacarosa como fuente de principal de energía. Estas condiciones físicas del ambiente *in vitro* tiene como consecuencia la disminución en la

fotoautotrofía, la cual es una condición crítica que puede influir negativamente en la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatación a condiciones *ex vitro*. (Ariguita y col, 1999).

Melgarejo y col (2010), consideran que el estudio de las adaptaciones fisiológicas de los organismos al medio ambiente, permite comprender los mecanismos que explican algunas respuestas ecológicas. Mediante estudios ecofisiológicos es posible determinar las condiciones para el desarrollo de una especie, ecotipo o cultivo, incluso, de variedades dentro de un cultivo, contribuyendo a mejorar su productividad.

Villalobo y col (2012), evaluaron los cambios morfo-fisiológicos en plántulas de piña (*Ananas comosus* L. Merr. 'MD-2') durante la fase de aclimatación. Las plántulas se aclimataron bajo 80% de humedad relativa, 25,5 °C de temperatura y flujo fotónico fotosintético de 400-500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como promedio durante 45 días bajo fotoperiodos naturales. Todas las medidas (longitud de la planta, número de hojas y raíces, peso fresco, ancho y largo de la hoja 'D', fotosíntesis neta y tasa de transpiración total) se llevaron a cabo al final de la fase de enraizamiento *in vitro* coincidiendo con 0 día de aclimatación y en 15, 30 y 45 días después de eso. La actividad fotosintética no aumentó durante los primeros 30 días de la fase de aclimatación. Después de 30 días, la actividad fotosintética varió de 5,72 a 9,36 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mientras que la transpiración total varió de 6,0 a 1,42 $\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Durante los primeros 30 días no hubo diferencias significativas en número de hojas, largo o ancho de la hoja más larga ('D') (cm) o longitud de la planta (cm). Sin embargo, después de 45 días, el peso fresco de la planta (g), la longitud y el ancho de la hoja 'D' (cm) y el número de raíz aumentaron significativamente, mientras que la transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) disminuyó. Hubo disminuciones pequeñas pero significativas en la clorofila a y b ($\mu\text{g g}^{-1} \text{mf}$). El aumento de la actividad fotosintética después de 30 días muestra que el aumento en la intensidad de la luz y la reducción de la humedad relativa durante la aclimatación no constituyeron factores

inhibidores.

Isaac y col (2010), evaluaron la actividad fotosintética de las plántulas de *Coffea arabica* var. Catuai y Caturra rojo, obtenidas *in vitro* en fase de multiplicación. Determinaron la tasa de fotosíntesis neta, transpiración, conductancia estomática y concentración de pigmentos clorofílicos para cada una de las variedades a las ocho semanas de cultivadas; las vitroplantas crecieron en condiciones controladas en un medio MS suplementado con $0,5 \mu\text{molL}^{-1}$ de AIA y $5 \mu\text{molL}^{-1}$ de 6-BA. Los resultados mostraron que ambas variedades desarrolladas *in vitro* presentaron tasas de fotosíntesis neta similares a las plantas de cafeto adultas cultivadas en condiciones de campo, lo que demostró la capacidad de fotosíntesis de las plántulas, conservando un adecuado equilibrio para el intercambio gaseoso en el proceso fotosintético durante la etapa de multiplicación *in vitro*.

Pérez y col (2016), caracterizaron desde el punto de vista bioquímico e histológico plantas de *Agave fourcroydes* L aclimatadas *in vitro*. Entre los indicadores bioquímicos, analizaron el contenido de las clorofilas totales y los resultados fueron comparados con plantas de un mes en medio de cultivo de enraizamiento. Encontrando que el contenido de clorofilas disminuyeron, en relación con las plantas *in vitro* enraizadas durante 30 días.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer un sistema de micropropagación masiva de *Solanum lycopersicum* L. y determinar si el contenido de pigmentos fotosintéticos puede servir como un indicador bioquímico confiable de aclimatación *ex vitro* de las plantas micropropagadas

3.2 Objetivo Específicos

- Establecer el proceso de germinación *in vitro* a partir de semillas de *Solanum lycopersicum* L., y así obtener material vegetal en condiciones asépticas para el proceso de propagación *in vitro*.
- Establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Solanum lycopersicum* L a partir de microesquejes.
- Determinar a través de estudios histológicos la naturaleza del proceso morfogénico en la etapa de multiplicación y si este ocurrió vía directa o indirecta.
- Estudiar estrategias que permitan la aclimatación *ex vitro* de las plantas de *Solanum lycopersicum* L obtenidas *in vitro*.
- Determinar el contenido de pigmentos fotosintéticos mediante espectrofotometría en plantas bajo condiciones tanto *in vitro* como *ex vitro*.

- Determinar si el contenido de pigmentos fotosintéticos puede emplearse como indicador bioquímico confiable de aclimatación (o potencial para aclimatación) a condiciones *ex vitro* de las plantas de tomate micropropagadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Ecofisiología de Xerófitas. Ambos pertenecientes al Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV).

4.1 Germinación de semillas de *S. lycopersicum*

4.1.1 Material Vegetal: Las semillas se obtuvieron a partir de un fruto maduro de un tomate comercial, específicamente tomate manzano, comprados en los mercados de la ciudad de Caracas.

4.1.2 Desinfección de las semillas

- Las semillas extraídas del fruto maduro de tomate se secaron por 24 horas en una estufa.
- Se colocaron en una solución de povidine por 15 minutos, se enjuagaron con agua destilada.
- Seguidamente, las semillas se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 3,5 % con 0.5 mL de Tween 20 y se lavaron con agua destilada dos o tres veces.
- Por último, las semillas fueron pasadas por etanol pro análisis al 70% durante 5 minutos.

Las semillas, previamente desinfectadas, fueron cultivadas en un volumen aproximado de 15 mL de medio de germinación (1 semilla por tubo). La composición del medio de germinación fue según lo descrito en el punto 4.4 y sin reguladores de crecimiento.

4.2 Multiplicación de *S. lycopersicum* a partir de microesquejes

4.2.1 Material vegetal.

Para llevar a cabo esta etapa, una vez obtenidas las plantas por germinación *in vitro* con una edad aproximada de 4 semanas, se procedió a aislar los microesquejes de 1,5 cm aproximadamente, los cuales se sembraron en medios de cultivo cuya composición de reguladores de crecimiento se describe en la tabla #1.

Tabla #1. Composición de los medios de cultivo

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento			
	AIA (mgL ⁻¹)	BA (mgL ⁻¹)	K (mgL ⁻¹)	ANA (mgL ⁻¹)
M0	0	0	0	0
M1	1	2,5	0	0
M2	1	0	2,5	0
M3	0	2	0	0,5

M0: Medio control. M1 reportado por Hussain y col. (2014), ajustando la concentración de AIA. M2 reportado por Gutierrez, J (1995). M3 reportado por Kumar y col., (2018).

4. 3 Elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*

A fin de promover la elongación y enraizamiento de las plantas obtenidas en el medio de multiplicación, estas fueron transferidas a un medio basal MS, descrito en el punto 4.4 sin reguladores de crecimiento, realizándose 3 períodos de subcultivo cada dos meses. Se consideró un n=20 plantas para llevar a cabo esta etapa.

4.4 Composición basal de los medios y condiciones para el cultivo *in vitro*

Los medios utilizados en las distintas etapas de la investigación fueron preparados según la formulación salina de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementados con 0,4 mgL⁻¹ de Tiamina, 100 mgL⁻¹ de Mio-inositol y 30 gL⁻¹ de sacarosa comercial. El pH de los medios fue ajustado a 5,8 utilizando soluciones a 1 N de NaOH o HCl, colocando 8 gL⁻¹ de agar como agente gelificante. Los medios fueron esterilizados en una autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión.

Los explantes se cultivaron en los diferentes medios a evaluar en esta investigación bajo condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar.

Condiciones de cultivo

El material vegetal fue incubado en una cámara de crecimiento, el cual posee una luz fluorescente continua (50 µmol/m².s), y una temperatura de 25 ± 1 °C durante el lapso de tiempo necesario para el desarrollo de las etapas de micropropagación.

Observaciones

Se realizaron evaluaciones tanto cualitativas como cuantitativas en los diferentes cultivos cada 2 semanas. Los parámetros cualitativos que fueron evaluados son: coloración de los explantes, y tipo de callo formado (según su aspecto morfológico). Los parámetros cuantitativos fueron: porcentaje (%) de contaminación del explante, tiempo de respuesta del explante, % de explantes con formación de callo, promedio (P) de brotes regenerados/explante, % de plantas aclimatadas, P de longitud de raíces y P de longitud de brotes.

Se realizó un total de 26 réplicas para el tratamiento M0, 32 réplicas para el tratamiento M1, 26 réplicas para el el tratamiento M2 y 24 réplicas para el tratamiento M3. Se colocaron 4 explantes por frascos

Caracterización histológica de la respuesta morfogénica

En la etapa de multiplicación para comprobar si el proceso de regeneración *in vitro*, y determinar si el proceso ocurrió de forma directa o indirecta, se realizaron cortes transversales y longitudinales a mano alzada. Los cuales fueron teñidos con Rojo de safranina o con Azul de Toluidina. Los cortes obtenidos fueron observados bajo el microscopio a 40 X y 100 X.

4.5 Aclimatación

Para la fase de aclimatación, las plantas de tomate obtenidas por micropropagación, se extrajeron de los frascos en el cual se desarrollaron y luego se lavaron con agua destilada a fin de remover los residuos del agente gelificante presente en las raíces de las plantas. Una vez lavadas, se colocaron en envases plásticos de refresco de 1,5 mL. Estos recipientes contenían tierra abonada estéril y arena en proporción 1:1. Las plantas fueron sometidas a tres tipos de estrategias de aclimatación durante 15 días:

Estrategia #1: 5 plantas fueron colocadas en el mismo ambiente en donde se desarrollaron *in vitro*, es decir, se incubaron en la cámara de crecimiento, a una $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con luz fluorescente continua ($\text{DFF}=50\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Estrategia #2: 7 plantas se colocaron en propagadores, que fueron cajones de madera con tapa de plástico, con alta humedad (80-93 % de humedad relativa) y baja DFF ($10\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Luego de 4 días del trasplante, se les retiró por poco tiempo la cubierta o la parte superior de los envases en el cual se encontraban sembradas las plantas, quedando estas totalmente expuestas, y se les agregó un pequeño volumen de agua cada 4 días.

Estrategia #3: 5 plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones que en la estrategia #2, pero en esta ocasión, se les realizó un sistema de drenaje a los envases, es decir, realizándole agujeros en la parte inferior del envase, a fin de evitar el exceso de humedad en el interior de los mismos.

4.6 Extracción de pigmentos fotosintéticos

La extracción de pigmentos fotosintéticos (PF) se realizó a partir de plantas obtenidas por germinación *in vitro*, plantas *in vitro* en fase de enraizamiento y plantas en fase de aclimatación *ex vitro*.

El protocolo que fue empleado para la extracción PF fue el descrito por Cáceres y col., (2015).

Los pasos son los siguientes:

- Se desprendió una hoja por planta y determinó su masa fresca utilizando una balanza analítica marca Mettler AE 260 Delta Range ®.
- Se realizó maceramiento foliar añadiendo una pizca de Carbonato de Calcio utilizando en un mortero. Este paso se realizó a 4 °C.
- Una vez macerada la hoja, se le añadió 10 mL de acetona fría al 80 %.
- Posteriormente, el homogeneizado fue filtrado empleando un cilindro graduado de 10 mL, embudo y papel de filtro y se midió el volumen final del filtrado obtenido
- Una vez obtenido el filtrado, se empleó el método espectrofotométrico para determinar la concentracióbñ de PF ($\mu\text{g PF/mL}$) midiendo la absorción lumínica y aplicando la Ley de Lamber y Beer. Las ecuaciones que fueron utilizadas para determinar las concentraciones de clorofila (*Cl*) a y *Cl* b son las descritas por Bruisma (1963) y carotenoides mediante la ecuación de Wellburn (1994).

- La densidad óptica (DO) del filtrado se midió a 663, 652, 645 y 470 nm empleando un espectrofotometro de luz visible marca Genesys 20, Thermo Scientific.

La concentración de la clorofila a, b total y carotenoides fueron determinados usando las siguientes fórmulas:

Ec. 1) $Cl\ a = 12,7 A_{663} - 2,7 A_{645}$

Ec. 2) $Cl\ b = 22,9 A_{645} - 4,7 A_{663}$

Ec. 3) $Cl\ (a+b) = 27,8 A_{652}$

Ec. 4) $Car_{(x+c)} = (1000470 - 1,82Cl\ a - 85,02Cl\ b)/198$

El contenido de los PF se expresaron en masa PF(μ g) /masa fresca foliar (g). Se compararon los valores de contenido de PF de las plantas mantenidas *in vitro* y aquellas transferidas a condiciones *ex vitro* empleando la ANOVA de una vía como herramienta de análisis estadístico usando el programa Past 3.20. Se utilizó un $n=6$ por tratamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE *Solanum lycopersicum*

5.1 Germinación de las semillas de *S. lycopersicum*

En el presente trabajo, el método de desinfección utilizado en las semillas resultó ser el adecuado para la etapa de germinación, permitiendo obtener un 98,3 % de semillas asépticas, lo que indica que el porcentaje de contaminación fue apenas del 1,70 %.

En esta etapa, el tiempo de la germinación de las semillas, es decir, el momento en el que emerge la radícula (Fig 2b) fue de 4 a 7 días, en el cual, se observó un porcentaje de germinación del 70,55 %, lo que nos permite deducir que las semillas sembradas tuvieron un alto porcentaje de viabilidad. Además, se observó 1 plántula por semilla. Estas plantas se desarrollaron progresivamente, obteniéndose un promedio de longitud de las plantas germinadas de 3 cm a los 7 días después de la germinación (Fig 2c), de 6 cm a los 15 días (Fig 2d) y de 10,21 cm al cabo de un mes (Fig 2e). En la tabla #2 se observan los parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de germinación.

Tabla #2. Parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*.

% Contaminación	Tiempo de germinación (días)	% Germinación	Promedio de longitud de plantas (cm), t= 4 semanas
1,70	4-7	70,55	10,21 $\pm$ 2,52

Bahupe y col en el 2013, durante la desinfección de semillas de *S. lycopersicum* obtuvieron resultados similares con respecto al método de desinfección de las semillas y el porcentaje de germinación de las mismas. En su estudio, ellos utilizaron dos tipos de desinfectantes, a distintas concentraciones, con tiempos de desinfección diferentes; encontrando que el mejor desinfectante fue el hipoclorito de Sodio (NaClO) al 4 %, y que el mejor tiempo para la desinfección de las semillas fue de 8 minutos, lo que les permitió obtener un 0 % de contaminación de las semillas sembradas. Observaron un porcentaje de germinación del 82 %.

Martines y col, en el 2010 estudiaron la respuesta fisiológica de semillas de *S. lycopersicum*, y sus resultados son bastante similares con los obtenidos en este trabajo durante la etapa de germinación. En sus ensayos obtuvieron un porcentaje de germinación del 74 %, observando además, un alto porcentaje de viabilidad (89,5 %).

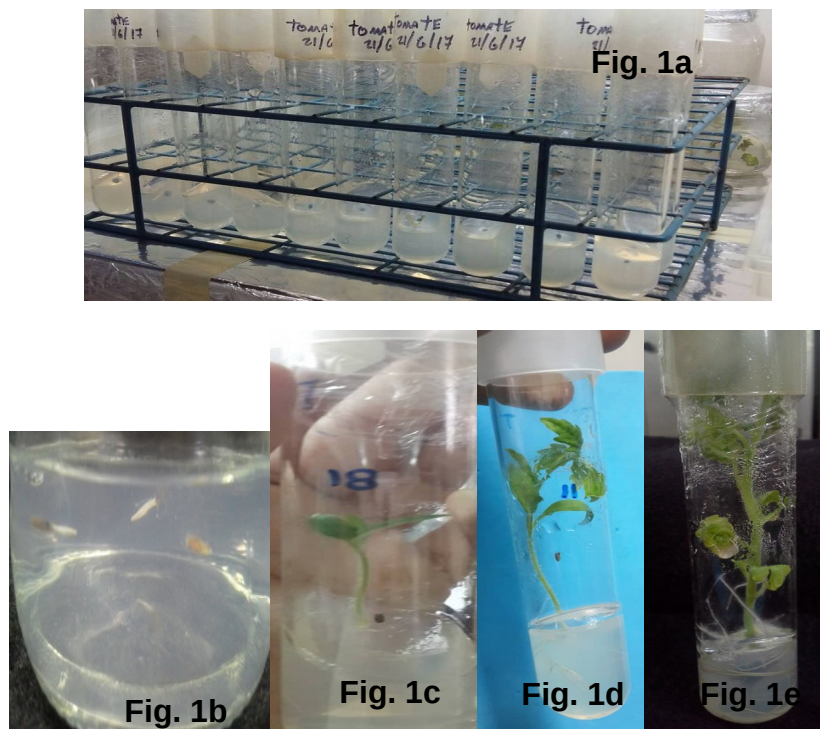


Figura #1. Etapa de germinación de *Solanum lycopersicum*. Fig 1a: Semillas de *S. lycopersicum* colocadas en el medio de germinación (M0). Fig 1b: Inicio del proceso de germinación, puede apreciarse de la radícula emergiendo (4-7 días). Fig 1c: Planta de tomate después de los 7 días de la germinación (3cm de altura). Fig 1d: Planta de tomate después de los 15 días de la germinación (6cm de altura). Fig 1e: Planta de tomate después de 1 mes de la germinación (10,21cm de altura), se puede observar un buen desarrollo de las raíces.

5.2 Multiplicación a partir de microesquejes de *S. lycopersicum*

Una vez sembrados estos microesquejes (explantes) en los medios de cultivo descritos en la tabla #1 se obtuvieron los siguientes resultados:

En el **medio M0**, transcurridos 15 días, se observó un 30,77 % de explantes respondiendo hacia el desarrollo de brotes, alcanzando longitudes promedio de 7,5 cm. No hubo inducción de brotes de *novo* y se observó la presencia de numerosas raíces (>10). Al cabo de cuatro semanas las plantas desarrolladas en este medio de cultivo, alcanzaron un promedio de 15 cm de altura. Se apreció oxidación en un 69,23 % de los explantes.

En el **medio M1**, se observaron cambios morfológicos en los explantes a partir de los quince (15) días, observándose la formación de brotes en 50 % de los explantes sembrados. También se observó la formación de un callo de color marrón claro y de apariencia compacta en la base del 100 % de los explantes. En un lapso de seis semanas de cultivo, se obtuvo un 80,77 % de inducción brotes y raíces a partir de los callos formados en la base de los explantes, con un promedio de 3,46 brotes/explante, alcanzando una altura promedio de 1,25 cm.

En el **medio M2**, al igual que en el medio M1, a los quince (15) días se empezó a observar la formación de brotes y callo en los explantes cultivados. En este medio, al cabo de seis semanas, se observó la formación de callo en el 100 % de los explantes cultivados, a partir de los cuales en un 56,25 % hubo inducción de brotes de *novo* y raíces, obteniendo un promedio de 1,25

brotos/explante. En este caso, como es de notar, la inducción de brotes/explante en promedio fue menor en comparación al medio M1, sin embargo, hubo un mayor crecimiento longitudinal de los brotes, alcanzando una altura de 3,8 cm en promedio.

En el **medio M3**, a los 15 días no se observó el desarrollo de la yema preexistente ni de brotes de *novo*, por el contrario, hubo inducción de callo en el 100 % de los microesquejes cultivados. También, se apreció la neo-formación de raíces a partir de dichos callos. Transcurridas 4 semanas no se observaron grandes diferencias morfoanatómicas. Si bien, hubo un aumento en el tamaño de los callos y en el número de raíces, no hubo brotación de la yema preexistente ni alargamiento de los microesquejes, ni desarrollo de brotes de *novo*. Sin embargo, las raíces formadas en este medio de cultivo en su mayoría fueron bastante engrosadas, en contraste de las raíces mas delgadas que se formaron en los otros medios de cultivo en las diferentes etapas de la propagación *in vitro* . Luego de seis semanas, se observó el desarrollo de la yema preexistente en el 20,83 % de los microesquejes cultivados, alcanzando un promedio en la longitud de las plantas de 5,5 cm.

Tabla #3. Efecto de los reguladores de crecimiento en el proceso de multiplicación de *S. lycopersicum* a partir de microesquejes.

Medio de cultivo	Explantos que formaron callo (%)	Explantos que formaron callo + brotes <i>de novo</i> (%)	$\bar{X}$ de longitud de plantas (cm)	$\bar{X}$ de brotes / explante	Explantos con oxidación (%)
M0	0	0	15 ± 5,68	0 ^c	69,23
M1	100	80,77	1,25 ± 1,3	3,46±3,12 ^a	0
M2	100	56,25	3,8 ± 1.93	1,25±1,48 ^b	0
M3	100	0	5,5 ± 1,8	0 ^c	0

Valores con distintas letras en la misma columna indica diferencias significativas según ANOVA de clasificación simple para $p < 0,05$

Es interesante notar que los problemas de oxidación se apreciaron solo en los explantes cultivados en medio M0 y no así en los explantes cultivados en medios M1, M2 y M3, los cuales se diferenciaban con el M0, que este medio estaba usentado de reguladores de crecimiento.

En general, la oxidación en los explantes cultivados *in vitro*, puede estar influenciada por el genotipo, el tamaño, tipo y edad del explante, los cortes realizados en el explante, composición del medio de cultivo, el tiempo y el tipo de agente usado en la desinfección (Abdelwahd y col., 2008, Azofeifa, 2009). También el sellado del recipiente, ya que esto puede generar que el intercambio gaseoso externo no sea el óptimo y ocurra la acumulación de CO₂ y etileno (Olmos y col., 2010., Radice, 2010).

En esta etapa, comparando los resultados obtenidos en el medio M0 (sin sustancias de crecimiento) con los obtenidos en los medios M1 y M2, en estos últimos se favoreció al mismo tiempo, la multiplicación *in vitro* de *S. lycopersicum*. Ya que fue posible el desarrollo de la yema preexistente, y la producción de brotes de *novo* aparentemente por vía indirecta a partir de callo.

Estos resultados sugieren además, que para que ocurra una formación de callo y una inducción de brotes y raíces a partir de callo, es necesario suplementar de manera exógena una proporción adecuada de auxinas/citocininas, ya que, estas regulan la morfogénesis en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Taiz y col, 2006), igualmente, el medio MS provee los seis nutrientes principales (N, K, P, Ca, Mg, S) y constituye uno de los factores claves en la morfogénesis *in vitro* (Ramage y Williams, 2002).

Evaluando el efecto de los reguladores de crecimiento, se encontró que existen diferencias significativas en la respuesta de los brotes para los distintos medios, resultando que la mejor combinación fue la de BA/AIA ($p=9,6E^{-10}$, $p<0,05$) para la multiplicación de plantas de *S. lycopersicum* vía organogénesis indirecta. Otros investigadores en sus estudios también observaron en que la mejor combinación hormonal para la multiplicación *in vitro* de *S. lycopersicum* fue la de BA/AIA. Un ejemplo de ellos, es el trabajo realizado por Bahurepe y col (2013), aunque las concentraciones utilizadas durante su ensayo eran diferentes, estos investigadores encontraron que la mejor combinación hormonal para la formación de brotes y raíces era la conformada por BA/AIA, sin embargo, a diferencia del presente trabajo, ellos obtuvieron en su estudio 4,90 y 4,33 brotes/explante a partir de hipocotilo y de microesquejes respectivamente. En su estudio, también encontraron que en el 100% de los explantes sembrados hubo formación de callo cuando estos estaban suplementados con hormonas. Otro estudio que apoya estos resultados es el de Hussain y

col. en el 2014, encontrando que la mayor frecuencia de inducción de callos (91,33 %) y la mayor frecuencia de inducción de brotes (96.66 %) se obtuvo en el medio MS suplementado con $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de IAA, $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BA.

Plana y colaboradores en el 2002, cultivaron segmentos apicales de hipocotilos y cotiledones de *S. lycopersicum*, y como medio de cultivo combinaron diferentes concentraciones de Biobras 6 (brasinoesteroides, sustancias que estimulan el crecimiento vegetal) con diferentes dosis de BA, alegando que el uso de esta combinación favoreció la formación de callo (0.7 y 70 %) y la frecuencia de inducción de brotes (1.57 y 1.68) a partir de hipocotilos y cotiledones respectivamente. En sus resultados encontraron que a medida que aumentaban las concentraciones de BA en el medio de cultivo obtuvieron un mayor porcentaje de explantes con formación de callo (14 y 100 %) y una menor frecuencia y eficiencia de inducción de brotes (1.09 y 0) a partir de hipocotilos y cotiledones respectivamente. Por lo tanto, con respecto al número de brotes/explantes, el presente trabajo se vio favorecido con el uso de las concentraciones y combinaciones de BA/AIA, ya que, se obtuvo 3,46 brotes/explante.

Por otra parte, Kurtz y Lineberger (1983), cultivaron secciones de hoja de varios cultivares de *S. lycopersicum*. Estos autores encontraron diferencias en la respuesta dependiendo del genotipo, puesto que de todos los genotipos probados, el cultivar Starfire resultó con el más alto promedio de brotes producidos, con dosis de 1 mgL^{-1} de AIA y 1 mgL^{-1} de BA con lo cual obtuvieron 14.5 brotes; mientras que con la misma dosis de auxina pero variando la concentración de BA a 2.5 mgL^{-1} fueron 19.3 los brotes producidos; y con la dosis más alta de BA (10 mgL^{-1}), la cantidad de brotes producidos se redujo drásticamente hasta 1.3. Estos resultados nos indican que, al igual que en nuestro estudio, el mayor número de brotes/explante se obtuvo utilizando la misma combinación de

reguladores de crecimiento (BA/AIA), empleando las mismas concentraciones, sin embargo, estos autores obtienen un mayor número de brotes/explante.

Según Olmos y col (2010), la etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. En la primera fase se requiere el empleo de elevadas concentraciones de reguladores de crecimiento (generalmente citocininas) para favorecer la desdiferenciación. La segunda etapa requiere de un balance hormonal adecuado para favorecer procesos de diferenciación y multiplicación celular. Lo que quiere decir, que en este tipo de procesos es mas dependiente de reguladores del tipo citocininas. Sin embargo, siempre debe tomarse en cuenta la presencia de cierta concentración endógena adecuada de auxinas, para lograr el balance estimulador.

En los cultivos *in vitro*, la inducción de órganos por efecto de las citocininas (BA), está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción de citocinina alta con respecto a la auxina. De otro lado, el AIA es una auxina que interviene en el alargamiento y la división celular, estimulando la formación de raíces. En ausencia de citocininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Pero, en presencia de la BA, el efecto que se obtiene por la presencia de la auxina, es una división celular mediada por la citocinina (Espinosa y col, 2005). En este experimento, la combinación de estos reguladores de crecimiento estimularon tanto la división como la elongación celular, obteniéndose la formación de yemas y la diferenciación de brotes, a partir de microesquejes.

Es importante considerar que una respuesta organogénica también depende de factores como: la selección del explante adecuado, la elección apropiada del medio y el control de las condiciones

físicas (Thorpe, 1980). Tran Thanh Van (1980), sugiere que los factores externos representados principalmente por la adición de las auxinas, citoquininas, así como los carbohidratos y la luz son factores importantes que parecen influenciar en la organogénesis. Del mismo modo, este investigador expone que existen factores inherentes que pueden influenciar en la respuesta organogénica, enfatizando que, la determinación genética, el estado fisiológico de la planta madre y los tratamientos físicos aplicados al explante deben tomarse en consideración durante los estudios de la regulación de la organogénesis. Lo que explica una vez mas, que la inducción de callo y formación de brotes es debido principalmente a la presencia de cierto nivel endógeno de hormonas en el material vegetal utilizado, lo que permitió una desdiferenciación y proliferación celular (Villalobos y Arias, 1987) .

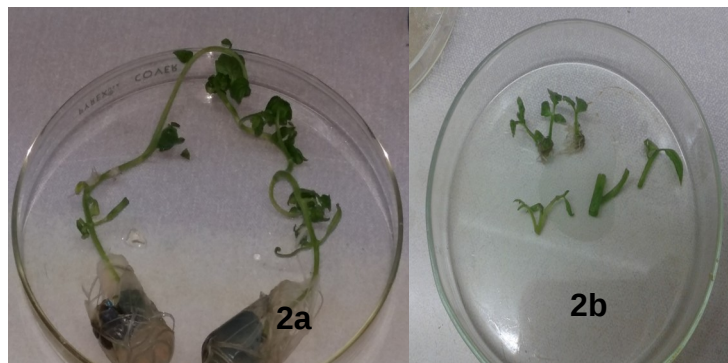


Figura #2. Inicio de la etapa de multiplicación a partir de microesquejes de *S. lycopersicum*. Fig 2a: Plantas de *S. lycopersicum* (tomate) obtenidas durante la etapa de germinación. Fig 2b: Microesquejes aislados de plantas obtenidas *in vitro* para ser sembrados en los medios de cultivo M0, M1, M2, M3

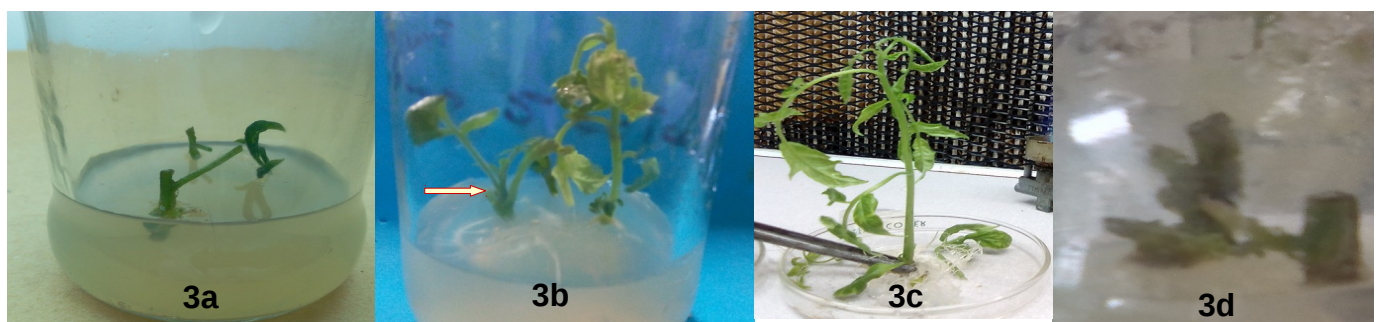


Figura #3. Microesquejes cultivados en el medio M0 durante la etapa de multiplicación de *S. lycopersicum*. Fig 3 a: Microesquejes sembrados en medio MS sin hormonas. Fig 3b: Desarrollo de la yema preexistente en los explantes a los 15 días. Fig 3c: Planta de tomate desarrollada a partir de microesquejes luego de un mes. Fig 3d: Explantes presentando oxidación u oscurecimiento a los 15 días de cultivo.

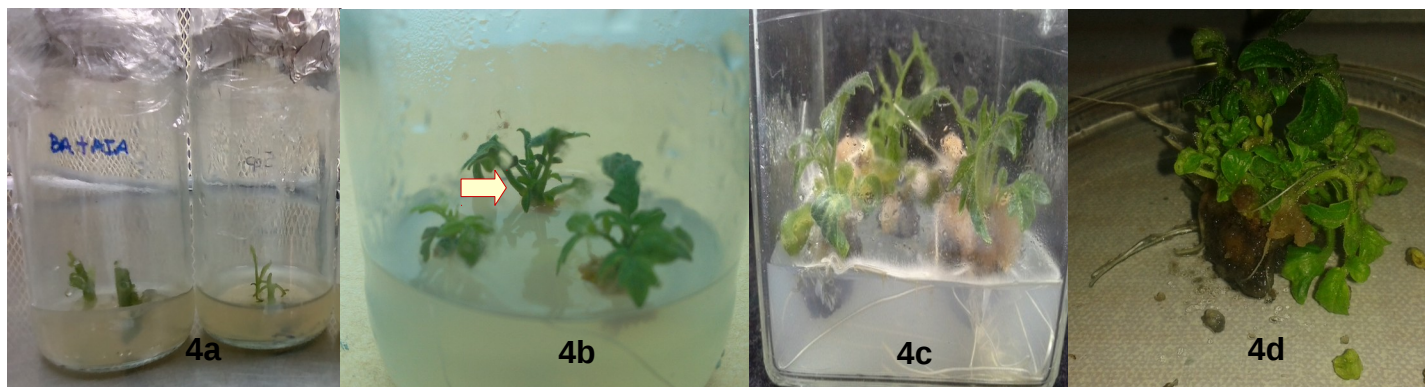


Figura #4. Microesquejes cultivados en el medio M1 durante la etapa de multiplicación de *S. lycopersicum*. Fig 4a: Microesquejes cultivados en el medio M1 (1mgL^{-1} AIA + $2,5\text{mgL}^{-1}$ de BA). Fig 4b: Se observan brotes de 1,25 cm en promedio desarrollados en 15 días, se puede apreciar raíces y la formación de un callo en la base de los tallos. Fig 4c: En esta figura se muestran brotes después de un mes de cultivo, apreciándose también, un mayor número de raíces y callos de mayor tamaño. Fig 4d: En esta figura puede observarse un grupo de brotes, formados aparentemente a partir de callo (organogénesis).

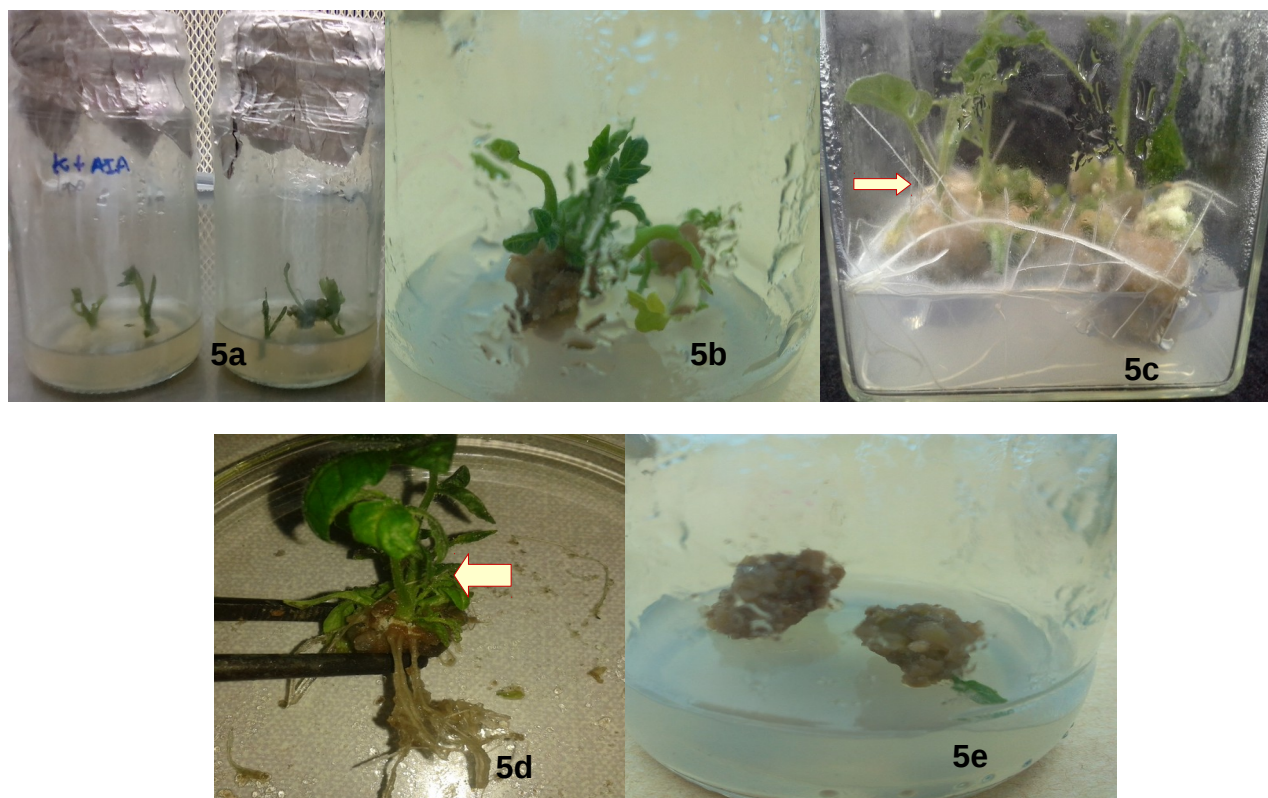


Figura #5. Microesquejes cultivados en el medio M2 durante la etapa de multiplicación de *S. lycopersicum*. Fig 5a: Microesquejes cultivados en el medio M2 (1mgL^{-1} AIA + $2,5\text{mgL}^{-1}$ de K). Fig 5b: Se muestran brotes a los 15 días de cultivo, se puede apreciar la formación de callo en la base. Fig 5c: Al mes de cultivo se observan callos de mayor tamaño en la base de los brotes. También se observa la formación a partir del callo de pequeños brotes y raíces. Fig 5d: Se puede apreciar un detalle de las raíces y brotes formados a partir de callo. Fig 5e: Se muestran callos aparentemente no morfogénicos.

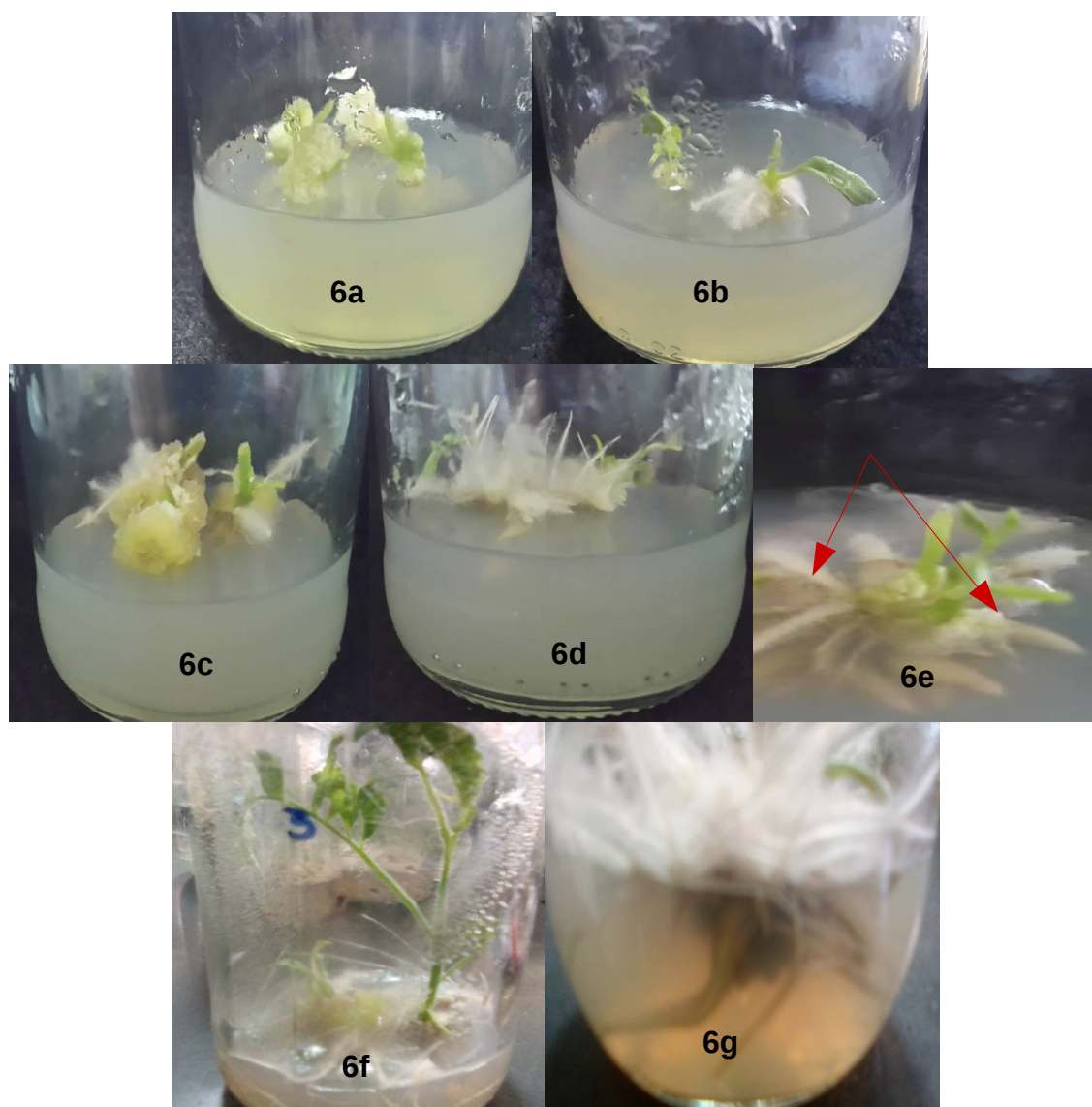


Figura #6. Microesquejes cultivados en el medio M3 ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA) durante la etapa de multiplicación de *S. lycopersicum*. Fig 6 a: Se observa presencia de callo en la base de los microesquejes sembrados y la formación de pequeñas raíces con pelos radicales (Fig 6b) a los 15 días de cultivo. En las figuras 6c, 6d, 6e se observa un aumento en el tamaño de los callos y un aumento en el número y en la longitud de las raíces producidas al mes de cultivo. Particularmente en la figura 6e: se observa la formación de raíces cortas y muy engrosadas. Fig 6f: Desarrollo de la yema preexistente al mes y medio de cultivo. Figura 6g: Raíces engrosadas desarrolladas al mes y medio de cultivo.

Caracterización histológica de la respuesta morfogénica

Los estudios anatómicos confirmaron la naturaleza organogénica de los callos formados en el medio M1 y M2. En los callos formados en el medio M1, se puede observar a través de cortes transversales, células típicas de callos organogénicos, la formación de meristemoides o agrupación de células en división y el desarrollo de los brotes a partir de los meristemoides (Fig 7a). En un corte longitudinal de callo, se observa la conexión vascular entre un tallo preexistente y la raíz a partir de las células del callo (Fig 7b). En los callos formados en el medio M2, a partir de cortes transversales, no se observa la formación de yemas, sin embargo, se observaron meristemoides, lo que indica la futura formación de primordios vegetativos (Torrey, 1966). No obstante, en cortes de otros callos formados en el mismo medio (M2), no se observaron meristemoides ni yemas, lo que nos indica que también se formaron callos no morfogénicos, observándose la presencia células parenquimatosas de callo y de vasos xilemáticos a partir de cortes longitudinal.

Khaliluev y col (2014), estudiaron la influencia del genotipo, tipo de explante y componente del medio de cultivo en la inducción de callos y regeneración de brotes de tomate, usando como explantes cotiledones e hipocotilos. En sus estudios anatómicos obtuvieron resultados similares a esta investigación, ya que en los callos formados en medio MS suplementado con AIA/Zeatina, observaron la formación de meristemoides, sugiriendo que estaban en presencia de un callo organogénico.

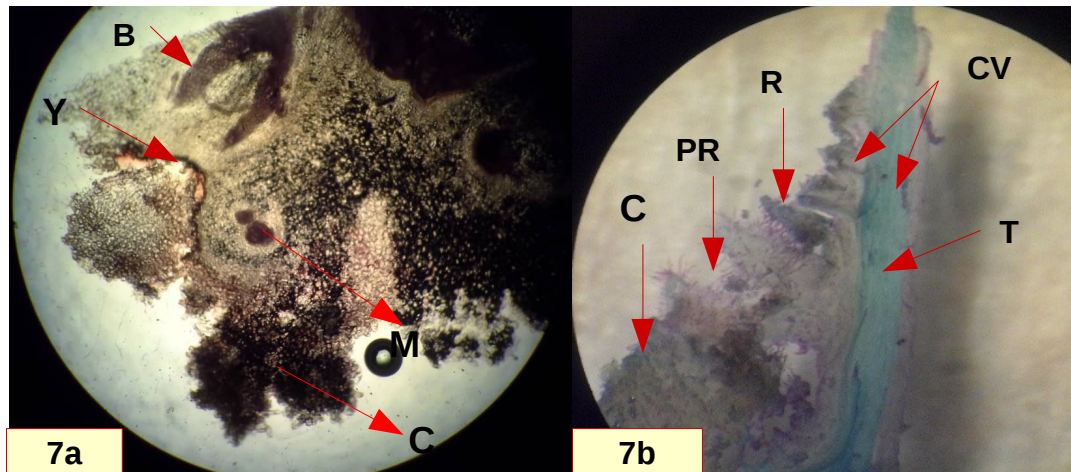


Figura #7. Caracterización histológica de callos formados en medios de multiplicación. Fig 7 a: Corte transversal de callo organogénico mostrando la formación de brotes (B), yema (Y) y meristemoides (M). Además, se observan las células del callo (C) (100X). Fig 7b: Corte longitudinal de callo organogénico en donde se observan las raíces (R), los pelos radicales (PR), el tallo (T), desde el callo (C), observándose también, la conexión vascular entre el tallo y la raíz (100X).

5.3 Elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*

La formación de raíces *in vitro* se apreció en los medios usados para el establecimiento y multiplicación a partir de microesquejes, por lo cual no fue necesario la implementación de medios especiales para el enraizamiento *in vitro* de las plantas. Por lo tanto, a fin de promover la elongación y cierto endurecimiento de las plantas para ser transferidas a la etapa de aclimatación, los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación, fueron aislados y posteriormente colocados en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

En esta etapa, durante el primer periodo de siembra, se observó que a partir de los brotes sembrados se indujo nuevamente la formación de callo, no obstante, los callos formados eran de menor tamaño en relación a los obtenidos en la etapa de multiplicación, observándose en el 100 % de los explantes cultivados la presencia de callo. Así mismo, a partir de estos callos se observó la inducción de brotes (2,92 en promedio) y la elongación de los mismos, alcanzando un promedio de 3,67 cm luego de un mes de observación. También y de gran importancia en esta etapa, se observó la presencia de numerosas (> 10) y alargadas raíces (10,63 cm en promedio).

En un segundo periodo de siembra provenientes de las plantas del primer subcultivo, se seguía observando la formación de callo en la base de los microesquejes cultivados, aunque la frecuencia de formación de callo fue menor (76,92 %). También, se observó un aumento en el promedio de longitud de brotes (9,25 cm) al cabo de un mes. En esta etapa, ya no se observó la proliferación de brotes, sino se observó el desarrollo de los ya cultivados.

En un tercer periodo de siembra del mismo lote de plantas, ya no se observaron callos en la base de los microesquejes cultivados, ni formación de mas brotes,. En este ciclo de siembra, sólo se observó el desarrollo progresivo de las plantas a medida que transcurría el tiempo, alcanzando un promedio de 13 cm después de un mes. Lo que nos permite deducir, que con el número de subcultivos, en un medio sin hormonas disminuye la formación de callo. En la tabla #4 se muestran los parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de enraizamiento.

Ahora bien, refiriéndonos al aspecto cualitativo evaluado durante esta etapa y las anteriores, pudimos observar durante todo el trabajo, que las plantas eran de color verde, el tallo se observó de porte erecto y en los entrenudos se pudo observar la presencia de yemas axilares o también llamados chupones. Las hojas son compuestas, pecioladas y con borde dentado y se encontraban dispuestas en el tallo alternadamente. Se observó la presencia de una raíz principal, raíces secundarias y en algunas raíces se observó la presencia de pelos radicales.

Durante esta etapa de elongación y enraizamiento se presentó un 30 % de hiperhidricidad en tallos y engrosamiento de las hojas en los explantes cultivados.

Tabla #4. Parámetros cuantitativos evaluados durante la etapa de elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*.

Periodo de subcultivo	Explantos que formaron callo (%)	Explantos que formaron callo + inducción de brotes (%)	$\bar{X}$ longitud de plantas (cm)	$\bar{X}$ de brotes <i>de novo</i> / explante	$\bar{X}$ de microesqueje des/planta	$\bar{X}$ de long de raíces
1 ^{er} subcultivo	100	76,47	3,67 $\pm$ 2,18	2,92 $\pm$ 1,2	0	10,63 $\pm$ 4,19
2 ^{do} subcultivo	76,92	76,92	9,25 $\pm$ 5,33	0	4,5 $\pm$ 1,76	11 $\pm$ 2,04
3 ^{er} subcultivo	0	0	13 $\pm$ 1,15	0	3,9 $\pm$ 1,57	10,75 $\pm$ 5,56

La formación de callo y a partir del mismo la formación de brotes y raíces en un medio sin reguladores de crecimiento en el primer subcultivo podría explicar dos cosas, una de ellas es que los explantes estaban inducidos a partir de los medios de multiplicación y otra es que de manera endógena los explantes tenían un alto nivel hormonal. También se observó que al igual que otros autores, se obtuvo un 100 % de plantas elongadas y enraizadas en el medio de cultivo MS completo, con 3 % de sacarosa y sin sustancias de crecimiento (Ambriz, 1995; Bahurepe y col, 2013; Hussain y col. en el 2014)

Ámbriz (1995), para la etapa de enraizamiento de plantas de *S. lycopersicum*; probó un medio MS completo y un medio MS al 50 %, obteniendo el mayor porcentaje de plantas enraizadas (78,9 %) cuando utilizó un medio MS al 100 % sin hormonas.

Cruz y col. (2003), cultivaron los brotes de plantas de *S. lycopersicum* obtenidos, en cuatro medios de elongación/enraizamiento, que variaron en la concentración de las sales MS (0.5X o 1X)

y sacarosa (1.5 o 3 %). Los medios de elongación/enraizamiento MS 0.5X, 1,5% de sacarosa y MS 1X, 3 % de sacarosa, presentaron el mayor porcentaje de plántulas aptas para el suelo (80 %).

En esta investigación se obtuvo un 30 % de plantas con hiperhidricidad, lo cual es un proceso morfogénico anormal con cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos que generan tallos u hojas engrosadas con aspecto vidrioso. Este fenómeno está regulado por dos factores claves que son la humedad relativa y el potencial hídrico, y afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales: la fotosíntesis y la transpiración (Olmos y col., 2010). Entre los factores que causan hiperhidricidad están: la desinfección y corte del explante, que además puede variar con la especie, cultivar y genotipo, la consistencia del medio del cultivo, tipo y concentración del agente gelificante, sales minerales, etc (Vélez-Mora, 2015). Debido a la deficiencia metabólica, las plantas se vuelven heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático y a cambios estructurales en las paredes celulares (Olmos y col., 2010).



Figura #9. Etapa de elongación y enraizamiento de *S. lycopersicum*. Fig 9 a: Planta de tomate con presencia de brotes y callo en la base, durante el primer subcultivo. Fig 9b: Planta de tomate con presencia de callo de menor tamaño en la base, durante el segundo subcultivo. Fig 9c: Planta de tomate sin presencia de callo en la base, durante el tercer subcultivo. Fig 9d: Se observa la formación de numerosas y alargadas raíces durante los subcultivos realizados. Fig 9e: Hoja de tomate (presentando de 5 a 9 folíolos al mes y medio de cultivo). Fig 9f y 9g: Hiperhidricidad (H) presente en tallo y hojas (30 %)

5.4 Aclimatación

Una vez mantenidas por dos meses en la etapa de elongación y enraizamiento, 17 plantas de aproximadamente 12 cm promedio de altura, fueron trasladadas a la etapa de aclimatación. Al inicio de esta última etapa de la micropropagación, las plantas poseían, al menos morfológicamente, las características adecuadas para ser trasplantadas a tierra, es decir, poseían un tallo de porte erecto, hojas verdes, numerosas raíces aparentemente funcionales, tenían en promedio de 12 cm de longitud, siendo estas características o variables indicadoras de un alto nivel de vigor de las plantas, lo que supone un indicativo en la supervivencia de las plantas en el ambiente *ex vitro* (Montes y Col, 2016).

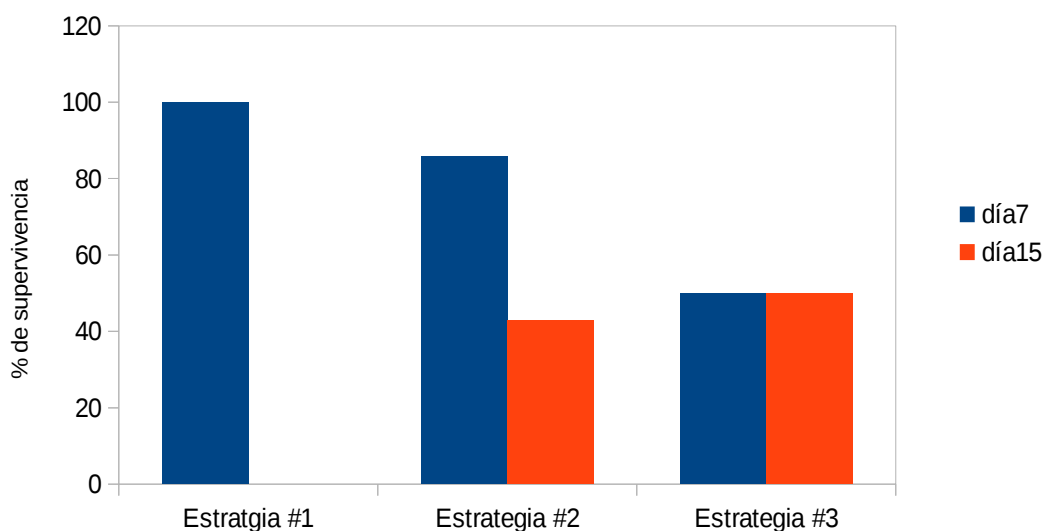
Para aclimatar las plantas al ambiente *ex vitro*, se realizaron varias estrategias:

Estrategia #1: Se logró obtener un 100 % de supervivencia de las plantas a los 7 días y un 0 % de supervivencia de las plantas a los 15 días.

Estrategia #2: Con esta metodología se obtuvo un 85,71 % de supervivencia de las plantas a los 7 días, sin embargo, se comenzó a notar el marchitamiento y decoloración de algunas hojas, y necrosis en raíces adventicias. Posteriormente las tapas de los envases fueron removidas, lo que resultó en un 57,15 % de mortalidad de las plantas a los 15 días. En el 42,85 % de las plantas restantes, los tallos aún se observaban erectos, resaltando que estos tallos eran los que al menos visualmente, tenían mayor diámetro en comparación al resto, sin embargo, hubo pérdida de coloración en los mismos, y las hojas estaban completamente marchitas.

Estrategia #3: Por último, con esta metodología, se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 50 % a los 7 días. A los 15 días el mismo 50 % que mostró supervivencia, presentaban el tallo erecto pero mostrando pérdidas en la coloración, y las hojas estaban completamente marchitas.

Porcentaje supervivencia de *S. lycopersicum* según la estrategia de aclimatación



Gráfica #1. Porcentaje de supervivencia de *S. lycopersicum* según la estrategia de aclimatación estudiada. En la siguiente gráfica se puede observar como a los 7 días luego del trasplante hubo un alto porcentaje de supervivencia de las plantas de *S. lycopersicum* en todas las estrategias estudiadas. A los 15 días después del trasplante el porcentaje de supervivencia fue nulo empleando la estrategia #1; utilizando la estrategia #2, el porcentaje de supervivencia disminuyó un poco mas de la mitad; y empleando la estrategia #3, el porcentaje de supervivencia fue el mismo que a los 7 días después del trasplante.

En esta investigación con las diferentes estrategias empleadas en la etapa de aclimatación, se apreció un porcentaje muy bajo o nulo de supervivencia de las plantas de *S lycopersicum* L. Así tipo

de inconvenientes han sido asociados a muchas causas. En las plantas *in vitro* se producen anomalías fisiológicas, estructurales y anatómicas, tales como la ausencia de cutícula cerosa, estomas no funcionales, la ineficiencia de la fotosíntesis y el mal funcionamiento del transporte hídrico; estas anomalías son acentuadas como resultado de las tasas de evapotranspiración elevadas, ya que pasan de una condición semi o heterótrofa a autótrofa (Capellades, 1990), lo que limita la supervivencia de las plantas cuando son transferidas a un ambiente *ex vitro*.

Así mismo, el medio de cultivo contiene sacarosa como fuente principal de energía, el tiempo de los subcultivos, las bajas concentraciones CO₂, baja DFFF y la intensidad de luz, etc. El tipo de sustrato, áreas y espacios para la aclimatación. Las raíces que crecen en agar son defectuosas, carecen de pelos radicales y suelen necrosarse al trasplantar las plántulas, lo que provoca una parada en el crecimiento de la planta (Montes y Col, 2016).

Se ha reportado que las plantas cultivadas *in vitro* tienen una mala conductividad hídrica en las raíces, y que no hay conexiones adecuadas entre la raíz y el tallo. El mal transporte del agua, junto a una mala retención del agua en las hojas, puede llevar a que estas se sequen rápidamente (Montes y Col, 2016).

La persistencia de las hojas está también relacionada con la capacidad fotosintética y esta puede variar con las especies de plantas en cultivo y puede determinar la contribución *ex vitro* de hojas persistentes. Las plantas cultivadas pueden separarse en especies fotosintéticas no competentes y competentes. Algunos ejemplos de plantas que entran en el grupo no competente, están las hojas cultivadas de coliflor y fresa desarrolladas en cultivo *in vitro*, que pueden deteriorarse rápidamente después del trasplante (Grout y Aston, 1978; Grout y Millam, 1985). En base a esta información,

podemos inferir que las plantas de tomate obtenidas en esta investigación pudieran tener hojas características de especies fotosintéticas no competentes, ya que, se deterioraron luego de 15 días del trasplante.

Estos resultados difieren con los resultados expuestos por muchos autores, ya que, en la bibliografía consultada, se ha encontrado un alto porcentaje de supervivencia de las plantas de *S. lycopersicum* en la etapa de aclimatación.

Raymundo y col (2000), realizaron el trasplante de las *vitroplantas* de 3 cm de *S lycopersicum*, obtenidas por organogénesis a macetas con una mezcla perlita y suelo en una proporción 1:1, obteniendo un 100% de supervivencia.

Abraham y col (2003), obtuvieron un 100% de porcentaje de supervivencia de las *vitroplantas* de *S lycopersicum* bajo condiciones de invernadero, usando tierra estéril y controlando la humedad e intercambio gaseoso.

Osman y col (2010), transfirieron las plantas de *S lycopersicum* , propagadas y enraizadas *in vitro* a macetas de plástico que contenían como sustrato tierra estéril y arena en una proporción 2:1, cubiertas con una botella de vidrio para mantener la humedad, bajo condiciones de vivero. Al cabo de tres semanas, se le retiró la cubierta de vidrio. Lograron obtener un 95% de supervivencia de las plantas.

Carrillo y col (2016), obtuvieron un 96,6% de supervivencia de las plantas. Estos autores

sembraron las plantas luego de la etapa de enraizamiento en bandejas de germinación con turba canadiense, bajo condiciones de invernadero, con una reducción del 50% de la luminosidad, una temperatura de 25°C, y mas del 80% de humedad relativa.

Existen estrategias para lograr una aclimatación eficiente, y entre ellas está iniciar el proceso de aclimatación cuando las plantas aún se encuentran *in vitro*, en el cual, se sugiere elegir plantas con hojas grandes, ya que, estas pueden tener mayor cantidad de compuestos almacenados y contribuir más después del trasplante. El aumento de la concentración de azúcar en el medio podría maximizar el contenido de nutrientes, generando hojas mas persistentes (Grout y Millam, 1985; Desjardins y col, 1987). La inoculación temprana de plantas *in vitro* con un organismo simbiótico apropiado promete mejorar la supervivencia y el rendimiento de las plantas (Hazarika, 2006). En algunos casos se le adiciona ABA (ácido absícico) al sustrato inmediatamente después del trasplante a fin de evitar el “shock de trasplante” (Pospíšilová y col, 1999).



Figura #10. Etapa de aclimatación de *Solanum lycopersicum*. Fig 10 a: Morfología de plantas de *S. Lycopersicum* antes de ser transferidas a suelo. Fig 10b: Plantas de *S. lycopersicum* colocadas en envases de plástico que contienen tierra estéril y arena (1:1). Fig 10c: Plantas de tomate luego de 7 días del paso a tierra. Fig 10d: Plantas de tomate luego de 15 días del paso a tierra, aún con tallo erecto y con presencia de hojas marchitas y hojas amarillentas. Fig Plantas de tomate luego de 15 días del paso a tierra completamente marchitas.

5.5 Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

El análisis bioquímico, realizado en el presente estudio, consistió en la determinación del contenido de PF en las plantas obtenidas por germinación *in vitro* (control), las obtenidas a partir de microesquejes de plantas *in vitro* en fase de enraizamiento (FE) y las transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatación (FA). Las plantas en FE y en FA, empleadas para este análisis, fueron aquellas formadas o inducidas en el medio M1 (Debido a que en este medio se obtuvo el mayor número de brotes por explante). En el caso de las plantas en FA, las mediciones de contenido de PF se realizaron a los 7 días de estar expuestas a esas condiciones *ex vitro* debido a que estas no sobrevivieron mas de ese tiempo.

Tabla 5. Contenido de pigmentos fotosintéticos extraídos de plantas germinadas, y de plantas micropropagadas tanto mantenidas *in vitro* como transferidas a condiciones *ex vitro* de *S. lycopersicum*

Tratamiento	$\bar{X} Cl a$ (μg pigmento/masa fresca foliar)	$\bar{X} Cl b$ (μg pigmento/masa fresca foliar)	$\bar{X} Cl_{(a+b)}$ (μg pigmento/masa fresca foliar)	$\bar{X} Car_{(C+X)}$ (μg pigmento/masa fresca foliar)
Planta Madre (control)	520,6303 $\pm$ 117,0561 ^b	169,5866 $\pm$ 55,3508 ^b	697,8665 $\pm$ 142,0551 ^b	132,0987 $\pm$ 40,7468 ^b
Plantas F.E	846,101 $\pm$ 43,0657 ^a	307,7295 $\pm$ 20,2671 ^a	1270,935 $\pm$ 76,3330 ^a	203,2814 $\pm$ 11,4863 ^b
Plantas F.A	737,6172 $\pm$ 37,5618 ^b	326,5371 $\pm$ 26,8321 ^a	1038,436 $\pm$ 51,9512 ^b	303,8557 $\pm$ 14,2704 ^a

$\bar{x} \pm$ error estándar; valores con distintas letras en la misma columna indica diferencias significativas según ANOVA de clasificación simple para $p < 0,05$

Los valores del contenido de clorofilas *a* (*Cl a*) y *b* (*Cl b*) fueron significativamente mayores en las plantas en FE con respecto a las germinadas (control) y no hubo diferencias en el contenido de carotenoides (*Car*) para estos dos grupos de plantas (Tabla 5). Estos resultados sugieren que al

menos un factor en el medio M1 induce la síntesis de clorofilas y no influye en el contenido de *Car*. Considerando reportes previos, este fenómeno puede atribuirse a la presencia de citocinina (CK) (en este caso, BA 2,5 mg L⁻¹) y a la fuente de carbono (sacarosa) en dicho medio. Las CK intervienen en la formación de cloroplastos, promoviendo un mejor desarrollo del aparato fotosintético (síntesis de clorofilas y de enzimas que intervienen en la fijación del CO₂) (Prenkumar y col. 2001; Mok y Mok., 2001; Taiz y Zeiger, 2010). A su vez, la CK promueve la movilización de la sacarosa y otros nutrientes hacia la hoja y, una vez allí, podrían utilizarse en la síntesis de clorofila y otros componentes cloroplastidicos (Taiz y Zeiger, 2010; Ivanova y Van Staden, 2011).

Comparando las plantas en FE con respecto a aquellas en la fase de aclimatación *ex vitro* (FA), se encontró que aquellas en FE los valores del contenido de *Cl a* y clorofilas totales (*Cl a+b*) fueron significativamente mayores a los encontrados en las plantas en FA. Mientras que, los valores del contenido de *Car* fueron significativamente menores en las plantas en FE con respecto a aquellas en FA. Estos dos grupos de plantas no mostraron diferencias significativas en el contenido de *Cl b* (Tabla 5). Ello sugiere que las vitroplantas transferidas a condiciones *ex vitro*, al no estar expuestas a CK ni a fuente de carbono exógena, podrían realizar ajustes fisiológicos y bioquímicos que implican la disminución de *Cl a+b* (debido a la disminución significativa de *Cl a*) y un aumento en el contenido de *Car*.

La disminución o pérdida en la concentración de clorofilas totales en las plantas en etapa de aclimatación puede deberse a diversos factores. Según Mehar y col. (2013), la disminución en los niveles de clorofilas puede estar asociada a una reducción en la biosíntesis de estos pigmentos o a un incremento de su degradación. Otra razón que puede influir en el contenido de pigmentos está relacionada con un aumento de la actividad clorofilasa, que destruye estos pigmentos al separar el fitol del anillo tetrapirrólico en la molécula (Jamil y col, 2012). Así mismo, factores como la

temperatura, y los cambios en el intercambio gaseoso del ambiente *in vitro* al ambiente *ex vitro*, pueden influir en la estabilidad de los pigmentos, acelerando reacciones de degradación (Hazarika, 2006). Según González (2009), la reducción de la clorofila perjudica el proceso fotosintético conduciendo a una reducción en la fijación de carbono, de ahí la importancia de determinar el contenido en clorofilas de las plantas cuando las condiciones medioambientales no son óptimas.

En cuanto al contenido de *Car*, estos aumentan significativamente en las plantas al ser transferidas a condiciones *ex vitro*. Se presume que este aumento mejora el desempeño en aquellas funciones asociadas con la disipación del exceso de energía de las clorofilas excitadas y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Lawlor, 2001). Se conoce que el aumento en el contenido de pigmentos disipadores de exceso de energía ocurre en hojas sometidas a alta radiación. Sin embargo, no es el caso del presente estudio en el cual la DFFF en la FA fue menor al medido en la FE ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente). De modo que, podemos considerar que el aumento observado en el contenido de *Car* en la FA no es atribuible a la intensidad lumínica.

Los valores observados en el contenido de PF, de las vitroplantas transferidas a condiciones *ex vitro*, señalan que el aparato fotosintético de *S. lycopersicum* es sensible al cambio de ambiente. Sin embargo, desconocemos si estos valores de PF indican una aclimatación gradual de las plantas a la condición *ex vitro* o son respuestas iniciales al estrés provocado por la transferencia de las plantas al nuevo ambiente (periodo pre-aclimatacion). Para determinar si las plantas de *S. lycopersicum* están en periodo de pre-aclimatación o en periodo recuperación de su condición autotrófica es necesario realizar un seguimiento al contenido de PF en tiempos mayores a 15 días.

En el presente estudio, la no aclimatación de las vitroplantas de tomate, fue un impedimento para la determinación de la confiabilidad del contenido de PF como indicador de aclimatación *ex*

vitro. Para continuar con estos estudios, es prioritario lograr una aclimatación eficiente de las plantas micropropagadas. Según Wu y col. (2008), el contenido de clorofila en las hojas es un indicador confiable de la actividad fotosintética, de las mutaciones, del grado de estrés y del estado nutricional de las plantas. Por su parte, Carter y Spiering (2002), mencionan que las diferencias en el contenido de clorofilas en las hojas puede ser un índice del vigor de la planta y de su capacidad fotosintética, la cual depende en gran medida de contenido de pigmentos.

El mayor contenido de clorofilas en las plantas *in vitro* de tomate con respecto a las transferidas *ex vitro* coincide con resultados previos. Prenkumar y col (2001) obtuvieron altos contenidos de clorofilas en plantas *in vitro*, con respecto a las *ex vitro* en plantas de *Persea americana* y *Quercus ruber*. Villalobo y col (2012), estudiaron los cambios morfo-fisiológicos en plántulas de piña durante la aclimatación. Estos autores después de la transferencia de las plántulas a la condición de aclimatación, igualmente observaron una disminución aunque no significativa en la clorofila a y b durante los primeros 15 días y continuó disminuyendo hasta 45 días (8.1 y 3.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente). Según estos autores, una mayor concentración de clorofila se asocia con una mayor inversión de la planta en el complejo de recolección de luz del fotosistema II y los pigmentos de la antena. Fila (2006), registro altos contenidos de clorofila en el crecimiento de plántulas en condiciones *in vitro* en comparación con aclimatación *ex vitro*.

Aragón y col (2012), evaluaron parámetros morfológicos, físicos y bioquímicos en plantas de piña con características similares al ambiente *in vitro* (con metabolismo C3) y plantas de piña adultas con características de un ambiente *ex vitro* (con metabolismo CAM), hallando en sus resultados, un mayor contenido de clorofilas totales en plantas de piña con características típicas de un ambiente *in vitro* a comparación de las plantas en condiciones *ex vitro*.

Sin embargo, estos resultados difieren con los reportados por Pospilova y col(1999), quienes recopilaron información sobre aclimatación de plantas micropropagadas al ambiente *ex vitro*, encontrando como resultado que los contenidos de *Cl a* aumentan después del trasplante en Plantas de *Nicotiana tabacum*.

Grout y Aston, (1977) encontraron igualmente que las plántulas de coliflor regeneradas *in vitro*, también tuvieron menor contenido de clorofila que las plántulas transferidas después 4 semanas a un invernadero.

Igualmente, Jeon y col (2004), en su estudio sobre Pigmentos fotosintéticos, morfología e intercambio de gases foliares durante la aclimatación *ex vitro* de plántulas de *Doritaenopsis* CAM micropropagadas en condiciones de humedad relativa y temperatura del aire, hallaron que el contenido de clorofila aumentó al aumentar la humedad y a 15 y 35 ° C el contenido de clorofila disminuyó en comparación con 25 ° C.

En otros estudios, en el cual han evaluado el contenido de clorofila en plantas de *S. lycopersicum* desarrolladas en condiciones *ex vitro*, se han reportaron los siguientes resultados. En el trabajo de Vázquez y col (2012), evaluaron el comportamiento de plantas de tomate asperjadas con ácido salicílico (AS) cultivadas bajo diferentes condiciones climáticas en invernadero, encontrando que hubo un efecto sobre las variables climáticas (CO₂ y temperatura) y las diferentes concentraciones de AS aplicados sobre el contenido de clorofila. Siendo el tratamiento control (CO₂ bajo, temperatura ambiente, y sin AS) el único que mostró diferencias significativas con respecto al resto; este tratamiento registró el menor contenido de clorofila totales (32,80 µg.cm⁻¹). Sin embargo, estos resultados no son comparables con los obtenidos en este estudio, debido a que la estandarización utilizada para reportar el contenido de clorofila es completamente diferente (µg.g⁻¹).

Serna y col (2011), determinaron el contenido de *Cl b* en plantas de tomate desarrolladas en ambiente *ex vitro*, encontrando una concentración de *Cl b* de 0.5170 mg.g⁻¹ en plantas de 116 días de edad. Si bien es cierto que la extracción de la clorofila se realizó en tiempos distintos, comparando los resultados del contenido *Cl b* obtenidos en plantas en fase de aclimatación durante el presente estudio, estos fueron menores (326,53 µg.g⁻¹) a los obtenidos por Serna y col.

6. CONCLUSIONES

- El protocolo de desinfección utilizado en las semillas *Solanum lycopersicum* resultó ser el adecuado, permitiendo obtener un 98,3% de semillas asépticas.
- Para la germinación *in vitro* de semillas de *S. lycopersicum* no fue necesario añadir sustancias de crecimiento al medio de cultivo, obteniéndose un 70,55% de semillas germinadas en un lapso de 4 a 7 días.
- En esta investigación se logró establecer un método de propagación *in vitro* *S. lycopersicum* a partir de semillas y microesquejes, siendo el mejor tratamiento para la multiplicación el medio MS suplementado con 1 mg/L de AIA + 2,5 mg/L de BA, obteniendo 3,46 brotes/explante.
- Aunque se observó desarrollo de yemas en medios sin sustancias de crecimiento, para que ocurra la multiplicación de brotes en *S. lycopersicum* es necesario suplementar el medio de cultivo con sustancias de crecimiento.
- Evidencias histológicas demostraron que los callos obtenidos en la etapa de multiplicación de *S. lycopersicum*, en los medios M1 y M2 eran de naturaleza organogénica, es decir, el proceso de multiplicación ocurrió vía organogénesis indirecta.
- Las estrategias empleadas para la aclimatación plantas de *S. lycopersicum* obtenidas *in vitro* no resultaron ser las adecuadas, lo que resultó en 0% de plantas aclimatadas al ambiente *ex vitro*.

- La no aclimatación de las vitroplantas de tomate, fue un impedimento para la determinación de la confiabilidad del contenido de pigmentos fotosintéticos como indicador de aclimatación *ex vitro*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abdelwahd, R., Hakamn., L., Abhilili, M., UduPa, S.** 2008. *Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in vitro plantlet regeneration of faba bean.* African Journal of Biotechnology 7:997-1002.
2. **Ámbriz Gutierrez, Josefa.** 1995. *Micropropagación de brotes de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) a partir de plántulas germinadas in vitro* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
3. **Arangón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amancio, S.** 2012. *The physiology of ex vitro pineapple (Ananas comosus L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions.* Laboratorio de Células y Cultivo Tejidos, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. Instituto Superior de Agronomía, Universidad Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal e-mail: samport@isa.utl.pt.
4. **Ariguita, L., Gonzalez, A., Sánchez, R.** 1999. *Aclimatación negativa en Rubisco frente a enriquecimiento en CO₂.* Laboratorio de Fisiología Vegetal. Dpto B.O.S. Fac. Biología C/cat Rodrigo Uria s/n. 33071. Oviedo.
5. **Azofeifa, A.** 2009. *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro.* Agronomía Mesoamericana 20(1): 153-175. 2009 issn: 1021-7444
6. **Bahurepe, J. V., Patil, S. C., Pawar, B. D., Chimote, V. P. y Kale, A.** 2013. *Callus induction and plantlet regeneration in tomato (Solanum lycopersum L.)* State Level Biotechnology Center, Mahatma Phule Krishi Vidyapeeth, Rahuri-413 722, Maharashtra.
7. **Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R.** 2002. *Fisiología Vegetal.* Editorial Félix Varela, La Habana
8. **Botero, C., Restrepo, C., Urrea, A.** 2011. *Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo in vitro y aislamiento de protoplastos.* Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A.

1226. Medellín (Antioquia), Colombia.
9. **Bray, E., Bailey-serres, J., Weretilnyk, E.** 2000. *Responses to abiotic stresses*. Biochemistry and molecular biology of plant Physiologists. Maryland, USA.
10. **Bruinsma, J.** 1963. *The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts*. Photochem and Photobiol. 2:241-249.
11. **Butenko, R.G.** 1999. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* (Biology of Higher Plant Cells in vitro and Biotechnology Based on Them). Moscow.
12. **Cáceres, A., Marcano, A. K., Smits, G., Blanco, H., Cáceres, K., Oropeza, M., Vargas, T.E.** 2015. *Guía de prácticas*. Laboratorio de fisiología I (Vegetal). Dto. de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
13. **Calderón B., Ximena V.** (1982). *Investigaciones anatómicas y morfológicas en cultivos "in vitro" e hipocotilo y hojas jóvenes de tomate (Lycopersicon esculentum Mill. Var. Roma V.F.)*. Trabajo de Grado para obtener el título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias,UCV.
14. **Cambrón, V., Herrerías, Y., España, M., Sáenz, C., Sánchez, N., y Vargas, J.** 2011. *Producción de clorofila en Pinus pseudostrobus en etapas juveniles bajo diferentes ambientes de desarrollo*. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 17 (2): 253-260.
15. **Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., Debergh, P.** 1990. Environment Influences Anatomy of Stomata and Epidermal Cells in Tissue-cultured Rosa multiflora. J. AMER. Soc. HORT SCI.
16. **Carrillo, H., Insuasti, K., Delgado, W.** (2016). *Regeneración in vitro de plantas de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de

Nariño, Pasto (Colombia).

17. **Carter, A.G. y Spiering, B.A.** 2002. *Optical properties of intact leaves forestimating chlorophyll concentration*. J. Environ Qual 31:1424-1432.
18. **Casierra-Posada, F.** 2007. *Fotoinhibición: Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz*. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 1(1):114-123.
19. **CATIE.** 1990. *Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate*. Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
20. **Contreras, I., Almeida, J.** 2003. *Micropropagación del tomate de árbol (Cyphomandra betacea (Cav.) Sendtn.), solanaceae silvestre usada en la alimentación humana*. Laboratorio de Cultivos *in vitro* Centro de Ingeniería Genética. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Revista Forest. Venez. 47(2) 2003, 9-13
21. **Costán, C.** 2014. *Biofortificación con potasio en plantas de tomate cherry: Estudio de la producción y calidad de frutos en cosecha y postcosecha*. Tesis doctoral. Granada, España.
22. **Cruz, A., López, J., Reyes C., Lopez, M., y Valdez, A.** 2009. *Establecimiento de un sistema de micropropagación in vitro de tomate (Solanum lycopersicum CV. Micro-Tom)*. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Sinaloa; Programa Regional de Doctorado en Biotecnología, FCQB-UAS; CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa.
23. **Desjardins, Y., Gosselin, A., Yelle, S.** 1987. *Acclimatization of ex vitro strawberry plantlets in CO₂ enriched environments and supplementary lighting*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 112, 846–851.
24. **Durrani Najam-us-Sahar, Ahmad, D., Jalal, A., Rajab, H. and Khan, M. S.** 2017. *The effect of explant sources and growth regulators on callus induction and regeneration in different tomato cultivars*. The Journal of & Plant Sciences, 27(2): ISSN: 1018-708

25. **Escobar, Hugo y Lee Rebeca.** 2009. *Manual de producción de tomate bajo invernadero.* Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. Segunda edición.
26. **Espinosa, J., González, O., Hoyos, R., Afanador, L., Correa, G.** 2005. *Potencial de propagación in vitro para el tomate de árbol partenocárpico (Cyphomandra betacea Cav. (Sendt)).* Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779. Medellín, Colombia.
27. **FAOSTAT** (2017). Recuperado el 11 de julio de 2018 de Knoema Production Statistics-Crops, Crops Processed: <http://www.knoema.es>
28. **Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA).** 2016. *TOMATE ROJO* 2016. Panorama Agroalimentario. Dirección de investigación y Evaluación Económica y Sectorial.
29. **Fila, G.** 2006. *Relation between leaf conductance to CO₂ diffusion and photosynthesis in micropropagated grapevine plants, before and after ex vitro acclimatization.* Journal of Experimental Botany. Oxford, v.57, n.11, p.2687-2695.
30. **Gerszberg, A. Hnatuszco, K., Kowalczykt, T., kononowicz, A.** 2016. *Efficient in Vitro Callus Induction and Plant Regeneration Protocol for Differ.ent Polish Tomato Cultivars.* University of Lodz, Department of Genetics, Plant Molecular Biology and Biotechnology Banacha Street 12/16, 90-237 Lodz, Poland.
31. **Grout, B.W.W., Aston, M.J.** 1977a. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res. 17, 1–7.
32. **Grout, B.W.W., Millam, S.** 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot. 55, 129–131.
33. **González, A.** 2009. *Aplicación del medidor portátil de clorofila en programas de mejora de trigo y cebada.* Agroecología, 4: 111-116.

34. **Hallé, F., Oldeman, R., Tomlinson, P.** 1978. *Tropical trees and forest. An architectural analysis.* Berlin.
35. **Hazarika, B. N.** 2006. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants.* Biotechnology Laboratory, Division of Horticulture, ICAR Research Complex, Umiam 793 103, Meghalaya, India.
36. **Hernández R. G.** (2002). Libro Botánica Online. “*Fotosíntesis: Clorofila y pigmentos accesorios*”.
37. **Hussain S., A., Jan, S., Jalal-Ud-Din, y Ghulam M.** 2014. *Assessment of silver nitrate on callus induction y in vitro shoot regenation in tomato (Solamun lycopersicum Mill).* Plant Physiology Program, National Agricultural Research Centre (NARC) Islamabad-PakistanPak. J. Bot., 46(6): 2163-2172.
38. **Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.** 2005. *El cultivo de Hortalizas en Venezuela.* Maracay, Ven., 192 pág. (Serie Manuales de Cultivo INIA N° 2).
39. **Isaac, Elizabeth; González-Olmedo, J. L.; Rivas, Maribel; Moreno, A.** 2010. *Evaluación de la actividad fotosintética asociada con el intercambio gaseoso de dos variedades de Coffea arabica obtenidas por cultivo in vitro.* Cultivos Tropicales, vol. 31, núm. 2, pp. 74-76. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba.
40. **Ivanova, M., y J. Van Staden.** 2011. “*Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in Aloe polyphylla*”. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 104(1): 13-21.
41. **Jamil M, Bashir S, Anwar S, Bibi S, Bangash A, Ullah F, Shikrha. E.** 2012. *Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice.* Pakistan Journal of Botany 44 (1): 7-13
42. **Jeon Min-Wha, Ali Mohammad Babar, Hahn Eun-Joo, Paek Kee-Yoeup.** 2004. *Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during ex vitro acclimatization of micropropagated CAM Doritaenopsis plantlets under relative humidity and air*

- temperature. Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheong-ju 361-763, Republic of Korea.
43. **Jiménez, E.** 1998. *Generalidades del cultivo in vitro*. En: J. N. Pérez Ponce (de.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. pp. 13-24.
 44. **Kumar, S., Jindal S. K., Sarao, N. K. y Dhaliwal, M. S.** (2018). *Development of an efficient in vitro regeneration protocol in tomato (Solanum lycopersicum L.)*. Departamento de Ciencia Vegetal, Universidad Agrícola de Punjab, Ludhiana - 141 004, Punjab
 45. **Khaliluev, M. R., Bogoutdinova L. R., Baranovaa, G. B., Baranovaa, E. N., Kharchenkoa, P. N., y Dolgova, S. V.** 2014. *Influence of Genotype, Explant Type, and Component of Culture Medium on in vitro Callus Induction and Shoot Organogenesis of Tomato (Solanum lycopersicum L.)*. All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, ul. Timiryazevskaya 42, Moscow, 127550 Russia.
 46. **Kikorian, A.** 1991. *Propagación clonal in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones CIAT, Colombia, pp. 95-125
 47. **Kruglova, N.N., Sel'dimirova, O.A., y Zaitsev, D.Yu.** 2007. *Cytophysiological characteristics of different types of androcline wheat calli*, Fiziol. Biokhim. Kult. Rast. Vol. 39, pp. 42–50
 48. **Kurtz, S. M. and R.D. Lineberger.** 1983. *Genotypic Differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(5):710-714
 49. **Lallana, V.H. y Lallana Ma. del C.** 2003. *Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal* - Edición digital.
 50. **Lawlor, D.W.** 2001. *Photosynthesis*. 3th ed. BIOS Sci. Publishers, Oxford, GBR.
 51. **León Jorge.** 1968. *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales*. Lima, Perú. Editorial IICA.

52. **León Jorge. 2000.** *Botánica de los tejidos tropicales*. San José, Costa Rica. Editorial Agroamérica.
53. **Lozano J. A. (1997).** Ciencia y salud. “*La alimentación: Carotenoides para la salud*”.
54. **Martinez, M., Cardozo C., Salvador, M., Sánchez M. 2010.** *Respuesta fisiológica de semillas de tomate (Solanum lycopersicum L). var. Unapal Maravilla y pimentón (Capsicum annuum L.) var Unapal-Serrano en crioconservación*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, AA 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.
55. **Matos C., Schweigert F., Sintes G., Rodríguez G., Hurtienne A., Reyes D., Jiménez E. (2002).** *Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos*. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición, 16(2):105-13.
56. **Mehar F, Khan MIR, Massod A, Khan NA. 2013.** *Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones*. Annual Review and Research in Biology 3 (3): 267-295
57. **Melgarejo, L.M., M. Romero, S. Hernández, J. Barrera, M.E. Solarte, D. Suárez, L.V. Pérez, A. Rojas, M. Cruz, A.L. Moreno, S.C. Crespo, y W.H. Pérez. 2010.** *Experimentos en fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
58. **Mok DW, Mok MC. 2001.** *Cytokinin metabolism and action*. Department of Horticulture and Center for Gene Research and Biotechnology, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331-7304. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. 52:89–118
59. **Molina, L., Gonzales, J., Fundora, Z., Abdalnour, J., Desjardins, Y., Escalona, M. 2008.** *Aclimatización in vitro y ex vitro: Una estrategia para mejorar la productividad de la micropropagación de plantas*. CEASE, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Centro de Bioplasmas, UNICA, Ciego de Avila, Cuba. ENVIROTROM, Laval University, Quebec,

Canada.

60. **Montes, S., Lalama, A., Echheverría, J., Salazar, S.** 2016. *Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero*. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
61. **Murashige, T.** 1974. *Plant propagation through tissue culture*. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
62. **Olmos, S., Luciani, G., Galdeano, Ernestina.** 2010. *Micropropagación y conservación de germoplasma*. Biotecnología y mejoramiento Vegetal.
63. **Osman, Magdoleen., Elhadi, E., Khalafalla, M.** 2010. *Callus formation and organogenesis of tomato (Lycopersicon esculentum Mill, C.V. Omdurman) induced by thidiazuron*. Commission for Biotechnology and Genetic Engineering, National Center for Research, P. O. Box 2404, Khartoum, Sudan.
64. **Pérez, J y Cornejo, M.** 2014. *¿Cómo y por qué trabajamos con células vegetales?*. Universidad de Valencia. España.
65. **Pérez Y., Sosa del Castillo M., Fuentes L., Rubio Y., Valdivia A., Ávila, Pérez J.** 2016. *Caracterización bioquímica e histológica de plantas aclimatizadas in vitro de Agave fourcroydes Lem*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. UCLV. MES. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154
66. **Plana, D., Alvarez, M., Florido, M., Lara, R., Núñez, M.** 2002. *Efecto del biobras 6 en la morfogénesis in vitro del tomate (Lycopersicum esculentum Mill) var. Amalia*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
67. **Prenekumar, A., Mercado, J.A., Quesada, M.A.** (2001). Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Ribisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments and C/N ratio. J. Plant Physiol. 158: 835-840.
68. **Pospíšilová, J.; Catsky, J. y Sesták, Z.** 1999. *Photosynthesis in plants cultivated in vitro*.

- In: Pessaraki M. (ed). Handbook of photosynthesis New York: Marcel Dekker; Hong Kong: Basel, 1997. p. 525-540. [Books in soils, plants and the environment] ISBN: 0-8247-9708-6
69. **Radice, S.** 2010. *Herramientas Básicas*. Parte II. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal.
 70. **Ramage, C. M.; Williams, R.** 2002. *Mineral nutrition and plant morphogenesis*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* . 38: 116-124.
 71. **Rodríguez, G.** 2007. *Efecto de la cobertura del suelo con cascarilla de arroz en el crecimiento y rendimiento del tomate de ramillete*. Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimítrova Carretera Bejucal-Quivicán, km 33 1/2. Quivicán, La Habana, Cuba. CP 33500
 72. **Rodriguez, R., Aragon, C.E., Escalona, M., Gonzalez-Olmedo, J.L. and Desjardins, Y.** 2008. *Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane during acclimatization phase*. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:533-539.
 73. **Salas, M^a del Carmen; Urrestarauz, M.** 2001. *Técnicas de fertirrigación en cultivo sin suelo*. Universidad de Almería.
 74. **Sabya, A.** 2014. *Tasa de incremento lumínico óptimo durante la aclimatación in vitro de Nothofagus alpina (Nothofagus alpina Poepp et Endl (Oerst).*
 75. **Seldimirova, O.A. and Kruglova, N.N.** 2013. Properties of the initial stages of embryoidogenesis in vitro in wheat calli of various origin, *Biol. Bull. (Moscow)*. Vol. 40, no. 5, pp. 447–454.
 76. **Serna, J., Castro, R., Colinas, M., Sahaguín, J. Rodríguez, J.** 2011. *Aplicación foliar de ácido glutámico en plantas de jitomate (Lycopersicon esculentum Mili.)*. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México–Texcoco. Chapingo, Estado de México. Correo–e: rcbrindis@hotmail.com

77. **Stryer L., Berg J., Tymoczko J.** 2002. *Biochemistry*. 5ª edición. Freeman, NewYork, 974 p.
78. **Suárez, J., Duran, E., Rojas, J., Ortiz, N.** 2017. *Pigmentos fotosintéticos y conductancia estomática en ecotipos de copoazú (Theobroma grandiflorum Willd. Ex. Spreng K. Schum.)* Universidad de la Amazonia, Facultad de Ingeniería, Programa Ingeniería Agroecológica. Sede principal Cll 17 Diag 17 Cra 3F Barrio Porvenir. Florencia-Caquetá, Colombia.
79. **Taiz L, Zeiger E.** 1998. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
80. **Thorpe, T.A.** 1980. *Organogénesis in vitro: structural, physiological and biochemical aspects*. Internacional Review of Cytology, Supplement 11 A: 71-111
81. **Tiwari, S, Tuli R** (2009). *Multiple Shoot regeneratio in seed-derived immature leaflet explants of peanut (Arachis hipogea L.)*. Scientia Horticulturae 121:223-227
82. **Torrey, J.G.** 1966. *The initiation of organized development in plants*. Adv. Morphogen. 5:39-91.
83. **Torres, K.C.,** 1989. *Tissue Culture Techniques For Horticultural Crops*. AVI Books. New York. 285 pp.
84. **Tran Thanh Van, M.** 1980. *Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers*. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A: 175-194
85. **USDA. National Agricultural Statistics Service (NASS).** 2016. *Vegetables*. 2015 Summary. February 2016.
86. **Valderrama S., Chico J., Quispe J., Sánchez R.** 2011. *Regeneración in vitro de plantas de Solanum pimpinellifolium L. a partir de explantes foliares*. Artículo Científico. Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

87. **Vázquez, M., Jiménez, S., Anaya, I., Mendoza, H., Guevara, R.** 2012. *Comportamiento de plantas de tomate (Solanum lycoperscum) asperjadas con ácido salicílico cultivadas bajo diferentes condiciones climáticas en invernadero*. División de Estudios de Posgrado, C.A. Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro,
88. **Vélez-Mora, D., Armijos, R., Jordán, M.** 2015. *Mejoramiento de la germinación, control de la hiperhidricidad y formación de brotes en Vasconcella stipulata Badillo*. Rev. colomb. biotecnol., Volumen 17, Número 2, p. 16-21, 2015. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475
89. **Villalobos, I., Arias.** 1987. *Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (Saccharum spp.)*. Agronomía Costarricense 11(1): 39-44.
90. **Villalobos, V.** 1990. *Organogénesis*. En rosell, C y Villalobos, V. (ed.). Fundamentos teóricos – prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO producción y protección vegetal. 105: 29- 32.
91. **Villalobos, V., Thorpe, T.** 2001. *Micropropagación: conceptos, metodología y resultado*. Biotecnología Vegetal. 1(2): 65-67
92. **Villalobo, A., González, J., Santos, R., Rodríguez R.** 2012. *MORPHO PHYSIOLOGICAL CHANGES IN PINEAPPLE PLANTLETS (Ananas comosus (L.) Merr.) DURING ACCLIMATIZATION*. University of Ciego de Avila – Agronomic Department – Ciego de Avila – Cuba.
93. **Wellburn, A.** (1994). *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. J. Plant Physiol. 144:307-313.
94. **Winton, L.L. and Verhagen.** 1977. *Shoots from Douglas-fir cultures*. Can. J. Bot. 55: 1246-1250.
95. **Wu, C., Niu, Z., Tang, Q. y Wang, W.** 2008. *Estimating chlorophyll content from*

hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation. Agricultural and Forest Meteorology 148:1230-1241.

96. **Zaid, A., Hughes, H.G., Porceddu, E., Nicholas F.** 2004. *Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación*. Organización de la Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.

Consultas en línea

1. <http://www.agropatria.com.ve/node/el-tomate-cultivo-emblematico-para-el-pais>
2. http://www.el-nacional.com/noticias/economia/fedeagro-2017-sera-ano-caida-produccion-agricola_181094
3. <http://www.fao.org/docrep/005/s8630s/s8630s0m.jpg>