

# ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PECTIMORF EN LA MORFOGÉNESIS *In Vitro* DEL TOMATE (*Lycopersicon esculentum*, Mill) VAR. AMALIA

Dagmara Plana, Marta Álvarez, Marilyn Florido, Regla M. Lara y J. C. Cabrera

**ABSTRACT.** Different researches developed at the Laboratory of Plant Biotechnology from the National Institute of Agricultural Sciences (INCA) have shown the role of oligogalacturonides as bioregulators of the *in vitro* morphogenetic activity in different plant species. In this work, the biological activity of different concentrations of the oligopectate Pectimorf was studied in the *in vitro* morphogenetic response of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). The treatments used as explants the apical segments of hypocotyls and cotyledons coming from *in vitro* seedlings of Amalia cultivars, which were cultivated in MS medium supplemented with different concentrations of Pectimorf (1, 5, 10 and 15 mg.L<sup>-1</sup>), in absence or presence of low concentrations of BAP (0.25, 0.5 and 1 mg.L<sup>-1</sup>). The study showed the favorable action of this product on the *in vitro* tomato regeneration. It was established that, for hypocotyls, the optimal concentration of Pectimorf was 10 mg.L<sup>-1</sup>. In the case of cotyledons, the best combination was the one using 10 mg.L<sup>-1</sup> Pectimorf with 0.25 and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP as a complement in the culture medium.

**Key words:** oligosaccharides, *in vitro* culture, *Lycopersicon esculentum*, pectinas

**RESUMEN.** Diferentes investigaciones realizadas en el Laboratorio de Biotecnología de las plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), han demostrado el papel de los oligogalacturónidos como biorreguladores del crecimiento y desarrollo *in vitro*. En este trabajo se estudió la actividad biológica de diferentes concentraciones de la mezcla de oligogalacturónidos conocida como Pectimorf, en la respuesta morfogénica *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). En los ensayos realizados se emplearon como explantes segmentos apicales de hipocótilos y cotiledones provenientes de plántulas del cultivar Amalia, cultivadas en medio basal complementado con diferentes concentraciones de Pectimorf (1, 5, 10 y 15 mg.L<sup>-1</sup>) en presencia o no de bajas concentraciones de BAP (0.25, 0.5 y 1 mg.L<sup>-1</sup>). Se puso de manifiesto la acción favorable del producto sobre la regeneración *in vitro* de los explantes estudiados, siendo la dosis de 10 mg.L<sup>-1</sup> de Pectimorf la que favoreció la regeneración de plantas a partir de hipocótilos. En el caso de los cotiledones, las mejores combinaciones fueron aquellas donde se emplearon 10 mg.L<sup>-1</sup> de Pectimorf con 0.25 y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP como complemento del medio de cultivo.

**Palabras clave:** oligosacáridos, cultivo *in vitro*, *Lycopersicon esculentum*, pectinas

## INTRODUCCIÓN

La regeneración de plantas *in vitro* por organogénesis o embriogénesis somática es un prerrequisito indispensable para la aplicación de algunas herramientas de la biotecnología en la mejora genética de las plantas (1). La aplicación de la biología molecular y celular al mejoramiento de plantas requiere que células simples vegetativas desarrollen una planta completa (totipotencia). Esta premisa es útil tanto para la transformación de plantas como para el cultivo de protoplastos (2, 3), que necesitan de un eficiente protocolo de regeneración.

Ms.C. Dagmara Plana, Investigador; Dr.C. Marta Álvarez, Investigador Titular; Ms.C. Marilyn Florido, Investigador.Agregado y Regla M. Lara, Especialista del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal; Dr.C. J. C. Cabrera, Investigador Auxiliar del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaceta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ dagmara@inca.edu.cu

En la capacidad de división celular y regeneración de las plantas de tomate, hay exigencias diferenciadas en cuanto a la composición del medio de cultivo, especialmente en lo referente a reguladores del crecimiento (4, 5, 6).

La introducción de los oligogalacturónidos en las tecnologías de regeneración *in vitro* pudiera constituir una alternativa promisoriosa, para mejorar la eficiencia económica del proceso con insumos nacionales, al elevar los coeficientes de multiplicación y obtener plántulas con un desarrollo vegetativo adecuado (7).

Entre las oligosacarinas, puede citarse el grupo de oligogalacturónidos producidos en Cuba por la degradación de la pectina de los frutos cítricos, que son activos biológicamente a muy bajas concentraciones. Estos compuestos se han obtenido también de las paredes de hongos patógenos, de células vegetales o sintetizados por bacterias simbióticas de plantas (8).

Varios autores han probado los oligogalacturónidos como sustitutos de auxinas y citoquininas, para conocer su efectividad en los procesos morfogénicos de diver-

sas especies (9, 10, 11), no habiendo informes para el tomate, por lo que se llevó a cabo el presente trabajo, con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones del oligogalacturónido Pectimorf en la respuesta morfogénica *in vitro* del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), var. Amalia, con vistas a incrementar la regeneración al sustituir o complementar la acción del BAP en este proceso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para realizar estos experimentos se partió de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) var. Amalia (12).

Las semillas fueron esterilizadas y llevadas al flujo laminar (ESI FLUFRANCE), donde se sumergieron en solución de cloro comercial al 50 % (3 % de cloro activo) durante 15 minutos y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril hasta eliminar el agente desinfectante (13).

Una vez desinfectadas, las semillas fueron colocadas sobre la superficie del medio basal, contenido en pomos de vidrio a razón de 20 mL por recipiente para obtener los germinados cultivados *in vitro* (5, 13, 14). La incubación se realizó en un cuarto de crecimiento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (14), con fotoperíodo de 16 horas luz ( $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

El medio basal (MS) consistió en sales de Murashige y Skoog (15), complementado con 2 % de agar Gel Rite, azúcar comercial ( $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Tiamina ( $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Mioinositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), como aditivos orgánicos (5, 13, 14). Se estudió el efecto del Pectimorf, mezcla de oligogalacturónidos producida en el Laboratorio de Oligosacarinas del INCA, a diferentes concentraciones y en combinación con BAP (6-Bencilamino purina), tal como se muestra en la Tabla I.

**Tabla I. Concentraciones de Pectimorf y BAP en los medios de cultivo ensayados**

Tratamientos	BAP		Pectimorf	
	( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )
P <sub>1</sub>	-	-	1	0.47
P <sub>2</sub>	-	-	5	2.35
P <sub>3</sub>	-	-	10	4.70
P <sub>4</sub>	-	-	15	7.05
P <sub>3</sub> +B <sub>1</sub>	0.25	1.11	10	4.70
P <sub>3</sub> +B <sub>2</sub>	0.5	2.22	10	4.70
P <sub>3</sub> +B <sub>3</sub>	1	4.44	10	4.70

El pH se ajustó a 5.8, previo a la adición del agente solidificante. La esterilización se llevó a cabo en autoclave por espacio de 20 minutos a  $121^\circ\text{C}$  con 1.5 atmósferas de presión.

Entre los siete y 10 días posteriores a la germinación, los cotiledones de las plántulas estaban perfectamente expandidos y desarrollados; en este estadio se seccionaron los segmentos apicales de los hipocótilos (1 cm) y la zona central de las hojas cotiledonares, para ser utilizados como explantes en medios de cultivo que

contenían medio basal y las concentraciones de Pectimorf y BAP referidas en la Tabla I a razón de cinco explantes por pomo con 10 repeticiones.

Después de 21 días de cultivo, se llevó a cabo una valoración cualitativa y cuantitativa, en 50 explantes por tratamiento, de las siguientes características:

⇒ desarrollo del callo: según escala 1 (15)

⇒ color del callo: según escala 2 (15).

Las cantidades de yemas, brotes y raíces por explante se transformaron a  $\sqrt{x+1}$ ; los resultados fueron procesados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple, modelo fijo (16), mientras que los explantes con brotes, brotes anormales, yemas, callos y raíces fueron expresados en porcentajes y procesados mediante una comparación de proporciones, a través de la prueba de Shi cuadrado. En caso de existir diferencias significativas entre las medias, se docimaron por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % (17).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los siete días de cultivados en medios con Pectimorf, los hipocótilos estaban engrosados y con un color verde intenso, momento a partir del cual comenzaron a aparecer raicillas en el extremo menos apical del explante, llegando a ser múltiples. A medida que se engrosó el extremo apical de los hipocótilos, aparecieron callosidades de cicatrización y en los tratamientos P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> se formaron callos morfogénicos de poco crecimiento y textura compacta.

El mayor porcentaje de explantes con callos se observó en los tratamientos P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> (Tabla II), siendo la variante P<sub>3</sub> la que aportó una mayor frecuencia de regeneración, con una eficiencia de 2.67 brotes por explante. Así mismo, la Tabla II muestra cómo en el tratamiento P<sub>1</sub> no ocurrió regeneración de brotes, manifestándose una pobre actividad morfogénica tendiente a la formación de raíces. Al utilizar dosis de 5 a  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , incrementó la frecuencia y eficiencia de regeneración; en cambio, en dosis inferiores y superiores a estas, se vio afectado este proceso, favoreciendo la callogénesis en dosis de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ello demuestra que el uso de esta dosis promueve los mejores resultados en la regeneración de brotes y formación de callos morfogénicos, en los que se observan numerosas yemas que luego de subcultivadas dan lugar a brotes.

Al discutir estos resultados, se pone en evidencia la semejanza del proceso inducido por la presencia del Pectimorf con el descrito por otros autores (18), donde se utilizaron diferentes concentraciones de BAP como regulador del crecimiento. Se realizó un bioensayo clásico (7) en la inducción de callos y el crecimiento de brotes de tabaco, donde se demostró que el Pectimorf tuvo un efecto de tipo citoquinínico; ello unido a los resultados obtenidos en este mismo sentido (19) con callos de *Saccharum officinarum* L., al sustituir la kinetina por Pectimorf, confirman el tipo de acción reguladora que ejercen estos oligogalacturónidos en algunas especies vegetales.

**Tabla II. Efecto del Pectimorf en la morfogénesis *in vitro* de hipocótilos de tomate var. Amalia**

Tratamiento	Brotos/ explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (Brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
P <sub>1</sub>	0±0.04 c	0.00 d	0 c	30 b	33 b
P <sub>2</sub>	1.75±0.04 b	1.40 b	80 ab	30 b	33 b
P <sub>3</sub>	2.67±0.04 a	2.67 a	100 a	100 a	100 a
P <sub>4</sub>	1.71±0.06 b	0.80 c	46 b	100 a	100 a
EE <sub>x±</sub>	***	0.07***	0.12***	0.12***	0.12***

Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales según prueba de Duncan (p<0.05)  
 \*\*\* significativo para <math>p < 0.001</math>

En cultivos como café, caña de azúcar y en la especie *Anthurium cubense* (11, 18, 19), la adición de Pectimorf al medio de cultivo estimuló la formación de callos y la regeneración de múltiples brotes. Se considera que los oligogalacturónidos pudieran llevar información y ser portadores de mensajes químicos, que en este caso pueden desencadenar procesos fisiológicos de regeneración y/o de división de la pared celular, ya que ellos promueven en las células vegetales la síntesis de importantes sustancias que actúan en estos procesos (9, 10).

Los resultados del experimento donde se combinó la acción del Pectimorf y el BAP, mostraron una actividad morfogenética que demuestra cómo la unión de estos compuestos desencadena una actividad morfogenética, con características similares a la descrita con la sola presencia de los oligogalacturónidos en el medio de cultivo (Tabla III). La capacidad organogénica de los hipocótilos no difirió significativamente entre sí en cuanto al porcentaje de explantes con brotes y número de brotes por explante.

Sin embargo, cuando se utilizaron 10 mg.L<sup>-1</sup> del bioproducto y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (P<sub>3</sub>+B<sub>2</sub>), se obtuvo el 100 % de explantes con callos (Tabla III), resultado logrado con la adición de solo 10 mg.L<sup>-1</sup> de Pectimorf en el experimento anterior, no favoreciéndose la morfogénesis con la adición de Pectimorf y BAP en el medio de cultivo.

Estos resultados indican que si bien se esperaba que el BAP debía incrementar la respuesta regenerativa de este tipo de explante en unión con el oligogalacturónido, solo se logró un incremento en la división celular indiferenciada en uno de los tratamientos (P<sub>3</sub>+B<sub>2</sub>), lo que pudiera estar motivado por una acción de desbalance hormonal creada por el exceso de citoquinina en el medio de cultivo, lo que provocó un bloqueo en la respuesta morfogenética del explante. Esta respuesta presupone la

necesidad de un estudio más profundo sobre la acción de dosis 10 mg.L<sup>-1</sup> del Pectimorf combinado con dosis superiores a 0.25 mg.L<sup>-1</sup> e inferiores a 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

En el siguiente experimento se demostró claramente que el Pectimorf en las dosis estudiadas no favoreció el desarrollo de un proceso morfogenético en cotiledones de tomate (Tabla IV). Solo con la mayor de las dosis estudiadas (P<sub>4</sub>), se pudo observar una incipiente formación de callos que alcanzó el 26 % de los explantes bajo ese tratamiento, sin que se tuvieran indicios de regeneración alguna durante el tiempo de cultivo.

**Tabla IV. Actividad morfogenética causada por la acción del Pectimorf en cotiledones del cultivar Amalia**

Tratamiento	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
P <sub>1</sub>	0 b	0
P <sub>2</sub>	0 b	13
P <sub>3</sub>	0 b	13
P <sub>4</sub>	26 a	26
EE <sub>x±</sub>	6.44-02E***	8.77-02E ns

La presencia del oligogalacturónido combinado con concentraciones menores de 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, incrementó la respuesta morfogenética de los cotiledones (Tabla V). En los tres tratamientos (Tabla V), se formaron callos de abundante crecimiento y color verde en más de la mitad de los explantes, destacándose P<sub>3</sub>+B<sub>1</sub> con el 100 % de los explantes con callos. Las variantes P<sub>3</sub>+B<sub>1</sub> y P<sub>3</sub>+B<sub>2</sub> fueron las únicas que provocaron la diferenciación de brotes, con valores muy notables y similares estadísticamente; sin embargo, como se puede observar, la eficiencia de regeneración fue baja en los dos casos. La variante P<sub>3</sub>+B<sub>3</sub> fue la única donde se observó un enraizamiento pobre de uno de los extremos de la hoja cotiledonal y un 50 % de los explantes con callos.

La causa de esta reacción pudiera deberse al agotamiento de los nutrientes en el medio, después de tres semanas de cultivo; se evidencia un desequilibrio hormonal, provocando la necesidad de un subcultivo más frecuente de los callos a medios ricos en citoquininas.

De todos los factores implicados en la respuesta morfogenética, se sabe que la limitante de la inducción es la concentración hormonal. Los estudios de correlación entre los niveles hormonales endógenos y procesos fisiológicos, así como los experimentos sobre el efecto de los reguladores del crecimiento aplicados exógenamente son corroborados por varios autores (20, 21).

**Tabla III. Acción de la combinación de Pectimorf y BAP en la morfogénesis *in vitro* de hipocótilos de tomate var. Amalia**

Tratamiento	Brotos/explantes regenerados	Eficiencia de regeneración (brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
P <sub>3</sub> +B <sub>1</sub>	1.41±0.07	1.04	10	83 a	10 b
P <sub>3</sub> +B <sub>2</sub>	1.50±0.04	1.12	23	100 a	3b
P <sub>3</sub> +B <sub>3</sub>	1.44±0.04	1.16	36	16 b	66 a
ES <sub>x±</sub>	n.s	0.04 n.s	7.72-02 E n.s	8.6-02 E***	8.07-02 E***

**Tabla V. Proceso morfogenético inducido en cotiledones de tomate por la combinación de Pectimorf y BAP en el medio de cultivo**

Tratamiento	Brotos/explantes regenerado	Eficiencia de regeneración (Brotos/explantes totales)	Frecuencia explantes regenerados (%)	Explantes con callos (%)	Explantes con raíces (%)
P3+B1	1 a	1 a	100 a	100 a	0 b
P3+B2	1 a	1 a	100 a	66 b	0 b
P3+B3	0 b	0 b	0 b	50 b	10 a
ESx±	0***	0***	7.72-02E***	8.17-02E***	3.27-02E**

Los cambios provocados por las oligosacarininas en la expresión morfogenética de los explantes dependen de la concentración relativa de auxinas y citoquininas, el pH del medio y la variación del pH durante el período de cultivo (22).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el uso del Pectimorf a concentraciones de 10 mg.L<sup>-1</sup> incrementó la regeneración *in vitro* en segmentos apicales de hipocótilos del cultivar Amalia, superando a la formación de callos, frecuencia y eficiencia de regeneración obtenida con el uso del BAP (2 mg.L<sup>-1</sup>), como suplemento al medio basal MS recomendado para este cultivar (15).

Al utilizar este bioproducto como suplemento hormonal en los medios de cultivo de cotiledones, no se obtuvieron resultados alentadores con las dosis ensayadas, lo que debe promover estudios más amplios en este sentido; en cambio, cuando se utilizaron combinaciones de Pectimorf y BAP, se vio favorecido el desarrollo y crecimiento celular de los explantes utilizados, observándose un marcado incremento en la callogenesis, no así en la regeneración de órganos.

Varios autores (23, 24) encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate, estando esta determinada en gran medida por los reguladores del crecimiento y el tipo de explante usados, aún cuando se utilizan diferentes explantes de una misma planta, aspecto a tener en cuenta a la hora de recomendar el empleo de uno u otro regulador del crecimiento.

La introducción de los oligogalacturónidos en las tecnologías de regeneración *in vitro*, pudiera constituir una alternativa promisoriosa para mejorar la eficiencia económica del proceso con insumos nacionales, al elevar los coeficientes de multiplicación y obtener plántulas con un desarrollo vegetativo adecuado (9, 10).

## REFERENCIAS

- McKersie, B. D. y Brown, D. C. W. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research*. 1996, vol. 6, p. 109-126.
- Brunetti, A. /et al./ High expression of truncated viral rep protein confers resistance to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, vol. 10, p. 571-579.
- Ramulu, K. Genetic variation *in vitro* cultures and regenerated plants in tomato and its implications. *Mogr. Theor. Appl. Genet*, 1991, vol. 14, p. 259-275.
- Lerch, M.; Miczynski, K. y Pindel, A. Comparison of regeneration potentials in tissue cultures of primitive and cultivated tomato species (*Lycopersicon sp.*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1996, vol. 65, no. 1-2, p. 53-56.
- Fuentes, A. D. /et. al./ Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. *Biot. Aplicada*, 1998, vol. 15, p. 242-245.
- Alvarez, M. /et. al./ Obtención de nuevos genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) por métodos biotecnológicos y nucleares con tolerancia a estrés abiótico y biótico. Informe final de Proyecto CITMA. (Cod. 300073). 1999.
- Gonzalez, S. /et. al./ Actividad biológica del Pectimorf en el cultivo *in vitro* de callos y ápices de tabaco. En: Programas y Resúmenes Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura (11:1998:La Habana), 1998.
- Cabrera, J. C. /et. al./ Nuevo biorregulador cubano de origen péptico para la micropropagación y la morfogénesis En: Programas y Resúmenes de BIOVEG'99. Ciego de Avila, 1999.
- Diosdado, E. Efecto de biorreguladores en el proceso de embriogénesis somática y cultivo y fusión de protoplastos en el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). [Tesis de grado]. UH, 1997.
- Cabrera, J. C. Obtención de una mezcla de (1-4)-D oligogalacturónidos bioactivos a partir de un grupo de subproductos de la industria citrícola. [Tesis de grado], CNIC, 2000.
- Cevallos, A. M. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café (*Coffea spp.*), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. [Tesis de grado]. INCA, 2000.
- Alvarez, M.; Armas, G. de y Martínez, B. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 82.
- Alvarez, M. /et al./ Radiosensibilidad a rayos gamma 60Co en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) variedad Amalia. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 4, p. 35-39.
- Cano, A. E. /et al./ Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 53, p. 19-26.

15. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and assays with the tobacco tissues cultures. *Physiol. Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
16. Snedecor, G. y Cochran, W. Métodos estadísticos. C. México: Continental Ed., 1971. 702 p.
17. Duncan, D. A significance test for differences between naked treatments in analysis of variance. *Virginia J. Sci.*, 1951, vol. 2, p. 171-189.
18. Santos, J. Efecto de la actividad de un oligogalacturonido en el proceso de calogénesis *in vitro* de *Coffea canephora* var. [Trabajo de Diploma]. ISCAH. 1998.
19. Garbey, P. *et al.*. Efecto del Pectimorf sobre callos de *Sacharum officinarum* L. En: Programa y Resúmenes XI Seminario Científico INCA. Taller de productos bioactivos y la agricultura. (11:1998:La Habana), 1998.
20. Zorzoli, R.; Mroginski, L. y Picardi, L. Evaluación de la capacidad de desdiferenciación y rediferenciación *in vitro* de cuatro genotipos de *Lycopersicon esculentum*. Mill. *AgriScientia*, 1994, vol. 11, p. 55-60.
21. Ricci, D. *et al.*. Auxin structure and morphogenetic activity. *Revista EPPOS*, 1996, vol. 20, p. 5-12.
22. Tran Thanh Van, K. y Trinh, T. H. Organogenetic differentiation. En: *Plant Tissue Culture, Applications and Limitations*. Amsterdam: Elsevier Ed. 1990, p. 34-53.
23. Santana, N. Estudio sobre la formación de brotes en cultivo *in vitro* de hojas de tomate. *Cultivo Tropicales*, 1985, vol. 7, no. 2, p. 117-122.
24. Torelli, A. *et al.*. New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Molecular Biology*, 1996, vol. 32, p. 891-900.

Recibido: 20 de noviembre del 2001

Aceptado: 23 de septiembre del 2002

# Cursos de Verano

Precio: 200 USD

## Biotecnología

Coordinador: Dra.C. María M. Hernández Espinosa

Duración: 30 horas

Fecha: 1 al 5 de julio

### SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval  
Dirección de Educación, Servicios Informativos  
y Relaciones Públicas  
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)  
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,  
La Habana, Cuba. CP 32700  
Telef: (53) (64) 6-3773  
Fax: (53) (64) 6-3867  
E.mail: posgrado@inca.edu.cu