

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA
EXPRESIÓN DE TRES GENES DE FENOTIPO DE UNA MUESTRA
DE MUTANTES DE *Solanum lycopersicum* ‘MICRO-TOM’
(TOMATE)”**

Tesis Presentada por la Bachiller:

Sagrario Cristina Benavente García

Para optar por el título profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Mgter. Julitza Paredes Fuentes

Arequipa - Perú

2013

PRESENTACIÓN

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas.

Señor Director del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica.

Señores Miembros del Jurado Dictaminador de la Tesis

De conformidad con las disposiciones del Reglamento de Grados y Títulos del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, pongo a vuestra consideración el presente trabajo de investigación titulado:

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA EXPRESIÓN DE TRES GENES DE FENOTIPO DE UNA MUESTRA DE MUTANTES DE *Solanum lycopersicum* ‘MICRO-TOM’ (TOMATE)

El trabajo de investigación fue realizado aplicando los conocimientos adquiridos durante mi formación universitaria, el mismo que al ser aprobado me permitirá optar por el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo.

DEDICATORIA

A mis queridos padres, Demetrio y Beaut, por su cariño y su incondicional e invaluable apoyo. Gracias por todos sus consejos y su esfuerzo y sacrificio por verme profesional.

A mi hermana Yadira, por ser la mejor hermana, la mejor amiga y por apoyarme en todo momento.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
ABSTRACT.....	xv
ABREVIATURAS	xvi
CAPÍTULO I: GENERALIDADES.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.2 HIPÓTESIS	2
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL:	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
1.4 JUSTIFICACIÓN	4
1.5 ANTECEDENTES	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1 <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE).....	7
2.1.1 Taxonomía	7
2.1.2 Origen y requerimiento climático.....	7
2.1.3 Características de la planta de tomate.....	8
2.1.4 Composición nutricional y color del fruto de tomate	9
2.2 ANATOMÍA Y DESARROLLO DEL FRUTO DE TOMATE	14
2.2.1 Anatomía del fruto de tomate	14
2.2.2 Desarrollo del fruto de tomate	14
2.2.3 Tinción del Pericarpio: Colorante Calcoflúor.	16
2.3 ANATOMÍA DEL PEDICELO DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO.....	16
2.3.1 Xilema	18
2.3.2 Floema.....	19
2.3.3 Transporte de agua y solutos durante el desarrollo del fruto.	21
2.4 DESCRIPCIÓN DE LA VARIEDAD ‘MICRO-TOM’.	23

2.5	IMPORTANCIA DE LA MEDIDA DE DUREZA DE FRUTOS PARA EL CONTROL DE SU MADURACIÓN	24
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		26
3.1	CAMPO DE VERIFICACIÓN.....	27
3.1.1	Lugar de ejecución.....	27
3.1.2	Ubicación espacial.....	27
3.2	MATERIALES.....	27
3.2.1	Material vegetal	27
3.2.2	Material de vidrio	28
3.2.3	Equipos	28
3.2.4	Software	28
3.2.5	Colorantes.....	29
3.2.6	Otros	29
3.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	30
3.3.1	Parámetros de invernadero	30
3.3.2	Distribución de los frutos para cada análisis:.....	31
3.3.3	Recolección de frutos para los diferentes análisis.....	32
3.3.4	Seguimiento de la maduración de los frutos.....	34
3.3.5	Determinación de las características fisicoquímicas de los frutos de tomate. 35	
3.3.5.1	Determinación del peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto. 35	
3.3.5.2	Determinación de la dureza del fruto de tomate.....	36
3.3.5.3	Determinación de la cantidad de Sólidos Solubles del fruto de tomate. 38	
3.3.6	Análisis de los tejidos conductores del pedicelo.....	41
3.3.7	Análisis de células del pericarpio.....	49
3.3.8	Medición de la altura de las plantas de tomate ‘Micro-Tom’	56
3.3.9	Determinación del rendimiento de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’.....	56

3.3.10	Relación entre las mutaciones <i>Self-Pruning</i> (<i>sp</i>), <i>Dwarf</i> (<i>d</i>) y <i>Miniature</i> (<i>mnt</i>) y los parámetros que podrían influir en el tamaño final del fruto y el rendimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’.....	57
3.3.11	Análisis estadístico de los resultados.....	57
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		58
4.1	DETERMINACIÓN DEL ESTADO BREAKER DE LOS FRUTOS DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) ‘MICRO-TOM’	59
4.2	MADURACIÓN DE LOS FRUTOS DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) ‘MICRO-TOM’.....	61
4.3	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS FRUTOS DE TOMATE.....	66
4.3.1	Determinación del peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto.	66
4.3.2	Determinación de la dureza de los frutos	72
4.3.3	Determinación del contenido de sólidos solubles.....	76
4.4	ANÁLISIS DE LOS TEJIDOS CONDUCTORES DEL PEDICELO.....	81
4.4.1	Adquisición de imágenes de cortes de pedicelo.....	81
4.4.2	Determinación del área total del pedicelo.....	93
4.4.3	Determinación del área del xilema.	95
4.4.4	Determinación del área del floema y la capacidad floemiana	98
4.5	ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS DEL PERICARPIO	102
4.5.1	Adquisición de imágenes de cortes de pericarpio.....	102
4.5.2	Determinación del espesor del pericarpio y del número de capas celulares	111
4.5.3	Determinación del área de las células del pericarpio	114
4.6	MEDICIÓN DE LA ALTURA DE LAS PLANTAS DE <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> (TOMATE) ‘MICRO-TOM’.....	116
4.7	DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS PLANTAS DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) ‘MICRO-TOM’.....	121
4.8	RELACIÓN ENTRE LAS MUTACIONES SELF-PRUNING (SP), DWARF (D) Y MINIATURE (MNT) Y LOS PARÁMETROS QUE PODRÍAN INFLUIR	

EN EL TAMAÑO FINAL DEL FRUTO Y EL RENDIMIENTO DE <i>Solanum lycopersicum</i> (TOMATE) ‘MICRO-TOM’	122
4.9 CUADRO RESUMEN RESULTADOS	124
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	125
5.1 CONCLUSIONES	126
5.2 RECOMENDACIONES	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del Pedicelo del fruto de <i>Solanum lycopersium</i> (tomate).	17
Figura 2. Zona de abscisión del pedicelo de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate).	22
Figura 3. Invernadero N° 1 del Instituto Nacional de Investigación Agronómica – Bordeaux.	30
Figura 4. Material vegetal de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’, Wild Type..	31
Figura 5. Material vegetal de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	32
Figura 6. Distinción de frutos para realizar los distintos análisis.	33
Figura 7. Recolección de frutos en invernadero.	33
Figura 8. Determinación del estado <i>breaker</i> de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	35
Figura 9. Determinación del diámetro de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	36
Figura 10. Determinación del contenido de sólidos solubles del gel de los frutos mutantes y Wild Type.	39
Figura 11. Preparación del pericarpio para realizar la determinación del contenido de sólidos solubles en frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	39
Figura 12. Determinación de la cantidad de sólidos solubles de los frutos de <i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	40
Figura 13. Vibratomo Microm, modelo HM 650V.	42
Figura 14. Fijación de la muestra en la platina del Vibratomo Microm HM 650V.....	43
Figura 15. Obtención de cortes de pedicelo utilizando el equipo Vibratomo Microm HM 650 V.....	44
Figura 16. Microscopio Zeiss Axiophot y cámara SPOT RT3 para la adquisición de imágenes de cortes de pedicelo.....	45
Figura 17. Determinación del área total del pedicelo de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’. El perímetro del pedicelo se encuentra marcado de color rojo.	46
Figura 18. Determinación del área del xilema de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’. El xilema se encuentra delimitado por los bordes de color rojo. ...	47

Figura 19. Determinación del área del floema de frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’. El floema se encuentra delimitado por los bordes de color rojo.	48
Figura 20. Determinación del espesor del pericarpio en un corte histológico de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’.	53
Figura 21. Determinación del número de capas celulares del pericarpio en un corte histológico de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	53
Figura 22. Reconocimiento de las paredes celulares del pericarpio por el programa Cellset, en un corte histológico de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	54
Figura 23. Segmentación celular final de las células del pericarpio en un corte histológico de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	55
Figura 24. Imagen de segmentación celular del pericarpio de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’ utilizada para determinar el área de las células.....	55
Figura 25. Conteo de las células que conforman el pericarpio en un corte histológico de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	56
Figura 26. Seguimiento de la maduración de fruto Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	61
Figura 27. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P1B3.711, P3C6.1 y P11C11.11.1 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	62
Figura 28. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P29C1.7, P6C7.5 y P24C3.4 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	63
Figura 29. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P12H11.4, P40D7.12 y P40D11.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	64
Figura 30. Seguimiento fotográfico de la maduración del mutante P3D3.12 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	65
Figura 31. Diferencias de peso y diámetro de los frutos de los mutantes P12H11.4, P1B3.7.11, P24C3.4, P3C6.1, P40D11.5, P40D7.12 y P6C7.5 con respecto a los frutos Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	68
Figura 32. Peso promedio de los frutos de los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 y frutos Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	69

Figura 33. Diámetro promedio de los frutos de los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 y frutos Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	69
Figura 34. Diferencia de tamaño del fruto entre el Wild Type y los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	70
Figura 35. Comparación de los lóculos de P3D3.12, con el Wild Type y otros mutantes de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	72
Figura 36. Penetrómetro marca Fruit Texture Analyzer utilizado en la determinación de la dureza de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	73
Figura 37. Dureza promedio de los frutos mutantes y frutos Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate). ‘Micro-Tom’	75
Figura 38. Refractómetro digital Euromex utilizado en la determinación del contenido de sólidos solubles de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	77
Figura 39. Contenido de Sólidos Solubles de los frutos de los distintos mutantes y los frutos Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	79
Figura 40. Peso fresco de frutos vs. Contenido de Sólidos Solubles de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	80
Figura 41. Pedicelos de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’ Wild Type.	83
Figura 42. Estructura del pedicelo de <i>Solanum lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’, Wild Type. ..	83
Figura 43. Pedicelos del mutante P1B3.7.11 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	84
Figura 44. Pedicelos del mutante P3C6.1 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	85
Figura 45. Pedicelos del mutante P3D3.12 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	86
Figura 46. Pedicelos del mutante P6C7.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	87
Figura 47. Pedicelos mutante P11C11.11.1 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	88
Figura 48. Pedicelos del mutante P12H11.4 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	89

Figura 49. Pedicelos del mutante P24C3.4 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	90
Figura 50. Pedicelos del mutante P29C1.7 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	91
Figura 51. Pedicelos del mutante P40D7.12 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	92
Figura 52. Pedicelos del mutante P40D11.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	93
Figura 53. Área total del pedicelo de los distintos mutantes vs. Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	95
Figura 54. Área del xilema de los distintos mutantes vs el Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	97
Figura 55. Eficiencia del transporte realizado por el floema de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	100
Figura 56. Relación entre la capacidad floemiana y el peso de los frutos de los mutantes P1B3.7.11, P24C3.4, P3C6.1, P40D11.5 y Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	101
Figura 57. Pericarpios de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’ Wild Type.	103
Figura 58. Estructura del Pericarpio de <i>Solanum lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’, Wild Type.	104
Figura 59. Pericarpios del mutante P1B3.7.11 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	105
Figura 60. Pericarpios del mutante P3D3.12 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	106
Figura 61. Pericarpios del mutante P6C7.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	107
Figura 62. Pericarpios del mutante P11C11.11.1 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	107
Figura 63. Pericarpios del mutante P12H11.4 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	108

Figura 64. Pericarpios del mutante P24C3.4 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	108
Figura 65. Pericarpios del mutante P29C1.7 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	109
Figura 66. Pericarpios del mutante P40D7.12 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	110
Figura 67. Pericarpios del mutante P40D11.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	110
Figura 68. Pericarpios del mutante P3C6.1 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	111
Figura 69. Espesor del pericarpio de los frutos de los distintos mutantes vs Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	113
Figura 70. Área de las células del pericarpio de los frutos de los distintos mutantes vs Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	115
Figura 71. Altura promedio de las plantas mutantes y Wild Type de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	117
Figura 72. Comparación de la altura de una planta Wild Type y una planta P40D11.5 de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	118
Figura 73. Comparación de la altura de distintas variedades de tomate vs el cultivar ‘Micro-Tom’ de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) ‘Micro-Tom’	119
Figura 74. Características de una hoja de <i>S. lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’	120
Figura 75. Apariencia compacta de la planta de <i>S. lycopersicum</i> ‘Micro-Tom’	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Aparición del estado <i>breaker</i> en los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	59
Tabla N° 2. Peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	67
Tabla N° 3. Comparación de pesos y diámetros de los frutos de distintas variedades de <i>Solanum lycopersicum</i> y cv. ‘Micro-Tom’.	71
Tabla N° 4. Dureza de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	74
Tabla N° 5. Contenido de sólidos solubles (°Bx) de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	78
Tabla N° 6. Área total del pedicelo.	94
Tabla N° 7. Área del xilema.	96
Tabla N° 8. Área del floema y capacidad floemiana.	98
Tabla N° 9. Espesor y número de capas celulares del pericarpio de los frutos de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	112
Tabla N° 10. Área de las células del pericarpio.	114
Tabla N° 11. Altura de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	116
Tabla N° 12. Rendimiento de las plantas de <i>S. lycopersicum</i> cv. ‘Micro-Tom’.	121
Tabla N° 13. Relación entre la capacidad floemiana, el área de las células del pericarpio y el espesor del pericarpio con el rendimiento de <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) cv. ‘Micro-Tom’.	123

RESUMEN

‘Micro-Tom’ es un cultivar de *Solanum lycopersicum* (tomate) que se ha tomado como modelo en diferentes estudios biotecnológicos realizados recientemente en esta especie. Se ha sugerido que el fenotipo enano de ‘Micro-Tom’ es el resultado de tres mutaciones en los genes *dwarf*, *miniature* y *self-pruning*.

Esta investigación tuvo por objetivo establecer una relación entre la expresión de estas mutaciones con parámetros que podrían influir en el tamaño final del fruto y en el rendimiento de este cultivar, tales como el área de las células del pericarpio, el espesor del pericarpio y la eficiencia del transporte realizado por los tejidos conductores del pedicelo.

Mediante la caracterización fenotípica de una muestra de mutantes, se encontró que las plantas mutantes P1B3.7.11, P40D11.5 y P40D7.12 fueron las que desarrollaron frutos de mayor tamaño; así mismo, también fueron los mutantes que mostraron un mayor rendimiento. Se encontró que la capacidad floemiana, el espesor del pericarpio y el área de las células del pericarpio tienen un efecto directo en la determinación del tamaño del fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate) cv. Micro-Tom. A su vez, estos factores, están determinados por las mutaciones *Sefl-Pruning*, *Dwarf* y *Miniature* presentes en el genoma de ‘Micro-Tom’. Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones en cuanto a los factores que determinan el desarrollo del fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate) y el rendimiento de la planta.

ABSTRACT

‘Micro-Tom’ is a *Solanum lycopersicum* (tomato) cultivar which has been taken as a model in many biotechnological studies realized recently in this species. It has been suggested that ‘Micro-Tom’'s dwarf phenotype is the result of three principal mutations on the gens *dwarf*, *miniature* and *self-pruning*.

This research aimed at the establishment of a relationship between the expression of these mutations with parameters that could influence the final fruit size and yield of this cultivar, as pericarp cells area, pericarp thickness and the transport efficiency of the conductive tissues of the pedicel.

By the phenotypic characterization, mutants P1B3.7.11, P40D7.12 P40D11.5 were found to develop larger fruits and therefore, they showed a higher yield performance. It was found that phloem efficiency, pericarp thickness and the area of the pericarp cells have an effect in determining the size of the fruit of *Solanum lycopersicum* (tomato) cv. Micro-Tom. In turn, these factors, are determined by the mutations *Self-Pruning*, *Dwarf* and *Miniature* in ‘Micro-Tom’'s genome. This work provides the basis for future research on the parameters that determine the development of the fruit of *Solanum lycopersicum* (tomato) and plant performance.

ABREVIATURAS

°Bx:	Grados Brix
°C:	Grados centígrados
μL:	Microlitro
μm:	Micrómetro
cm:	Centímetro
cv:	Cultivar
EMS:	Etilmetanosulfonato
FTA:	Fruit Texture Analyser
g:	Gramo
Kg:	Kilogramo
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	Segundo



CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

El tomate es una especie hortícola que, debido a sus características genéticas, constituye un sistema modelo para estudios del desarrollo en plantas, alternativo a *Arabidopsis thaliana*. En el caso del tomate, ubicado en el primer rango de producciones mundiales de frutos, los esfuerzos se han concentrado, durante los últimos años, en el mejoramiento de su calidad organoléptica. Hoy en día, uno de los principales objetivos consiste en maximizar el rendimiento, manteniendo su calidad nutricional.

‘Micro-Tom’ es un cultivar de *Solanum lycopersicum* (tomate) que se ha tomado como modelo en diferentes estudios biotecnológicos realizados recientemente en esta especie, ya que esta variedad, está adaptada para la utilización en laboratorio. Su fenotipo enano, su ciclo de vida corto, la facilidad de ser transformado mediante *Agrobacterium* y su alta densidad de producción en invernadero (~300 plantas/m²), son características que lo convierten en un buen sistema modelo, sobre todo para estudiar para el crecimiento del fruto de tomate.

Se ha sugerido que ‘Micro-Tom’ es el resultado de tres mutaciones principales: *dwarf*, *miniature* y *self-pruning*; sin embargo, estas mutaciones no han sido relacionadas con parámetros que podrían influir en el tamaño final del fruto y en el rendimiento de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

1.2 HIPÓTESIS

Si la presencia de tres mutaciones en el genoma de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’ determina cambios estructurales y fisiológicos, es posible que la caracterización fenotípica de una muestra de mutantes pueda ser de ayuda en la

determinación de parámetros que puedan influir en el tamaño final del fruto y en el rendimiento de la planta.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar parámetros relacionados con la expresión de tres genes en el fenotipo de una muestra de mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’, tales como el área de las células del pericarpio, el espesor del pericarpio y la eficiencia del transporte realizado por los tejidos conductores del pedicelo.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar las características fisicoquímicas de los frutos de una muestra de mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.
- Realizar un análisis de los tejidos conductores del pedicelo de una muestra de mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.
- Determinar el área de las células del pericarpio de los frutos de una muestra de mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.
- Determinar si la altura de la planta de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’ influye en la determinación del tamaño final del fruto.
- Relacionar la expresión de las mutaciones en los genes *Sefl-Pruning* (*sp*), *Dwarf* (*d*) y *Miniature* (*mnt*) del fenotipo de una muestra de mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’ con parámetros que podrían influir en el tamaño final del fruto y en el rendimiento de este cultivar.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Este proyecto de investigación permitirá identificar cómo las mutaciones en 3 genes del cultivar de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’, influyen en la determinación de su fenotipo, mediante la caracterización fenotípica de una muestra de mutantes de tomate ‘Micro-Tom’, desarrollada por la Unidad de Investigación de Biología del Fruto y Patología (BFP) del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA), Bordeaux, Francia.

La muestra agrupa un número considerable de fenotipos mutantes notablemente asociados a alteraciones en el tamaño final del fruto. Esta muestra también permitirá identificar parámetros importantes que están en relación con el crecimiento y el tamaño del fruto, como son el transporte de nutrientes hacia el fruto a través de los tejidos conductores, el área de las células del pericarpio y el espesor del pericarpio.

Mediante la caracterización fenotípica de esta muestra de mutantes, se podrá identificar los fenotipos que permitirían incrementar el rendimiento de la planta de tomate ‘Micro-Tom’, aumentando así la disponibilidad de los frutos en un corto periodo de tiempo.

1.5 ANTECEDENTES

El cultivar de tomate, ‘Micro-Tom’, fue producido inicialmente para propósitos ornamentales, mediante el cruce de los cultivares Florida Basket y Ohio 4013-3, y muestra un fenotipo enano con pequeños frutos (Scott et al., 1989).

Su pequeño tamaño, rápido crecimiento y fácil transformación, lo han convertido en un sistema modelo conveniente para realizar investigación sobre la regulación del desarrollo del fruto de tomate (Meissner et al., 1997). Se ha sugerido que el fenotipo de ‘Micro-Tom’ es el resultado de dos mutaciones recesivas: *dwarf* (*d*) y *miniature* (*mnt*)

(Meissner et al., 1997). También se ha reportado que existe otra mutación en el gen *self-pruning (sp)* (Pnueli et al., 1998).

Se ha encontrado que ‘Micro-Tom’ tiene resistencia contra *Fusarium wilt 1* (Scott et al., 1989).

Carvalho et al. (2010), demostraron que ‘Micro-Tom’ es una herramienta biológica útil para investigación vegetal, mediante la creación de una colección de mutantes con alteraciones en la producción de auxina, etileno, ácido abscísico, giberelinas, brasinoesteroides y en la respuesta a la luz..





CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 *Solanum lycopersicum* (TOMATE)

2.1.1 Taxonomía

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta de la familia de las solanáceas cultivada en todo el mundo por su fruto comestible. Se produce y consume en todo el mundo, tanto fresco como procesado de diferentes modos. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida* (Dicotiledónea)
- Subclase: *Asteridae*
- Orden: *Solanales*
- Familia: *Solanáceas*
- Género: *Solanum*
- Especie: *Solanum lycopersicum*

2.1.2 Origen y requerimiento climático

2.1.2.1 Origen

La planta de tomate es originaria de la costa del Pacífico, entre Ecuador y el norte de Chile, incluyendo las Islas Galápagos, en una elevación de aproximadamente 2000 msnm. Sin embargo, la domesticación y cultivo llevaron esta planta a México, de donde es originario su nombre (Giordano et al., 2010).

2.1.2.2 Requerimiento climático

El cultivo puede crecer bajo diferentes condiciones, pero las ideales son: elevada altura, baja humedad y alta luminosidad. En regiones con altitudes entre 500 y 900 msnm, la planta de tomate puede ser cultivada durante todo el año. A una altura inferior a 300 msnm, es preferible que el cultivo se realice en invierno y a una altura superior a 1200 msnm, es mejor que la planta sea cultivada en verano (Henriques da Silva et al., 2008). De todos los factores climáticos, la temperatura es el más crucial, ya que se ha observado que hay un mayor crecimiento cuando la temperatura se encuentra entre 19 y 28°C (Jones et al., 1991).

El requerimiento de temperatura de la planta de tomate varía con el desarrollo de ésta. En la fase de germinación, la temperatura ideal es 16 – 19°C. Cerca a 5°C o 40°C, la germinación es inhibida. Para el desarrollo de la planta, el rango de temperatura ideal es 21 – 24°C y para el desarrollo del fruto, la temperatura óptima es 24°C durante el día y 14 – 17°C en la noche. Con temperaturas mayores a 35°C en el día y 30°C en la noche, ocurre el aborto del fruto y una baja liberación y germinación de granos de polen. El efecto negativo de estas temperaturas es más intenso desde el día 8 hasta el día 13 después de la anthesis (Jones et al., 1991).

El rango ideal de temperatura para la formación de licopeno, el carotenoide principal responsable del intenso color rojo del fruto, es 20 – 24°C durante el día y alrededor de 18°C en la noche. Temperaturas superiores a 30°C inhiben la formación de licopeno y favorecen la formación de otros carotenoides, que dan un color amarillo – naranja al fruto (Jones et al., 1991).

2.1.3 Características de la planta de tomate.

Según Olimpia et al. (2000), el sistema radicular del tomate consiste en una raíz principal de la que salen las raíces laterales. La mayor parte de este sistema, se

encuentra entre los cinco a treinta y cinco centímetros de profundidad, pero algunas raíces pueden alcanzar más de un metro.

La parte adulta del tallo es semileñosa y en contacto con el suelo emite raíces adventicias con facilidad.

La planta puede emitir de seis a catorce hojas verdaderas antes de producir su primera inflorescencia. Las flores están formadas por seis sépalos, seis pétalos amarillos unidos en su base. Se presentan generalmente seis estambres que envuelven totalmente al estilo y al estigma, lo cual contribuye a la polinización (Olimpia et al., 2010).

2.1.4 Composición nutricional y color del fruto de tomate

2.1.4.1 Composición nutricional

El tomate está compuesto en su mayoría por agua (93-95%). El resto de constituyentes incluye compuestos inorgánicos (5-7%), ácidos orgánicos (ácido cítrico y ácido málico), azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), sólidos solubles (proteínas, celulosa, pectina y polisacáridos), carotenoides y lípidos (Preed et al., 2008). Aunque el tomate no es rico en nutrientes esenciales para los requerimientos humanos, posee muchas propiedades importantes, incluyendo abundancia de potasio (Grierson et al., 1986), elemento importante para el control de la presión osmótica de la sangre, el buen funcionamiento de los riñones y las contracciones musculares del corazón (Anderson et al., 1998).

• Carotenoides

El carotenoide licopeno es responsable del color rojo del fruto y constituye el 75 – 83% del total de carotenoides. El pigmento β -caroteno es responsable del color

amarillento y representa el 3 – 7% de carotenoides (Dorais et al, 2001). El licopeno se encuentra en grandes concentraciones, pero sólo en un número restringido de vegetales. El tomate es la principal fuente de este compuesto debido a que posee una gran cantidad de éste, lo cual, sin embargo, depende de la época de cosecha, la ubicación geográfica y del genotipo de la planta. Las concentraciones más elevadas se han encontrado en cultivares salvajes, casi el doble de las concentraciones encontradas en cultivares comerciales (Dorais et al, 2001). En el organismo humano, el licopeno está presente en elevadas concentraciones en el plasma sanguíneo, actuando como antioxidante.

El contenido de β -caroteno determina la actividad de la vitamina A, la cual ha sido citada como importante en la prevención de enfermedades coronarias y cáncer (Abdulnabi et al, 1996). La concentración de β -caroteno varía considerablemente entre las especies, cultivares o linajes de tomate. Según Stevens et al. (1986), la concentración de β -caroteno es hasta 100 veces mayor en progenie obtenida a partir del cruzamiento de la especie domesticada *L. esculentum* y la especie salvaje *L. hirsutum*.

- Vitaminas

Además de la vitamina A, las vitaminas más importantes en la constitución del fruto son la vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (ácido pantoténico), B6, niacina, ácido fólico, biotina, vitamina C (ácido ascórbico) y vitamina E (α -tocoferol). Diversos estudios han reportado la importancia de la vitamina C en la dieta humana, citada principalmente por su actividad antioxidante (Abdulnabi et al, 1996).

Además de las sustancias mencionadas, existen otras características importantes que deben ser consideradas para obtener cultivares con alta aceptación en el mercado, tanto para consumo del fruto fresco como en forma procesada. Algunas de estas características, son el contenido de sólidos solubles, pH, acidez total y color.

- Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles es una de las principales características de los frutos. Es esta fracción donde se encuentran los azúcares y ácidos, los principales componentes que están relacionados con el sabor del fruto. También son indicadores de la calidad de los frutos para el procesamiento. Mientras mayor sea el contenido de sólidos solubles, mayor será el rendimiento industrial. En términos prácticos, por cada grado Brix (porcentaje de sólidos solubles como indicador del sabor del fruto) que aumente en el fruto de tomate, hay un aumento de 20% en el rendimiento industrial. Este contenido, además de ser una característica genética del cultivar, está influenciado por las condiciones edafoclimáticas de la región donde se cultive la planta (Preed et al., 2008).

- Azúcares

Los azúcares reductores como glucosa y sacarosa representan el 50% del contenido de materia seca del fruto, el resto son proteínas, pectina, celulosa, hemicelulosa, ácidos orgánicos, minerales, pigmentos, vitaminas y lípidos. La concentración de azúcar varía en gran medida en función del cultivar y las condiciones de cultivo. De acuerdo con Dorais et al. (2001), la concentración de azúcares puede variar desde 1,66% hasta 3,99% y 3,05% a 4,65% del total de materia fresca, en función del cultivar y las condiciones de cultivo, respectivamente.

- Ácidos orgánicos

Así como los azúcares, los ácidos orgánicos son cruciales para el sabor del fruto. Hay una variación continua en la acidez del fruto durante su desarrollo y maduración. Ésta se incrementa con el crecimiento del fruto hasta alcanzar su máximo con el desarrollo de la coloración, y disminuye con el avance de la maduración (Stevens, 1972).

Entre los ácidos presentes en el fruto de tomate, los principales son el ácido cítrico y el ácido málico, siendo el ácido cítrico predominante sobre el ácido málico (Bertin et al, 2000). Cualquier cambio en el contenido de ácido cítrico y/o málico alterará el grado de acidez del fruto, alterando de esta forma su sabor. Es importante resaltar que el potasio presente en el fruto está relacionado de manera positiva con la reducción de desórdenes en la maduración e incrementa la concentración de ácido en el fruto (Ho, 1996). En general, se desea que el pH de la pulpa de tomate sea inferior a 4.5. Bajo estas condiciones, el desarrollo de microorganismos dañinos para la conservación de los productos procesados es inhibido (Ho et al., 1986).

2.1.4.2 Color del fruto de tomate

El color de los frutos es un parámetro esencial para el consumo del fruto fresco y también para la industria. Los consumidores asocian las características del color de los alimentos con otros atributos de calidad, como el sabor y el valor nutricional. El color del tomate está dado por clorofilas (pigmento verde), carotenoides (principalmente licopeno y β -caroteno) y xantofilas (pigmento amarillo). El color verde del fruto inmaduro se debe a la clorofila, cuyo nivel disminuye con la maduración del fruto. Cuando el fruto comienza a madurar, se produce un color amarillo (β -caroteno), el cual se vuelve más aparente con la disminución de la concentración de clorofila. Poco después se produce un rápido aumento en la concentración de licopeno, el cual otorga el color rojo al fruto (Ho et al., 1986).

2.1.4.3 Factores que afectan la calidad del fruto

La influencia de la temperatura en el metabolismo es directa, afectando estructuras celulares y otros componentes que determinan la calidad del fruto, como su color, tamaño y propiedades organolépticas. El color del fruto se desarrolla mejor en

ambientes con temperaturas entre 12 y 21°C. Temperaturas por debajo de 10°C y por encima de 30°C inhiben el desarrollo normal del fruto y la síntesis de licopeno. La biosíntesis de β -caroteno aparentemente es menos sensible a la temperatura. Como consecuencia de la maduración bajo condiciones sub-óptimas de temperatura, los frutos adquieren un color naranja (Stevens et al., 1986). Se ha demostrado que temperaturas cercanas a 23°C aumentan la calidad del fruto (Dorais et al, 2001).

La humedad relativa del aire también afecta la composición de los frutos. Bajo condiciones de baja humedad relativa (15-22%), el crecimiento de la planta también disminuye, así como el tamaño del fruto y la producción total. Bajo condiciones de elevada humedad relativa, hay una disminución en la transpiración de la planta y en la absorción de nutrientes (Dorais et al, 2001).

La intensidad de la luz también afecta la composición de los frutos de tomate. Del total de la radiación luminosa que llega a la planta en un invernadero, cerca del 80% es absorbido (Dorais et al, 2001). Del total de la radiación absorbida, una pequeña porción (5%) es utilizada en reacciones biológicas como la fotosíntesis, y a mayor porción es disipada por transpiración.

Una alta intensidad de luz en la planta puede afectar el contenido de azúcares solubles (Davies et al., 1981), ácido ascórbico (Giovanelli et al, 1998) y pigmentos (licopeno) disponibles para el fruto. Una baja intensidad de luz reduce la síntesis de pigmentos, resultando en plantas con una coloración desigual. Aunque, la formación de carotenoides en los frutos maduros no requiere ser inducida por la luz, los frutos sombreados tienen un contenido de carotenoides más bajo (Dorais et al, 2001).

La intercepción de luz por la planta puede verse alterada por la densidad de la planta. El aumento de la densidad está positivamente relacionada con la producción de frutos, pero negativamente relacionada con el tamaño del fruto debido al ineficiente aporte de asimilados hacia los frutos (Dorais et al, 2001).

2.2 ANATOMÍA Y DESARROLLO DEL FRUTO DE TOMATE

2.2.1 Anatomía del fruto de tomate

El fruto es un órgano especializado que provee a las semillas un ambiente favorable para su maduración y dispersión (Gillaspy et al., 1993).

El fruto de tomate consiste en el pericarpio y las semillas. El pericarpio puede ser dividido en: exocarpio, mesocarpio y endocarpio (Rančić et al., 2010).

Las células exteriores del pericarpio constituyen la epidermis y por debajo hay dos o tres capas de células con paredes celulares muy delgadas y actividad mitótica (Lemaire-Chamley et al., 2005). La epidermis no posee estomas, pero tiene una cutícula relativamente delgada. El espesor de esta cutícula incrementa con el crecimiento del fruto (Rančić et al., 2010).

El mesocarpio está compuesto por células grandes de pared celular delgada y por tejido vascular. El tejido vascular está conectado al tejido vascular del pedicelo (Bussieres, 1994). Una rama vascular pasa a través del mesocarpio hacia las semillas, mientras que otras ramas vasculares pasan a través de la capa más externa del mesocarpio, paralela a la superficie del fruto.

El endocarpio es una capa unicelular que limita las cavidades loculares (Rančić et al., 2010).

El septo carpelar divide al ovario en dos o más lóculos. La placenta central con semillas unidas a ella, está compuesta de tejido parenquimatoso, el cual después llena las cavidades loculares (Rančić et al., 2010).

2.2.2 Desarrollo del fruto de tomate

De acuerdo a Gillaspy et al. (1990), el crecimiento y desarrollo del fruto de tomate puede ser dividido en cuatro fases:

- Primera fase: desarrollo del ovario y fertilización.
- Segunda fase: Empieza inmediatamente después de la fertilización. En el ovario comienza la división celular que dura entre 7 y 10 días, seguida por la diferenciación de los tejidos y el desarrollo de las semillas y del embrión. El número de divisiones celulares y la duración de esta fase puede variar de acuerdo al fruto, y ambos factores determinarán el tamaño final del fruto. Después de la fase de división celular, el fruto incrementará su tamaño durante 6 o 7 semanas debido al aumento del volumen celular, hasta que el fruto alcanza su tamaño final. El tamaño del tejido locular y del mesocarpio pueden incrementarse hasta 10 veces gracias a la elongación celular.

En el tomate, el aumento del tamaño de las células del fruto puede alcanzar hasta mil veces el tamaño inicial de una célula. Esta variación en el tamaño de las células es acompañada de un aumento del nivel de ploidía nuclear (Joubès et al., 1999; Cheniclet et al., 2005). Esta ploidía resulta de la capacidad de las células de modificar su ciclo celular clásico, en un ciclo alterado en el cual la síntesis de ADN se desarrolla de manera independiente, en ausencia de mitosis. Este ciclo celular se denomina ciclo de endoreduplicación (Cheniclet et al., 2005).

- Tercera fase: se produce cuando el fruto ha alcanzado casi su tamaño final y es de color verde.
- Cuarta fase: comienza cuando el fruto ha alcanzado su tamaño final. El desarrollo del fruto continúa con la maduración, en el momento en el que la entrada de carbohidratos se detiene y el fruto cambia de color de verde a naranja y finalmente a rojo. El primer cambio de color es consecuencia de la transformación de cloroplastos en cromoplastos, disminuyendo así la concentración de clorofila y el aumento de la concentración de β -caroteno que da el color naranja al fruto. El color rojo final del fruto, se debe a la alta concentración de licopeno. Simultáneamente se producen cambios metabólicos, como la desintegración de las paredes internas y centrales de los carpelos que se

vuelven gelatinosas. Se produce un aumento de la síntesis de etileno, de la respiración y del contenido de azúcar.

Uno de los factores que condicionan crecimiento del fruto de tomate es la elasticidad de las células del exocarpio. Las células parenquimatosas del mesocarpio, que crecen rápidamente, ejercen presión sobre el exocarpio (Rančić et al., 2010), y ésta es la razón por la cual las propiedades mecánicas del exocarpio son importantes en el control del crecimiento del fruto.

2.2.3 Tinción del Pericarpio: Colorante Calcoflúor.

El colorante blanco fluorescente Calcoflúor permite la rápida detección de células, levaduras, hongos y organismos parásitos. Es un fluorocromo que se une fuertemente a la celulosa y quitina presente en las paredes celulares. Es utilizado en biología vegetal para la tinción de algas y plantas superiores (Harrington et al, 2003).

Este colorante debe ser almacenado a temperatura ambiente y protegido de la luz, para evitar su descomposición.

2.3 ANATOMÍA DEL PEDICELO DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO

El pedicelo es una pequeña porción de tallo que soporta las flores y fruto de la planta. A través de él llegan los nutrientes requeridos por el fruto para su desarrollo (Combe, 1976).

En la superficie del pedicelo se encuentra la epidermis, compuesta por células largas cubiertas con cutícula y una cantidad relativamente pequeña de estomas (Rančić et al., 2010). En la epidermis encontramos dos tipos de pelo: pelos largos multicelulares no glandulares y tricoma glandular. Debajo de la epidermis, hay varias capas de células de clorénquima.

El xilema secundario ya está bien desarrollado cuando el fruto alcanza un tamaño entre 6 – 10 mm y en secciones transversales del pedicelo es evidente el anillo de tejido de xilema. En el lado externo del xilema, se encuentra el floema formando un anillo discontinuo separado del xilema por parénquima (Rančić et al., 2010).

Los elementos del xilema secundario y el floema empujan al xilema primario hacia el centro del pedicelo. La parte central del pedicelo (médula) está formada por células parenquimatosas de gran tamaño (Rančić et al., 2010) (Figura 1).

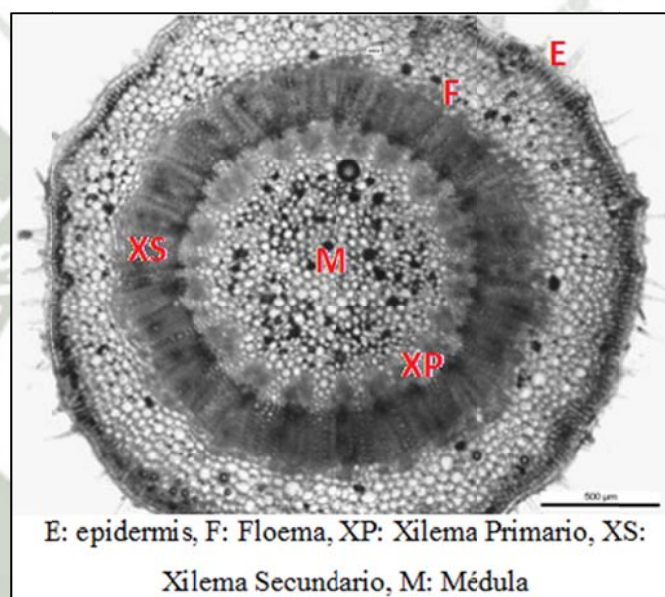


Figura 1. Estructura del Pedicelo del fruto de *Solanum lycopersium* (tomate).

Fuente: Rančić et al., 2008.

Durante la cuarta fase del desarrollo del fruto de tomate, se produce un cambio dramático en la proporción del transporte realizado por el xilema y el floema. La repentina reducción en el transporte de nutrientes hacia el fruto realizado por el xilema, es percibido como una mecanismo para aislar hidráulicamente al fruto y protegerlo del estrés ambiental experimentado por la planta (Rančić et al., 2010).

Greespan et al. (1994), usando técnicas de balance de masa, reportaron cambios importantes en el rol del xilema y floema en el transporte de agua hacia el fruto en la maduración. Durante la primera fase del crecimiento del fruto, el xilema provee la mayor cantidad de agua. En la fase final del crecimiento, es el floema el que provee más del 80% del requerimiento de agua, y la contribución del xilema se vuelve insignificante.

2.3.1 Xilema

El xilema es el tejido conductor de agua y solutos desde la región de absorción a la de evaporación. El flujo en el xilema es unidireccional (Arbo, 2011).

2.3.1.1 Origen del xilema

El xilema consta generalmente de una parte temprana, el protoxilema, que se diferencia en las partes primarias del cuerpo de la planta que no han completado su desarrollo, y el metaxilema, que madura luego que se ha completado el alargamiento del protoxilema (Arbo, 2011).

2.3.1.2 Tipos de células que componen en xilema

El xilema está formado por cuatro tipos de células: traqueidas, elementos vasculares, fibras y parénquima xilemático. En el xilema, sólo las células del parénquima están vivas (Salisbury et al., 2000). Son las traqueidas y los elementos del vaso, los que participan en el transporte de la savia del xilema y tienen células alargadas. Ambos funcionan como elementos muertos; es decir, después de que se hayan producido debido al crecimiento y la diferenciación de las células meristemáticas, mueren y sus protoplastos los absorben otras células. Sin embargo,

antes de morir, se producen algunas modificaciones en las paredes de dichos elementos., que son importantes para que el agua fluya a través de ellos.

Las células parenquimatosas se encuentran en el xilema primario y secundario. Conservan el citoplasma vivo, y por lo tanto el núcleo (Salisbury et al., 2000).

2.3.2 Floema

El floema es el sistema conductor que trasfiere los productos de la fotosíntesis desde las hojas maduras a las áreas en crecimiento y a las áreas de almacenamiento, incluyendo a las raíces. Los azúcares fabricados durante el proceso de fotosíntesis en las hojas son transportados por el floema a través de los nervios de la hoja y el peciolo, distribuyéndose por los tallos y otras partes de la planta. El sentido del transporte es fundamentalmente hacia abajo (desde las hojas a las raíces), pero también hacia zonas superiores (sumideros metabólicos, como meristemas, zonas jóvenes en crecimiento o flores y frutos en formación) (Salisbury et al., 2000).

2.3.2.1 Tipos de células que componen el floema

Los elementos cribosos o miembros del tubo criboso, que son células vivas alargadas, casi siempre sin núcleo, son en las que realmente se produce el transporte. Estas células se encuentran unidas por sus extremos formando largos agregados celulares denominados tubos cribosos. Sobre las paredes laterales existen áreas con poros más pequeños, que se denominan células cribosas en lugar de elementos cribosos (Salisbury et al., 2000).

También forman parte del floema las células acompañantes, que se encuentran asociadas muy directamente con los elementos cribosos o las células cribosas, y que poseen un citoplasma relativamente denso y núcleos que se pueden apreciar con claridad. Todavía no se conoce la función exacta de estas células, pero siempre

están presentes, siendo viables en el floema funcional, y degradadas en el floema senescente. Casi siempre tienen la misma concentración de azúcares que los elementos cribosos asociados (Salisbury et al., 2000).

Otro tipo de células presentes en este tejido, son las células parenquimatosas del floema, que son células de paredes finas. Se comportan como elementos de almacenamiento y de transporte lateral de agua.

Finalmente, las fibras del floema, que a veces se agrupan para formar un haz. Como en otros tejidos, son células de paredes gruesas que proporcionan firmeza vegetal (Salisbury et al., 2000).

2.3.2.2 Descarga del floema

La descarga se produce a través de los tubos cribosos, en las regiones vertedero. En los vertederos, la sacarosa y otros solutos se metabolizan (que se utilizan en la respiración, se convierten en almidón, etc.) o se cargan activamente en las vacuolas de las células de almacenamiento (Salisbury et al., 2000).

2.3.2.3 Control de la composición del fruto

Como los frutos tienen una velocidad de transpiración baja o nula, estos órganos subsisten a base de una dieta de savia del floema. La savia del floema aporta aproximadamente el 98% del carbono, el 89% del nitrógeno que entran en el fruto provenientes de la planta materna (Salisbury et al., 2000).

La savia del floema cambia significativamente su composición mientras circula desde las hojas hacia los frutos. La savia del floema que entra en los frutos en desarrollo está más diluida en sacarosa y es mucho más rica en algunos aminoácidos que la propia savia que se exporta desde las hojas. Al parecer, cuando

la savia pasa por el tallo, la sacarosa se pierde mediante transferencia hacia el tejido contiguo, y se cargan aminoácidos en el floema. Los aminoácidos deben provenir de las reservas acumuladas en los tallos, pero que originalmente se obtienen de la savia del xilema. Las proporciones entre la sacarosa y los aminoácidos también van cambiando con el tiempo (Salisbury et al., 2000).

2.3.3 Transporte de agua y solutos durante el desarrollo del fruto.

Aunque la fotosíntesis realizada por los frutos de tomate inmaduros no es despreciable, ésta sólo representa una pequeña parte del total del peso seco (menos del 10%), y el crecimiento del fruto de tomate depende principalmente del aporte de agua, minerales y nutrientes de las demás partes de la planta. La mayoría de material, de los cuales depende el crecimiento del fruto, es transportada desde el tallo hacia al fruto a través del pedicelo, por el xilema y el floema. El transporte en los frutos de tomate realizado por el xilema y el floema ocurre en la misma dirección, de tal forma que el fruto acumula continuamente agua y transpira (Rančić et al., 2010).

El fruto puede perder agua en dos formas: por transpiración y por el xilema, del fruto hacia el tallo. El fruto de tomate tiene una baja transpiración porque su cutícula es muy fina y no posee estomas. En las bayas, el xilema y el floema participan en el suministro de agua, pero en diferentes cantidades, dependiendo del estado del desarrollo del fruto. En frutos jóvenes, durante su desarrollo, ocurre una transición del transporte de xilema a floema (Rančić et al., 2010). Durante el desarrollo del fruto, se produce un aumento del transporte de agua del floema desde aproximadamente 85% hasta aproximadamente 95%, mientras que el suministro de agua por el xilema prácticamente se detiene 25 días después de la floración. La reducción del transporte realizado por el xilema ocurre debido a la zona de abscisión del pedicelo, ya que en esta zona hay una alta resistencia al agua (Rančić et al., 2010).

Diversos estudios anatómicos del xilema en pedicelos de frutos han demostrado que hay un área de xilema reducida en la zona de abscisión (Figura 2). Cerca a la zona de abscisión

termina el 90% de los vasos y también se ha observado que su diámetro se encuentra reducido en esta zona. La resistencia hidráulica del pedicelo aumenta dos veces en la zona de abscisión en comparación a las zonas más cercanas al tallo principal.

Por otro lado, se ha demostrado que en el último estadio del desarrollo del fruto, el agua fluye por el xilema pero ésta no entra al fruto, lo que indica que en esta fase del desarrollo, el xilema no es funcional. Después de que el transporte de agua por el xilema se detiene, el transporte realizado por el floema continúa debido a que éste último sigue siendo funcional, gracias a su estructura, ya que el floema está constituido por células vivas con paredes celulares elásticas que pueden resistir el crecimiento del fruto sin ser dañadas (Rančić et al., 2010).

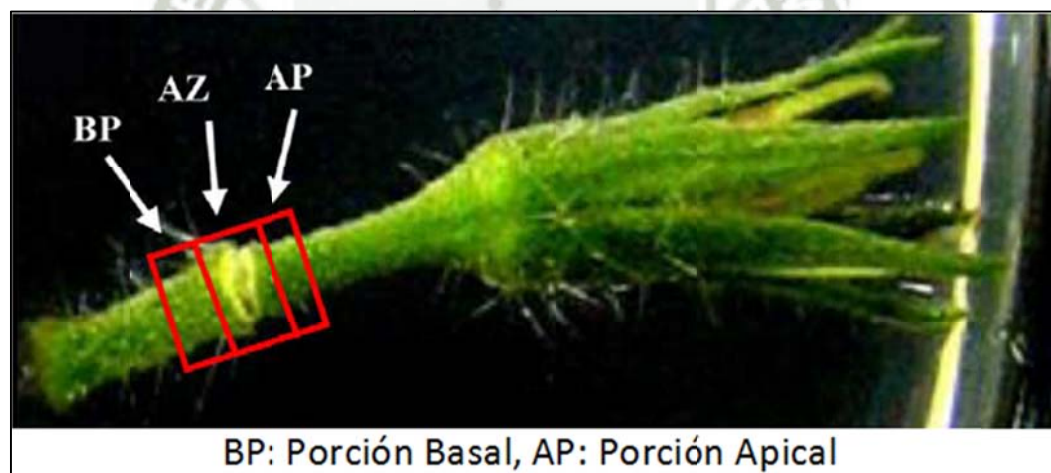


Figura 2. Zona de abscisión del pedicelo de *Solanum lycopersicum* (tomate).

Fuente: Wang et al., 2013

2.4 DESCRIPCIÓN DE LA VARIEDAD ‘MICRO-TOM’.

El cultivar de tomate ‘Micro-Tom’ fue producido con fines ornamentales mediante el cruzamiento de los cultivares Florida Basket y Ohio 4013-3, y presenta un fenotipo enano que produce frutos pequeños (Scott et al., 1989).

La variedad ‘Micro-Tom’ es una variedad enana de *Solanum lycopersicum*, que ha sido propuesta como la variedad de preferencia para llevar a cabo investigación molecular. Su pequeño tamaño, crecimiento rápido y fácil transformación lo han convertido en un sistema modelo para investigación en la regulación del desarrollo de frutos en forma de baya. Las plantas de ‘Micro-Tom’ son pequeñas y de aspecto tupido. Sus hojas son pequeñas, rugosas y de color verde oscuro (Martí et al., 2006).

El fenotipo de ‘Micro-Tom’ es el resultado de dos mutaciones principales: *dwarf* (*d*) y *miniature* (*mnt*) (Meissner et al., 1997). También se ha reportado que existe una mutación en el gen *Self-Pruning* (*sp*) (Pnueli et al., 1998).

La mutación *mnt* es responsable de un desequilibrio hormonal que provoca la reducción de la longitud internodal (Marti et al, 2006).

SP pertenece a una familia de genes que codifican para unas proteínas que determinan el potencial del crecimiento continuo del meristemo apical (Pnueli et al., 2001). La mutación *SP* provoca que el ápice deje de desarrollarse y de producir meristemas axilares.

El gen Dwarf (*D*) está involucrado en la biosíntesis de brasinoesteroides (Bishop et al., 1999). En el tomate, *D* está expresado en todos los órganos de la planta, principalmente en los tejidos vegetativos y reproductivos (Montoya et al., 2005). La mutación *d* se ha utilizado durante bastante tiempo para crear variedades enanas de tomate (Nadzhimov et al., 1988; Bishop, 2003). La mutación *d* provoca una pérdida de 14 bases en el genoma de ‘Micro-Tom’, en comparación con el genoma del tipo

salvaje. Esta mutación es la más estudiada y la responsable del pequeño tamaño de la planta.

Existen otros alelos presentes en ‘Micro-Tom’: *uniform ripening (u)*, *Stemphylium resistance (Sm)*, e *Immunity to Fusarium (I)*, los cuales confieren la ausencia de “hombros” verdes en los frutos, y resistencia a los hongos patógenos *Stemphylium solani* y *Fusarium oxysporum f. lycopersici*, respectivamente (Campos et al., 2010).

2.5 IMPORTANCIA DE LA MEDIDA DE DUREZA DE FRUTOS PARA EL CONTROL DE SU MADURACIÓN

La dureza o firmeza del fruto está en relación directa con la cohesión de las células y el espesor de sus membranas. La medición de la dureza es importante por distintas razones: puede ser un factor indicador del momento de cosecha e informar sobre el estado de madurez del fruto y reflejar la resistencia del fruto (Kojima et al, 1991).

Durante la maduración del fruto, una actividad intensa se produce en su interior, la cual da como resultado una serie de cambios importantes (de color, forma, textura, etc.). Es necesario tener valores objetivos para poder evaluar la evolución de la maduración del fruto y de esta forma, poder tomar las decisiones adecuadas tanto sobre el momento óptimo de su cosecha, como sobre los procesos posteriores.

La firmeza o dureza del fruto, medida con un penetrómetro, es uno de los parámetros que informa sobre el estado de maduración. Se trata de una de las técnicas más utilizadas para su control. Normalmente, la dureza del fruto que se mide con el penetrómetro, disminuye en función del proceso de maduración.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la dureza de un mismo tipo de fruto puede variar de acuerdo a condiciones generales, como la variedad o la región de cultivo, o bien por razones más específicas, como el calibre o la temperatura del fruto en el momento de

realizar la medición, ya que mientras más grande sea el fruto, o la temperatura sea más elevada, el fruto tendrá una dureza menor (Clemente, 2010).

Por otro lado, la no-dureza de los frutos puede darse debido a cambios en la presión de turgencia y en la composición de las paredes celulares, ocasionando cambios en los tejidos que provocan el ablandamiento del fruto (Clemente, 2010).





CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CAMPO DE VERIFICACIÓN

3.1.1 Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología del Fruto y Patología (BFP) del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA), Villenave d'Ornon, Bordeaux, Francia.

3.1.2 Ubicación espacial

El Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA) se encuentra ubicado en 71 Rue Édouard Bourlaux 33140 Villenave-d'Ornon, Bordeaux, Francia

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material vegetal

Se utilizó una colección de diez mutantes EMS de *Solanum lycopersicum* (tomate), 'Micro-Tom' desarrollada por la Unidad de Investigación de Biología del Fruto y Patología (BFP) del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA), Villenave d'Ornon, Bordeaux, Francia.

El material vegetal comprendió tres plantas por cada tipo de mutante y tres plantas no mutantes (Wild Type) de la variedad 'Micro-Tom'. Cada planta tenía seis frutos.

Los mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) cv. 'Micro-Tom' que fueron utilizados son los siguientes:

- Mutante P11C11.11.1.
- Mutante P12H11.4.
- Mutante P1B3.7.11.
- Mutante P24C3.4.

- Mutante P29C1.7.
- Mutante P3C6.1.
- Mutante P3D3.12.
- Mutante P40D11.5.
- Mutante P40D7.12.
- Mutante P6C7.5.

3.2.2 Material de vidrio

- Láminas cubreobjetos.
- Láminas portaobjetos.
- Lunas de reloj.

3.2.3 Equipos

- Balanza analítica.
- Cámara fotográfica para microscopio marca SPOT RT3.
- Centrífuga de laboratorio marca Eppendorf, modelo 5418.
- Estufa.
- Microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot.
- Penetrómetro marca Fruit Texture Analyser.
- Vibratomo marca Microm, modelo HM 650V.

3.2.4 Software

- Cellset v.1.5.1.0.
- Fruit Texture Analyser Win.

- ImagePro-Plus v.6.0.0.260.
- R v. 2.14.1.
- SPOT Advanced v.5.1.

3.2.5 Colorantes

- Azul de Toluidina.
- Calcoflúor.

3.2.6 Otros

- Agua Ultra Pura.
- Bisturí.
- Cámara fotográfica.
- Cuchillo.
- Micropipeta de 200 μ L marca Eppendorf.
- Micropipeta de 1000 μ L marca Eppendorf.
- Papel aluminio.
- Pegamento para tejidos marca Loctite.
- Pincel.
- Pinzas.
- Prensador de ajos.
- Refractómetro digital marca Euromex.
- Regla de 30 cm.
- Tijeras.
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Vernier.

3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.3.1 Parámetros de invernadero

El material vegetal se encontraba ubicado en el invernadero número 1 del Instituto Nacional de Investigación Agronómica (INRA), de la ciudad de Bordeaux, Francia. (Figura 3). El material vegetal fue sembrado el día 18 de marzo de 2013.

Las condiciones bajo las cuales se mantuvo el material vegetal fueron las siguientes:

- Temperatura diurna: 24 – 27°C.
- Temperatura nocturna: 18°C.
- Humedad Relativa: 70%.
- Duración de iluminación: 20 horas.



Figura 3. Invernadero N° 1 del Instituto Nacional de Investigación Agronómica – Bordeaux.

El material vegetal fue sembrado en pequeñas macetas de polipropileno, como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Material vegetal de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom', Wild Type.

3.3.2 Distribución de los frutos para cada análisis:

Cada mutante contó con 18 frutos en total, repartidos equitativamente en 3 plantas por mutante (Figura 5).

Los frutos y flores que se desarrollaron después de tener 6 frutos por planta, fueron eliminados para suprimir el efecto de competición entre los distintos mutantes y el Wild Type.

Los frutos fueron distribuidos de la siguiente manera para la ejecución de los diferentes análisis:

- Determinación de la dureza de los frutos: se utilizaron 10 frutos por mutante.
- Determinación de la cantidad de sólidos solubles: Los frutos utilizados para la determinación de la dureza fueron los mismos que se utilizaron para la determinación de la cantidad de sólidos solubles (Índice de Refracción).

- Análisis de los tejidos conductores del pedicelo: se utilizaron 3 frutos por mutante.
- Determinación del área de las células del pericarpio: se utilizaron 2 frutos por mutante.
- Seguimiento de la maduración: se utilizó 1 fruto por mutante.



Figura 5. Material vegetal de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Para evitar confusiones, se colocó un aro de plástico alrededor del pedicelo de cada fruto, de diferente color, como se muestra en la figura 6.

3.3.3 Recolección de frutos para los diferentes análisis.

La recolección de los frutos fue realizada en el invernadero y éstos fueron transportados a los laboratorios en pequeñas macetas de polipropileno, debidamente rotulados.



Figura 6. Distinción de frutos para realizar los distintos análisis.

Los análisis se realizaron inmediatamente después de que los frutos fueron recolectados, con el fin de conservar sus propiedades. Los frutos fueron cortados utilizando unas tijeras, tratando de realizar el corte lo más cerca posible al tallo principal, para que el fruto no perdiera agua y mantuviera sus propiedades hasta que el análisis hubiera finalizado (Figura 7).



Figura 7. Recolección de frutos en invernadero.

3.3.4 Seguimiento de la maduración de los frutos

3.3.4.1 Determinación del estado *breaker*.

Una vez que el fruto ha alcanzado su tamaño final, comienza el proceso de maduración. En este momento, el color del fruto es verde debido a la presencia de clorofila. El estado *breaker* marca el comienzo de la maduración, la síntesis de clorofila se detiene, dando lugar a la producción de β -caroteno, un compuesto que va a otorgar al fruto un color amarillo.

El estado *breaker* fue determinado en el invernadero. Este estado fue reconocido por la aparición de un halo de color amarillo claro en el fruto. Este halo puede aparecer en cualquier parte del fruto (Figura 8).

3.3.4.2 Seguimiento de la maduración.

Se escogió un fruto por mutante, el cual no fue cortado, para realizar un seguimiento fotográfico de la maduración, una vez que el fruto hubo alcanzado el estado *breaker*.

El seguimiento de la maduración se realizó diariamente, hasta que se observó que el fruto ya no cambiaba de color.



Figura 8. Determinación del estado *breaker* de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

3.3.5 Determinación de las características fisicoquímicas de los frutos de tomate.

Estas mediciones se realizaron cuando el fruto alcanzó el estado *breaker*, ya que una vez alcanzado este estado, comienza la maduración del fruto y éste ya no puede aumentar su masa.

3.3.5.1 Determinación del peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto.

3.3.5.1.1 Determinación del peso fresco de los frutos: Se determinó el peso fresco (g) de todos los frutos, una vez que éstos fueron recolectados, utilizando una balanza analítica. Para realizar este análisis se separaron los sépalos y el pedicelo.

3.3.5.1.2 Determinación del diámetro de los frutos: Se midió el diámetro (mm) de cada fruto, utilizando un vernier como se muestra en la figura 9. El diámetro fue medido por la parte más ancha del fruto.



Figura 9. Determinación del diámetro de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

3.3.5.1.3 Determinación del número de lóculos de los frutos: Para determinar el número de lóculos de los frutos, se realizó un corte ecuatorial transversal.

3.3.5.2 Determinación de la dureza del fruto de tomate:

Durante la maduración del fruto, una actividad intensa se produce en su interior, la cual da como resultado una serie de cambios importantes en su textura. La dureza o firmeza del fruto está en relación directa con la cohesión de las células y el espesor de sus membranas. Por otro lado, la no-dureza de los frutos puede darse debido a cambios en la presión de turgencia y en la composición de las paredes celulares, ocasionando cambios en los tejidos que provocan el ablandamiento del fruto.

La determinación de la dureza se realiza con un penetrómetro, el cual mide la fuerza necesaria para penetrar el fruto hasta cierta profundidad, con un bastón de metal.

Éste análisis se realizó con 10 frutos por mutante.

3.3.5.2.1 Recolección de los frutos:

Los frutos fueron recolectados siete días después de que hubieron alcanzado el estado *breaker*, ya que si eran tomados días antes, éstos podían encontrarse aún muy duros y al realizar la determinación de dureza, se habrían obtenido resultados incorrectos. Si los frutos eran tomados días después, el fruto ya se encontraría demasiado maduro, y al momento de realizar el análisis, el fruto podía reventar.

La separación del fruto de la planta se realizó utilizando unas tijeras y con un corte lo más próximo posible al tallo principal para evitar el deterioro del fruto.

3.3.5.2.2 Determinación de la dureza de los frutos:

Se utilizó un penetrómetro para la determinación de dureza de los frutos recolectados.

Cada fruto fue colocado en la platina del penetrómetro y las mediciones de dureza fueron realizadas sobre los lóculos. Se realizaron tres mediciones por fruto.

Este equipo utiliza el programa Fruit Texture Analyser para la recolección de los resultados.

3.3.5.3 Determinación de la cantidad de Sólidos Solubles del fruto de tomate.

Los sólidos solubles son componentes solubles en agua y representan aproximadamente el 75% del peso fresco del fruto maduro. Los grados Brix indican el contenido de sólidos solubles presentes en una solución y pueden ser medidos utilizando un refractómetro. Un grado Brix corresponde a un gramo de sólidos solubles en un gramo de solución.

Una vez realizado el análisis de penetrometría para determinar la dureza de los frutos, se utilizaron los mismos frutos para determinar la cantidad de sólidos solubles presentes.

Para determinar la cantidad de sólidos solubles se realizó la medición del Índice de Refracción del fruto, del pericarpio y del gel para determinar si había alguna diferencia en el contenido de sólidos solubles de estos tres.

3.3.5.3.1 Preparación del material vegetal.

Cada futo utilizado en este análisis fue cortado por la mitad utilizando un cuchillo de mesa. Una de las mitades del fruto fue utilizada para la determinación del Índice de Refracción del fruto y la otra mitad fue utilizada para medir el índice de refracción del gel y del pericarpio.

3.3.5.3.2 Medición del índice de refracción del gel:

Para determinar el índice de refracción del gel, se colocó una gota de éste directamente en el refractómetro (Figura 10).



Figura 10. Determinación del contenido de sólidos solubles del gel de los frutos mutantes y Wild Type.

3.3.5.3.3 Medición del Índice de Refracción del pericarpio:

Se tomó la misma mitad del fruto que fue utilizada para medir el índice de refracción del gel y se separaron las semillas y el resto de gel, de tal manera que sólo quedara el pericarpio. El pericarpio fue apretado utilizando un prensador de ajos (Figura 11).



Figura 11. Preparación del pericarpio para realizar la determinación del contenido de sólidos solubles en frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

La muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para ser centrifugada durante dos minutos, a 14000 rpm. Se colocó una gota del sobrenadante en el refractómetro para determinar el índice de refracción del pericarpio.

3.3.5.3.4 Medición del índice de refracción del fruto:

Para determinar el índice de refracción del fruto, se tomó la otra mitad de fruto que no fue utilizada y sin quitar las semillas ni el gel, ésta fue apretada utilizando un prensador de ajos.

Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 14000 rpm durante dos minutos.

Se colocó una gota del sobrenadante en el refractómetro para determinar el índice de refracción del pericarpio (Figura 12).

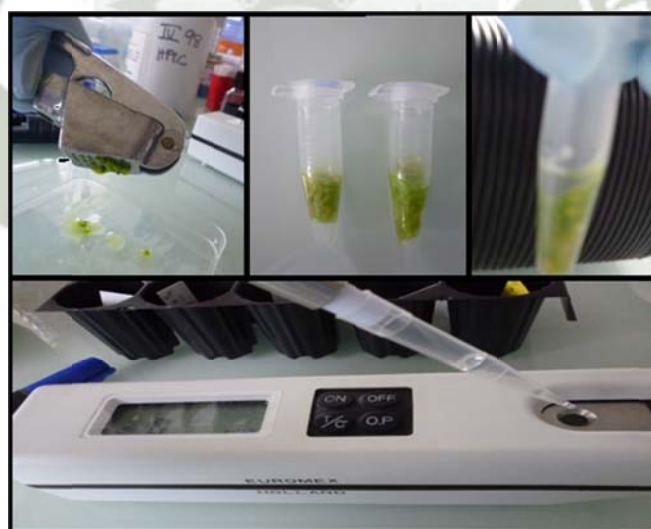


Figura 12. Determinación de la cantidad de sólidos solubles de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

3.3.6 Análisis de los tejidos conductores del pedicelo.

El análisis de los tejidos conductores del pedicelo se realizó con 3 frutos por mutante y 3 frutos Wild Type. Este análisis se realizó una vez que los frutos alcanzaron el estado *breaker*.

Se realizó este análisis con la finalidad de determinar el área total del pedicelo, el área de los tejidos conductores (xilema y floema) y la capacidad floemiana para conocer la eficiencia del transporte realizado por el floema.

3.3.6.1 Obtención de los frutos: Los frutos fueron recolectados una vez que hubieron alcanzado el estado *breaker*. Para separar el fruto de la planta, se utilizaron unas tijeras. El corte se realizó lo más próximo posible al tallo principal, para evitar el deterioro de los tejidos y del fruto.

3.3.6.2 Preparación del material vegetal: Se separó manualmente el pedicelo del fruto. Utilizando una hoja de bisturí se tomó la porción ubicada entre la zona de abscisión y los sépalos.

El corte se hizo lo más plano posible, para evitar problemas de corte con el equipo Vibratomo y para que al momento de analizar la muestra no hubieran capas de células superpuestas.

3.3.6.3 Preparación del equipo Vibratomo:

Se colocaron 500 mL de agua ultra pura en la cubeta del equipo y se ajustaron los parámetros de la manera siguiente (Figura 13):

- Velocidad de corte: $40 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

- Frecuencia de corte: $50 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Espesor del corte: $70 \mu\text{m}$.



Figura 13. Vibratomo Microm, modelo HM 650V.

3.3.6.4 Cortes de pedicelo.

Se seleccionó el programa “corte por corte” del equipo Vibratomo. Con este programa, los cortes no eran realizados de forma continua, sino más bien, una vez realizado el corte, éste podía ser recuperado y en caso hubiera errores en el corte, por ejemplo, que no fuera un corte plano o estuviera incompleto, los parámetros podían ser corregidos.

Luego, se colocó una hoja de afeitar en el portacuchillas, asegurándose de que la cuchilla se hubiera asentado firmemente contra el tope.

Se pegó la muestra en la platina del equipo Vibratomo utilizando una gota de pegamento para tejidos “Loctite” (Figura 14).

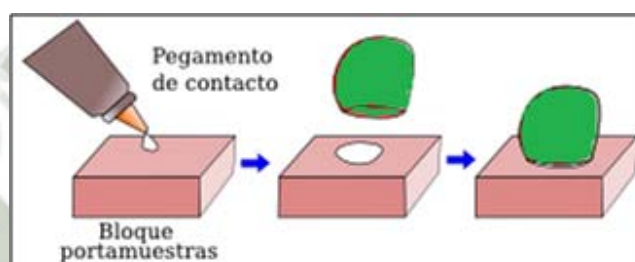


Figura 14. Fijación de la muestra en la platina del Vibratomo Microm HM 650V.

Se esperó hasta que la muestra estuviera fija y el pegamento seco para después sumergir la platina en la cubeta con agua ultra-pura. Se sumergió el portacuchillas en el agua ultra pura. Se realizaron cortes de pedicelo de 50 μm hasta que la superficie de la muestra estuviera plana y se obtuvieran secciones completas. Se realizaron cortes de pedicelo de un espesor de 70 μm . Las muestras se recuperaron del agua utilizando un pincel pequeño, teniendo cuidado de no dañar los tejidos (Figura 15).

Para realizar cortes de distintas muestras se cambió la hoja de afeitar, para evitar que una hoja usada dañara los tejidos.

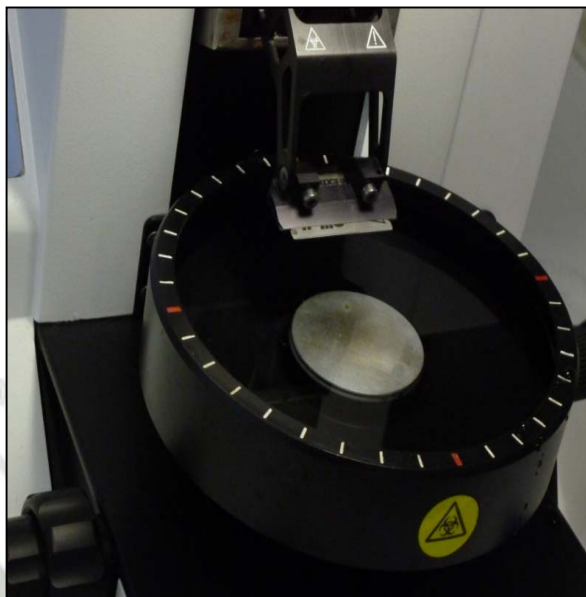


Figura 15. Obtención de cortes de pedicelo utilizando el equipo Vibratomo Microm HM 650 V.

3.3.6.5 Tinción de los cortes de pedicelo.

Las muestras fueron transferidas a una luna de reloj conteniendo el colorante azul de toluidina. La tinción se realizó durante 20 segundos y se transfirieron las muestras a otra luna de reloj conteniendo agua ultra pura, para eliminar el exceso de colorante. Las muestras fueron recuperadas y colocadas en láminas portaobjetos. Se cubrieron las muestras con láminas cubreobjetos.

3.3.6.6 Adquisición de imágenes a analizar.

Las muestras fueron observadas inmediatamente utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot en fondo claro junto con la cámara para microscopio SPOT RT3 (Figura 16).

Para la observación de las muestras se utilizó el objetivo intercambiable de 2.5X.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software SPOT Advanced versión 5.1. El brillo y las interferencias fueron corregidos para obtener una imagen nítida. Las imágenes fueron guardadas en formato .TIFF.



Figura 16. Microscopio Zeiss Axiophot y cámara SPOT RT3 para la adquisición de imágenes de cortes de pedicelo.

3.3.6.7 Análisis de imágenes.

Las imágenes adquiridas fueron analizadas utilizando el software ImagePro-Plus versión v.6.0.0.260. Se calibró la imagen de acuerdo al aumento utilizado, para obtener los resultados en μm .

La tinción del pedicelo con el colorante Azul de Toluidina permite identificar los tejidos conductores (xilema y floema). El xilema secundario o metaxilema se observa como un anillo de color azul y el floema se encuentra en la parte externa del metaxilema, y puede ser reconocido por el anillo de color violeta que forma.

3.3.6.8 Determinación del área total del pedicelo.

Una vez que la imagen fue calibrada, en el menú *Count/Size* se seleccionó la opción “*Draw/Merge objects*” para dibujar el perímetro del pedicelo (Figura 17). Al momento de realizar el trazo, los tricomas no fueron considerados y también se omitió el exceso de colorante que se encontraba alrededor del pedicelo y que daba la impresión de ser una capa celular.

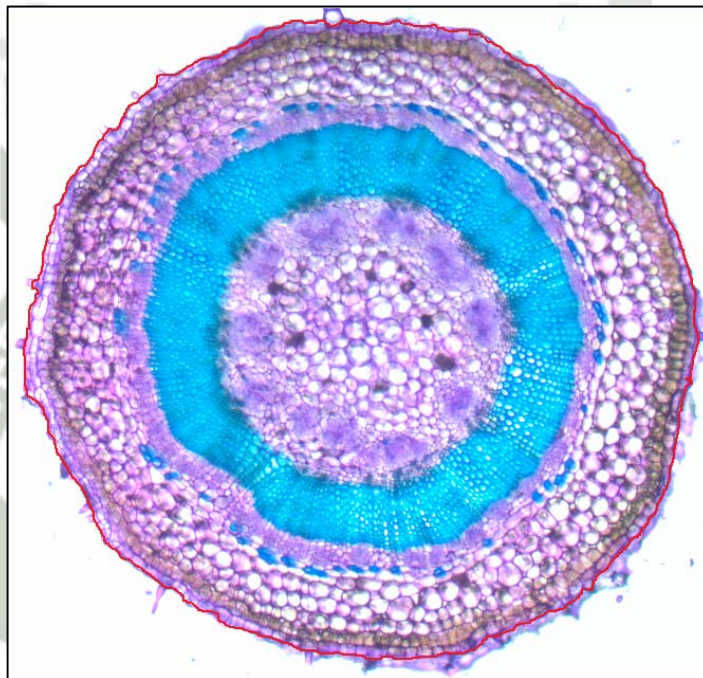


Figura 17. Determinación del área total del pedicelo de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’. El perímetro del pedicelo se encuentra marcado de color rojo.

Se calculó el área del xilema utilizando la función “Data Collector”. Los resultados fueron exportados a un Libro Excel para ser analizados.

3.3.6.9 Determinación del área del xilema.

Se seleccionó la opción “*Draw/Merge objects*” para dibujar los bordes interno y externo del xilema (Figura 18).

Se tuvo en cuenta el área del metaxilema (xilema secundario).

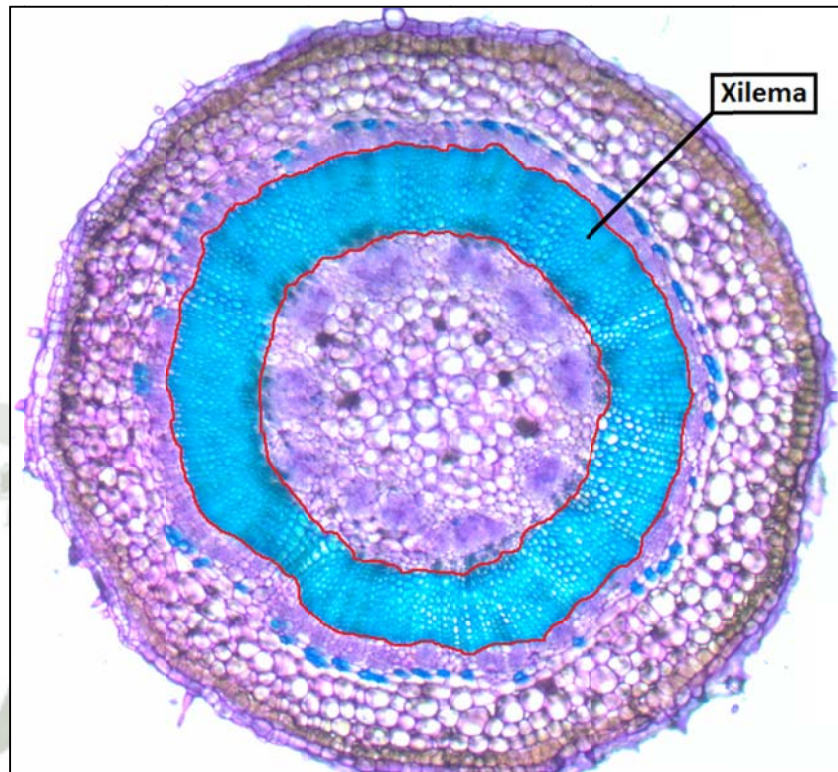


Figura 18. Determinación del área del xilema de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'. El xilema se encuentra delimitado por los bordes de color rojo.

Se calculó el área del xilema utilizando la función "Data Collector". Los resultados fueron exportados a un Libro Excel para ser analizados.

3.3.6.10 Determinación del área del floema.

Utilizando la función "Draw/Merge objects" se dibujó el borde externo del floema. Las células del esclerénquima no fueron consideradas.

El borde interno correspondía al borde externo del xilema que se había dibujado anteriormente (Figura 19).

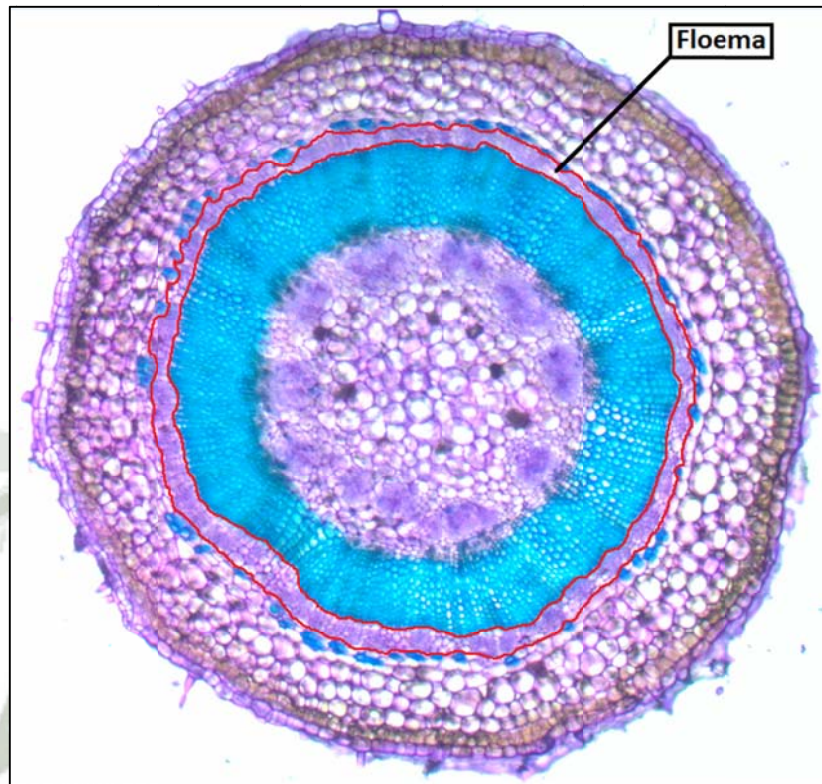


Figura 19. Determinación del área del floema de frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’. El floema se encuentra delimitado por los bordes de color rojo.

Se calculó el área del xilema utilizando la función “Data Collector”. Los resultados fueron exportados a un Libro Excel para ser analizados.

3.3.6.11 Determinación de la capacidad floemiana.

La capacidad floemiana fue calculada dividiendo el peso seco del fruto entre el área del floema.

- *Determinación del peso seco del fruto*: Los frutos fueron colocados en una estufa a 80°C durante 30 horas y transcurrido este tiempo, se determinó el peso seco.
- *Cálculo de la capacidad floemiana*: Se determinó la capacidad floemiana del pedicelo de acuerdo a la siguiente fórmula (Rančić et al, 2010):

$$\text{Capacidad floemiana} = \frac{\text{Peso seco, g}}{\text{Área del floema, g} \cdot \mu\text{m}^{-2}}$$

3.3.7 Análisis de células del pericarpio.

A partir de dos frutos por mutante, se realizó el análisis de las células del pericarpio.

3.3.7.1 Obtención de los frutos.

Los frutos fueron tomados cuando alcanzaron el estado *breaker*. Utilizando unas tijeras se realizó un corte lo más próximo posible al tallo principal para evitar el deterioro del fruto.

Es importante que los frutos sean recolectados en un estado temprano de maduración, máximo 2 días después de alcanzado el estado *breaker*, ya que éstos poseen un pericarpio duro que puede ser utilizado para realizar los cortes con el equipo Vibratomo.

3.3.7.2 Preparación del material vegetal.

El fruto fue dividido por la zona ecuatorial, utilizando una hoja de bisturí. Se intentó de hacer este corte lo más plano posible.

Se separó el gel del pericarpio y se cortaron pequeñas porciones de pericarpio de aproximadamente 5 mm de largo posicionándose entre dos haces vasculares. Estos cortes también tuvieron que ser lo más planos posibles para que al momento de analizar las imágenes no hubieran capas de células superpuestas.

3.3.7.3 Preparación del equipo Vibratomo:

Se colocaron 500 mL de agua ultra pura en la cubeta del equipo y se ajustaron los parámetros de la manera siguiente:

- Velocidad de corte: $40 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Frecuencia de corte: $50 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Espesor del corte: $150 \mu\text{m}$.

3.3.7.4 Cortes de pericarpio.

Se seleccionó el programa “corte por corte” del equipo Vibratomo y se colocó una hoja de afeitar en el portacuchillas, asegurándose de que la cuchilla se hubiera asentado firmemente contra el tope.

Se pegó la muestra en la platina del equipo Vibratomo utilizando una gota de pegamento para tejidos “Loctite”. Se esperó hasta que la muestra estuviera fija y el pegamento seco para después sumergir la platina en la cubeta con agua ultra-pura. Se sumergió el portacuchillas en el agua ultra pura. Se realizaron cortes de pericarpio de $50 \mu\text{m}$ hasta que la superficie de la muestra estuviera plana y se obtuvieran secciones completas.

Se realizaron cortes de pericarpio de un espesor de $150 \mu\text{m}$. Las muestras se recuperaron del agua utilizando un pincel pequeño, teniendo cuidado de no dañar los tejidos.

Para realizar cortes de distintas muestras se cambió la hoja de afeitar, para evitar que una hoja usada dañara los tejidos.

3.3.7.5 Tinción de los cortes de pericarpio.

Las muestras fueron colocadas en una lámina portaobjetos y la tinción se realizó directamente en la lámina aplicando el colorante calcoflúor con una micropipeta de 200 μ L. Aproximadamente se utilizaron 150 μ L de colorante por cada muestra. La tinción se realizó durante 5 minutos.

Seguidamente, se eliminó el exceso de colorante realizando dos enjuagues con agua ultra pura y también se eliminó el exceso de agua. Se cubrió la muestra con una lámina cubreobjetos.

3.3.7.6 Adquisición de imágenes a analizar.

Las muestras fueron observadas inmediatamente utilizando el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot y una lámpara de luz ultravioleta, junto con la cámara para microscopio SPOT RT3. Las imágenes fueron observadas utilizando un filtro azul y los objetivos de 5.0X o 10X, dependiendo del tamaño de la muestra.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software SPOT Advanced versión 5.1. Se corrigió el brillo y las interferencias para obtener una imagen nítida.

Se tomó la porción de pericarpio donde no hubieran haces vasculares que interfirieran con el análisis de las imágenes. Las imágenes fueron guardadas en formato .TIFF.

3.3.7.7 Análisis de imágenes.

Las imágenes adquiridas fueron analizadas utilizando el software ImagePro-Plus versión v.6.0.0.260, con el cual se determinó el espesor del pericarpio, el número de capas celulares y el área de las células del pericarpio. También se utilizó el software Cellset versión 1.5.1.0 para delimitar las paredes celulares de las células del pericarpio antes de que éstas fueran analizadas en el software ImagePro-Plus.

El colorante blanco fluorescente Calcoflúor permite la rápida detección de células, debido a que posee un fluorocromo que se une fuertemente a la celulosa presente en las paredes celulares. Mediante la tinción de las paredes celulares de las células del pericarpio, se pudo determinar el espesor de éste, así mismo, el área de las células del pericarpio y el número de capas celulares que lo conforman.

3.3.7.8 Determinación del espesor del pericarpio y el número de capas celulares del pericarpio.

Utilizando el programa ImagePro-Plus se calibró la imagen de acuerdo al aumento de los objetivos utilizados, para obtener los resultados en μm .

3.3.7.8.1.1 Determinación del espesor del pericarpio

Utilizando la herramienta “*Measure distance*” se trazó una línea transversal de un extremo a otro del pericarpio y se determinó el espesor del pericarpio (Figura 20). El resultado fue mostrado en μm .

3.3.7.8.1.2 Determinación del número de capas celulares del pericarpio:

Tomando como guía la línea transversal trazada en la determinación del espesor del pericarpio, se contó el número de células adyacentes a esta línea (Figura 21).

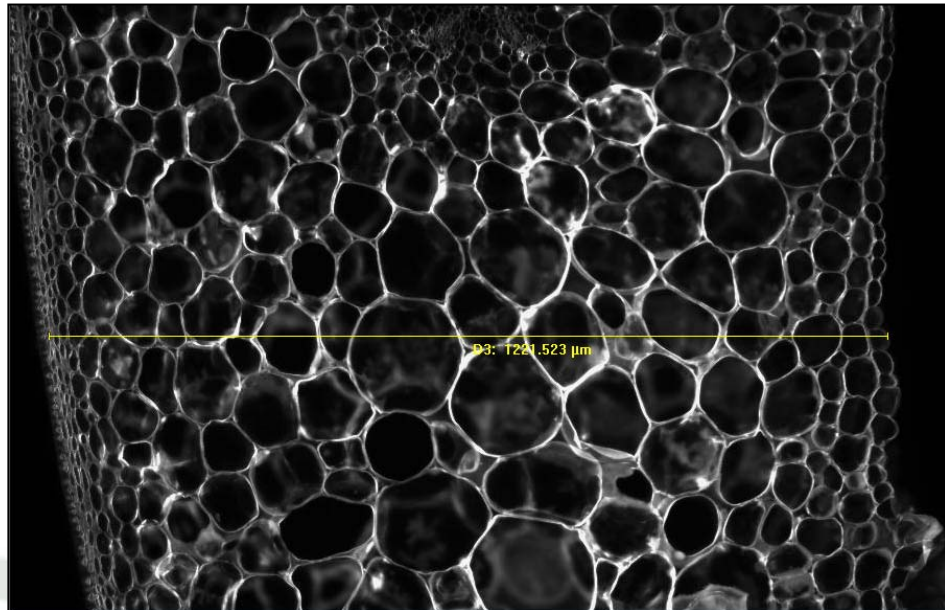


Figura 20. Determinación del espesor del pericarpio en un corte histológico de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

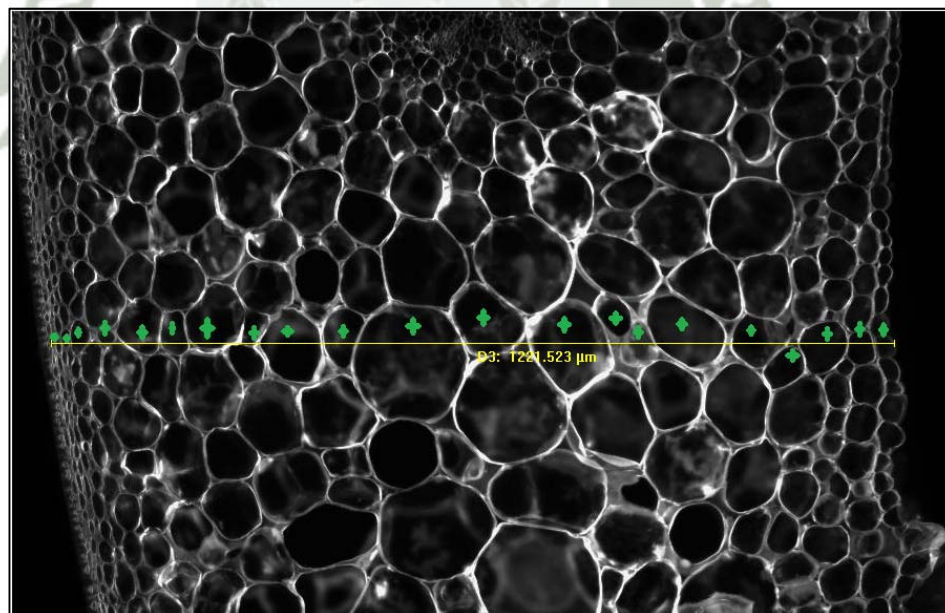


Figura 21. Determinación del número de capas celulares del pericarpio en un corte histológico de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

3.3.7.9 Determinación del área de las células del pericarpio:

Utilizando el programa ImagePro-Plus se tomó la sección más nítida de la imagen de pericarpio a analizar. Esta sección fue guardada en formato .JPG y analizada con el software Cellset. Se modificó el contraste de la imagen, si era necesario, para mejorar su nitidez. Seguidamente, se utilizó la función “*Default segmentation*” para el reconocimiento y delimitación de las paredes celulares (Figura 22).

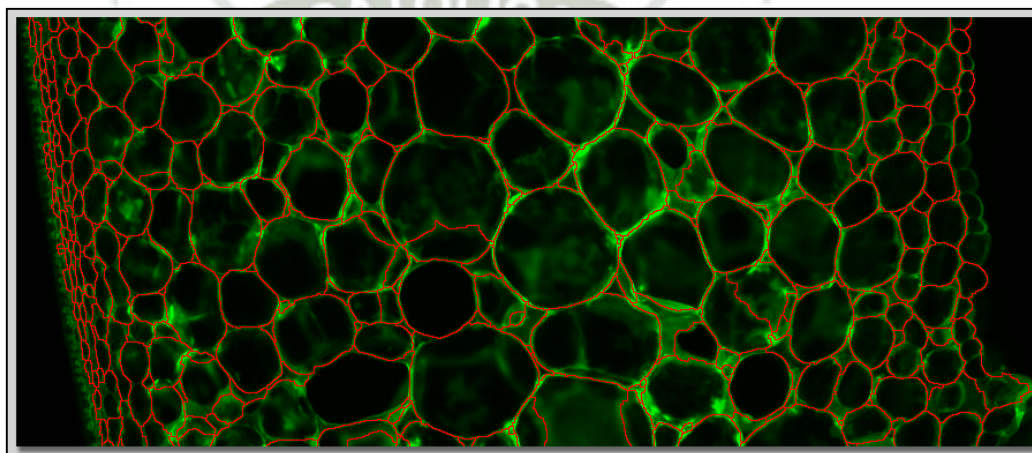


Figura 22. Reconocimiento de las paredes celulares del pericarpio por el programa Cellset, en un corte histológico de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Una vez realizada la segmentación, se hicieron modificaciones, tales como la adición o eliminación de segmentos para corregir posibles errores, y se obtuvo la segmentación final de las células del pericarpio (Figura 23).

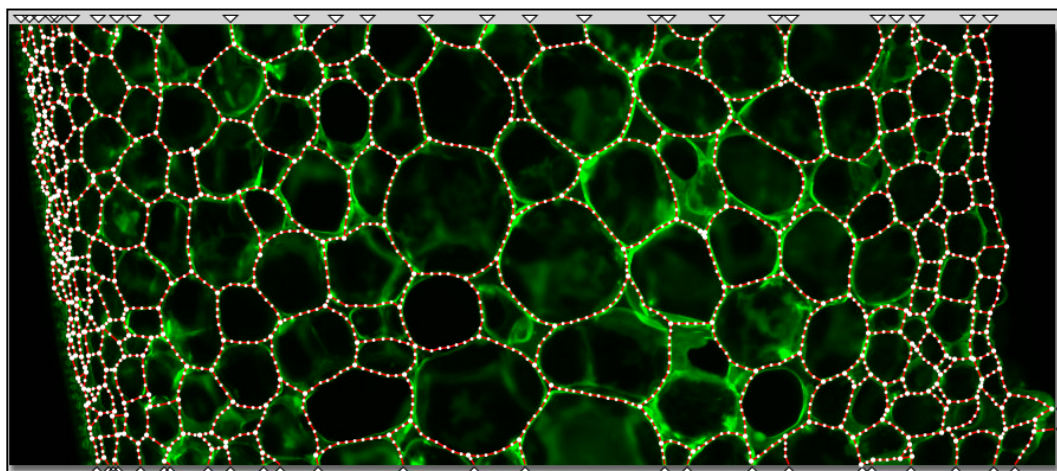


Figura 23. Segmentación celular final de las células del pericarpio en un corte histológico de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Para exportar la imagen, se seleccionó la opción “Cell walls” y se obtuvo una imagen en fondo claro en formato .TIFF (Figura 24), que fue analizada con el software ImagePro-Plus.

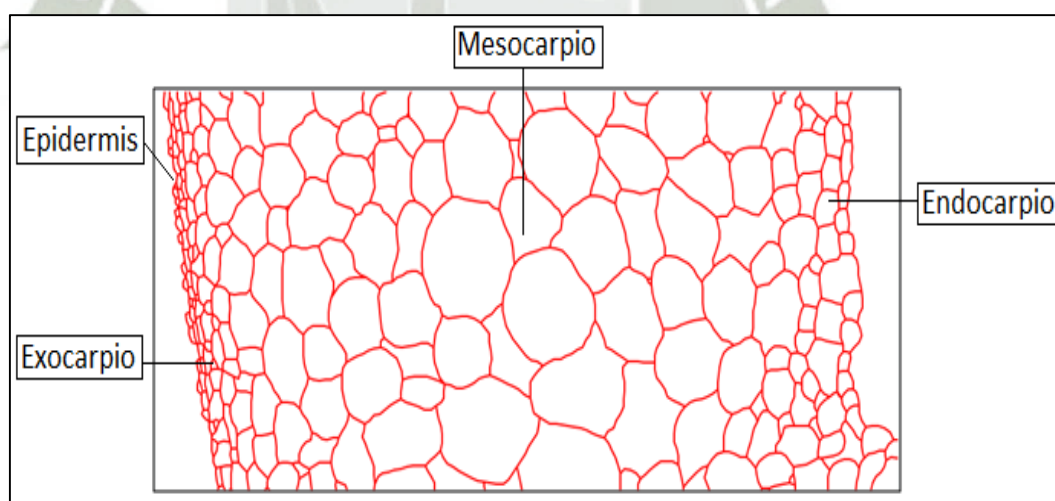


Figura 24. Imagen de segmentación celular del pericarpio de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’ utilizada para determinar el área de las células.

Con la herramienta “*Count/size*” se realizó un conteo de las células que conforman el pericarpio (Figura 25) y utilizando la herramienta “*Data collector*” se calculó el área promedio de las células. Los resultados se exportaron a un Libro Excel para ser analizados.

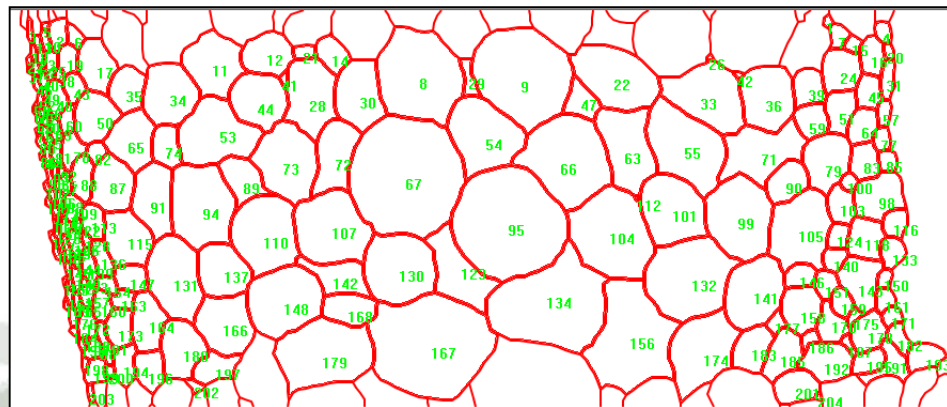


Figura 25. Conteo de las células que conforman el pericarpio en un corte histológico de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

3.3.8 Medición de la altura de las plantas de tomate ‘Micro-Tom’

Una vez que todos los frutos fueron utilizados en los diferentes análisis, se realizó la medición de la altura de todas las plantas con una regla. La medida fue tomada desde el inicio del tallo hasta el extremo apical.

3.3.9 Determinación del rendimiento de las plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

El rendimiento de cada mutante y del Wild Type fue determinado por el peso total de los seis frutos de cada planta y se expresó como el promedio de las tres plantas.

3.3.10 Relación entre las mutaciones *Self-Pruning* (*sp*), *Dwarf* (*d*) y *Miniature* (*mnt*) y los parámetros que podrían influir en el tamaño final del fruto y el rendimiento de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Se estableció una relación entre las mutaciones en los genes *Self-Pruning* (*sp*), *Dwarf* (*d*) y *Miniature* (*mnt*) con las características de cada uno de los 10 tipos de mutante de la colección, tomando en cuenta las características fisicoquímicas del fruto, el análisis de los tejidos conductores del pedicelo, el análisis de las células del pericarpio, la altura de las plantas y el seguimiento de la maduración de los frutos.

3.3.11 Análisis estadístico de los resultados.

Se utilizó el software R v.2.14.1 para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, mediante el Test de Wilcoxon.



CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DEL ESTADO BREAKER DE LOS FRUTOS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) ‘MICRO-TOM’

La cuarta fase del desarrollo del fruto de tomate corresponde a la maduración. Esta etapa comienza cuando el fruto ha alcanzado su tamaño final y es reconocida por un cambio de color en el fruto. Este cambio de color es de verde a amarillo claro y se da aproximadamente en el 10% de la superficie del fruto y se denomina estado *breaker*. El estado *breaker* de los frutos fue reconocido por la aparición de un halo de color amarillo. Este halo podía aparecer en cualquier parte del fruto.

La aparición de este halo dependió de cada tipo de mutante, como se observa en la tabla N° 1. Los resultados están expresados en los días que demoró la aparición del estado *breaker*, después de la floración, y como el promedio de los 18 frutos por mutante.

Tabla N° 1. Aparición del estado *breaker* en los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

MUTANTE	<i>Breaker</i> (días después de la floración)
P11C11.11.1	38 ± 4.64
P12H11.4	36 ± 1.94
P1B3.7.11	38 ± 2.23
P24C3.4	32 ± 1.57
P29C1.7	40 ± 2.45
P3C6.1	38 ± 3.52
P3D3.12	32 ± 2.92
P40D11.5	39 ± 2.61
P40D7.12	37 ± 4.91
P6C7.5	36 ± 4.43
WILD TYPE	35 ± 2.40

Valores promedio seguidos por la desviación estándar ($p < 0.05$, Test Wilcoxon).

Como se observa en la tabla anterior, hubo cierta diferencia en el tiempo que tomaron los frutos de cada mutante para alcanzar su tamaño máximo.

Sin embargo, esta diferencia entre en Wild Type y los distintos mutantes no fue muy grande, ya que el tiempo que tomaron los frutos Wild Type para alcanzar el estado breaker, fue 35 días después de la floración, mientras que en el caso del mutante P29C1.7 el tiempo fue 40 días, sólo 5 días más que el Wild Type. Los mutantes que alcanzaron su tamaño final en un tiempo menor que el Wild Type fueron los mutantes P3D3.12 y P24C3.4, con una diferencia de sólo 3 días.

En el caso de los frutos de los mutantes P3D3.12 y P24C3.4, la transformación de cloroplastos en cromoplastos se dio más rápido en los frutos mutantes que en los frutos Wild Type, disminuyendo de esta forma la concentración de clorofila y aumentando la concentración de β -caroteno, que da el color amarillo al fruto (Gillaspy et al., 1990), y por esta razón, el estado *breaker* apareció en los frutos mutantes que en los frutos Wild Type.

Por el contrario, en el caso de los frutos que alcanzaron el estado *breaker* después que los frutos Wild Type la transformación de los cloroplastos en cromoplastos se dio de una forma más lenta que en el caso de los frutos Wild Type y por esta razón, los frutos de estos mutantes alcanzaron su tamaño final después que los frutos Wild Type.

De acuerdo a Stevens et al. (1986), la concentración de β -caroteno varía considerablemente entre las especies o cultivares, ya que depende de la estructura genética de la planta. Debido a que las plantas de la muestra presentan mutaciones en su genoma, se pueden esperar diferencias en el tiempo en el que alcanzan su tamaño final o que aparezca el estado *breaker*, entre cada mutante y el Wild Type.

4.2 MADURACIÓN DE LOS FRUTOS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) 'MICRO-TOM'.

La maduración del fruto comienza una vez que éste ha alcanzado su tamaño final y es de color verde. Se produce un cambio de color de forma gradual: el fruto cambia de color de verde a naranja y finalmente a rojo.

Se realizó un seguimiento de la maduración de un fruto por cada tipo de mutante, para determinar si había alguna diferencia en el tiempo de maduración de cada uno, en comparación con el Wild Type.

Como se observa en la Figura 26, la maduración de los frutos Wild Type tardó aproximadamente 7 días después de haber alcanzado el estado *breaker*.



Figura 26. Seguimiento de la maduración de fruto Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Se observó que los mutantes P1B3.7.11, P3C6.1 y P11C11.11.1 no mostraron diferencia en el tiempo de maduración con respecto al Wild Type, como se muestra en la figura 27, ya que sus frutos alcanzaron la maduración 7 días después del estado *breaker*.

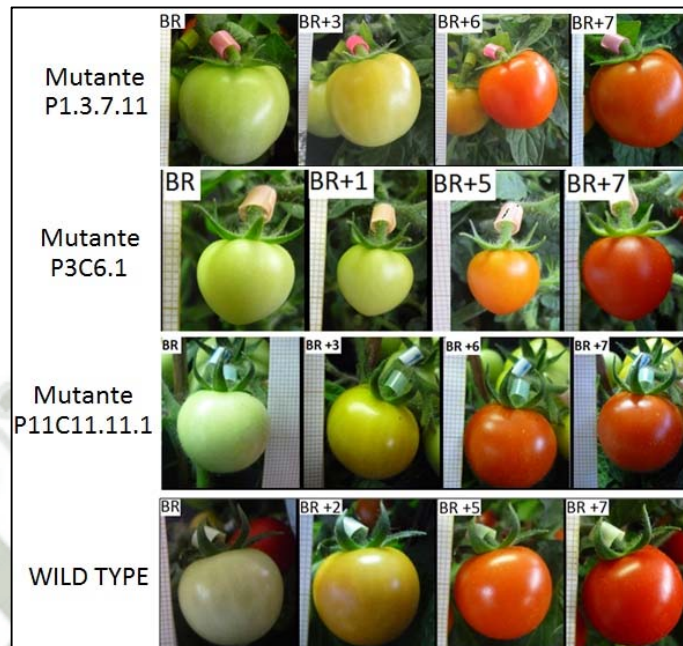


Figura 27. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P1B3.711, P3C6.1 y P11C11.11.1 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Sin embargo, se observaron diferencias en el tiempo de maduración de la mayoría de mutantes en comparación con el Wild Type.

Los frutos del mutante P29C1.7 alcanzaron la maduración 6 días después de la aparición del estado *breaker* (Figura 28), es decir 1 día antes que los frutos Wild Type. El mutante P29C1.7 fue el único que desarrolló frutos con una maduración más rápida que la de los frutos Wild Type, por lo tanto, la producción de licopeno en estos frutos se da de una forma más rápida que en el resto de las plantas de la muestra.

Los 6 mutantes restantes de la muestra tardaron más de una semana en madurar. Los mutantes P6C7.5 y P24C3.4 tardaron 8 días en madurar después de que alcanzaron el estado *breaker*, es decir un día más que el Wild Type (Figura 28). Los mutantes P12H11.4, P40D7.12 y P40D11.5 tardaron 9 días en madurar, luego de haber alcanzado el estado *breaker* (Figura 29).

En el caso del mutante P40D7.12 se observó que hasta el sexto día de maduración, el cambio de color del fruto era lento con respecto a los demás mutantes; sin embargo, a partir del séptimo día, el cambio de color (de amarillo a rojo), se produjo de manera más rápida, alcanzando la maduración completa al noveno día (Figura 29).

La producción de licopeno en el caso de estos mutantes es más lenta que en el caso de los frutos Wild Type.

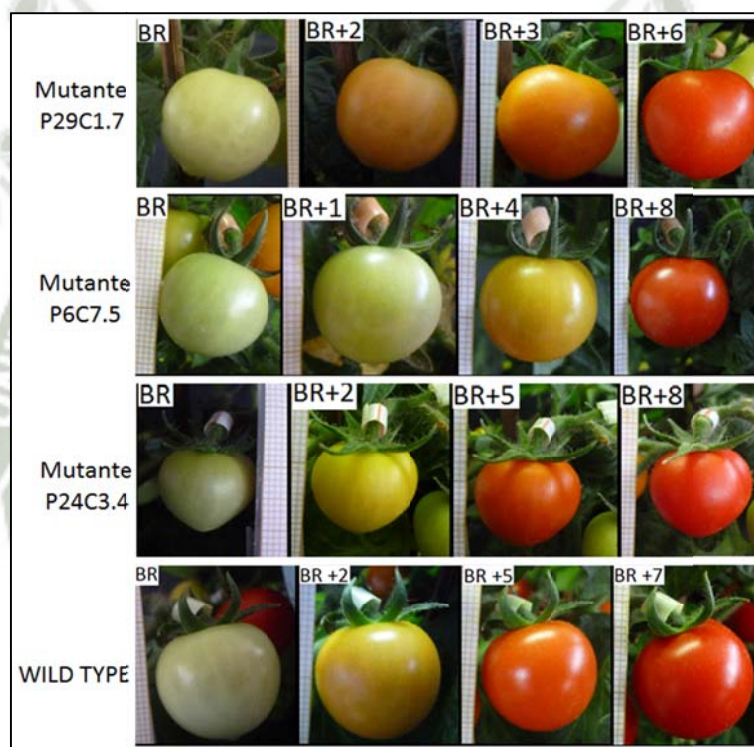


Figura 28. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P29C1.7, P6C7.5 y P24C3.4 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

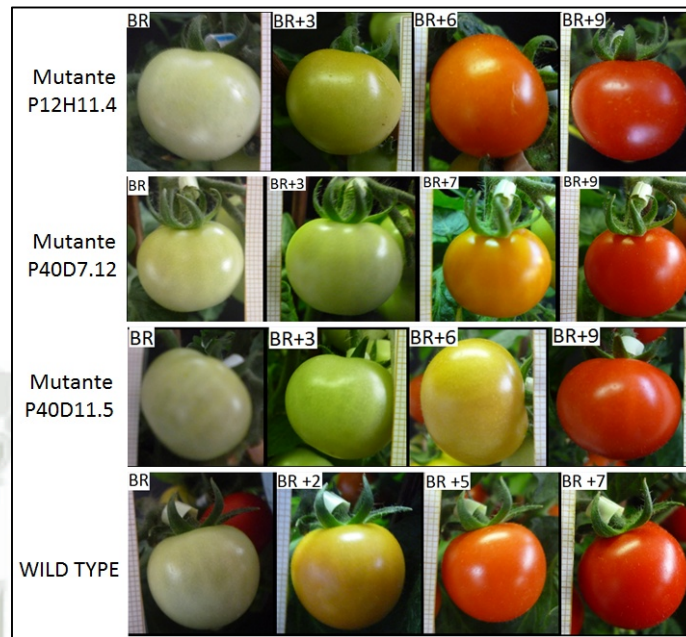


Figura 29. Seguimiento fotográfico de la maduración de los mutantes P12H11.4, P40D7.12 y P40D11.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

El mutante P3D3.12 fue el que mostró el proceso de maduración más largo de todos los mutantes, ya que después de haber alcanzado el estado *breaker*, tardó 19 días en madurar, 12 días más que el Wild Type (Figura 30).

La producción de licopeno en este mutante se da de una forma lenta; incluso, la tonalidad final del fruto no es la misma que la del resto de mutantes y de los frutos Wild Type.

La mayoría de las variedades de *Solanum lycopersicum* alcanzan su tamaño máximo 40 a 50 días después de la floración y maduran en aproximadamente 16 días, dependiendo de la variedad de tomate y de las condiciones locales.

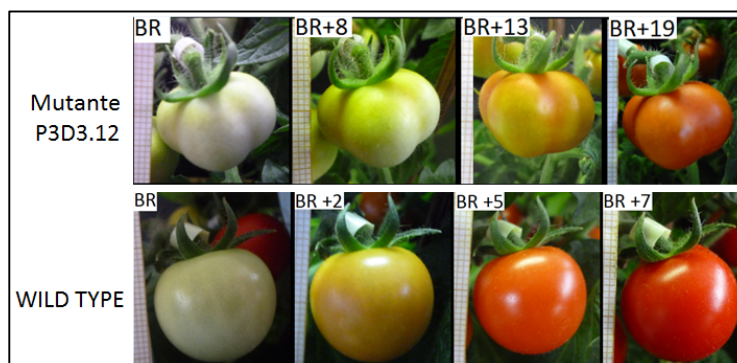


Figura 30. Seguimiento fotográfico de la maduración del mutante P3D3.12 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Los frutos de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' alcanzan la maduración aproximadamente 7 días después de haber alcanzado su tamaño máximo. Esta característica podría ser aprovechada en investigación, para asegurar la disponibilidad de frutos en un corto período de tiempo.

De acuerdo a Meissner et al. (1997), 'Micro-Tom' posee un corto ciclo de vida (70 – 90 días desde la siembra hasta la maduración del fruto), lo que puede permitir estudiar hasta 4 generaciones por año.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la determinación del estado *breaker* y en el seguimiento de la maduración, 'Micro-Tom' puede ser utilizado como una variedad modelo para estudiar los cambios que se producen en el fruto durante su desarrollo, ya que su desarrollo es bastante rápido en comparación con otras variedades.

4.3 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS FRUTOS DE TOMATE.

Se determinaron las características fisicoquímicas de los frutos de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom'. Se realizó la determinación del peso fresco, diámetro y número de lóculos de los frutos de todas las plantas mutantes y de las plantas Wild Type. Se determinó la dureza y el contenido de sólidos solubles de diez frutos por mutante y diez frutos de tipo Wild Type.

4.3.1 Determinación del peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto.

En la Tabla N°2 se muestran el peso fresco, el diámetro y el número de lóculos obtenidos para cada mutante y para el Wild Type, considerando el promedio de los 18 frutos de cada tipo de mutante y del Wild Type. Estas mediciones se realizaron cuando el fruto alcanzó el estado *breaker*, ya que una vez alcanzado este estado, comienza la maduración del fruto y éste ya no puede aumentar su masa.

El peso fresco de los frutos fue determinado utilizando una balanza analítica. El peso promedio de los frutos de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom', es 5.1 g y poseen tres lóculos (Carvalho F. et al., 2011). Los resultados obtenidos mostrados en la Tabla N° 2, muestran que el peso promedio de los frutos Wild Type es 5.36 g y que poseen 3 lóculos. Se observó que hubo un aumento significativo en el peso de los frutos en el caso de los mutantes P1B3.7.11, P40D11.5y P40D7.12, cuyos frutos pesaron en promedio, 8.81 g, 8.56 y 7.26 g, respectivamente. Mientras que hubo una reducción significativa en el peso de los frutos de los mutantes P12H11.4, P24C3.4, P3C6.1, P3D3.12 y P6C7.5, ya que sus pesos promedio fueron 4.17 g, 3.13 g, 1.58 g, 3.92 g y 4.01 g, respectivamente. El resto de mutantes no mostró diferencias significativas en cuanto al peso promedio de sus frutos, con respecto al peso promedio de los frutos Wild Type.

El diámetro de los frutos fue determinado utilizando un Vernier. Como se muestra en la Tabla N° 2, el diámetro promedio de los frutos de ‘Micro-Tom’ Wild Type es 22.66 mm. Los mutantes P12H11.4, P24C3.4, P3C6.1 y P6C7.5 mostraron una diferencia significativa con respecto al Wild Type, ya que los diámetros promedio de sus frutos fueron inferiores al del Wild Type (20.45 mm, 18.35 mm, 14.40 mm y 20.29 mm respectivamente).

Por el contrario, los mutantes cuyos frutos tuvieron un diámetro mayor al del Wild Type fueron los mutantes P1B3.7.11, P40D11.5 y P40D7.12, ya que sus diámetros respectivos fueron 25.27 mm, 27.09 mm y 25.14 mm. El resto de mutantes no mostró diferencias significativas en relación al diámetro promedio de sus frutos, con respecto al Wild Type.

Tabla N° 2. Peso fresco, diámetro y número de lóculos de cada fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

MUTANTE	Peso fresco (g)	Diámetro (mm)	N° de lóculos
P11C11.11.1	6.28 ± 2.11	23.72 ± 2.90	3 (72 %)
P12H11.4	4.17 ± 1.53	20.45 ± 2.86	3 (72 %)
P1B3.7.11	8.81 ± 2.54	25.57 ± 2.71	3 (66 %)
P24C3.4	3.13 ± 1.12	18.35 ± 2.33	3 (66 %)
P29C1.7	5.20 ± 2.69	21.35 ± 3.94	3 (77 %)
P3C6.1	1.58 ± 0.40	14.40 ± 1.54	3 (55 %)
P3D3.12	3.92 ± 1.19	21.97 ± 2.80	4 (44 %)
P40D11.5	8.56 ± 1.86	27.09 ± 1.89	3 (55 %)
P40D7.12	7.26 ± 1.74	25.14 ± 1.56	3 (72 %)
P6C7.5	4.01 ± 1.14	20.29 ± 2.88	3 (55 %)
WT	5.36 ± 1.22	22.66 ± 1.95	3 (62 %)

Valores promedio seguidos por la desviación estándar ($p < 0.05$, Test Wilcoxon).

Estas diferencias significativas con respecto al peso y diámetro de los frutos, entre los mutantes mencionados anteriormente y el Wild Type son mostradas en la Figura 31, donde se puede observar que existe una relación directamente proporcional entre el diámetro del fruto y su peso.

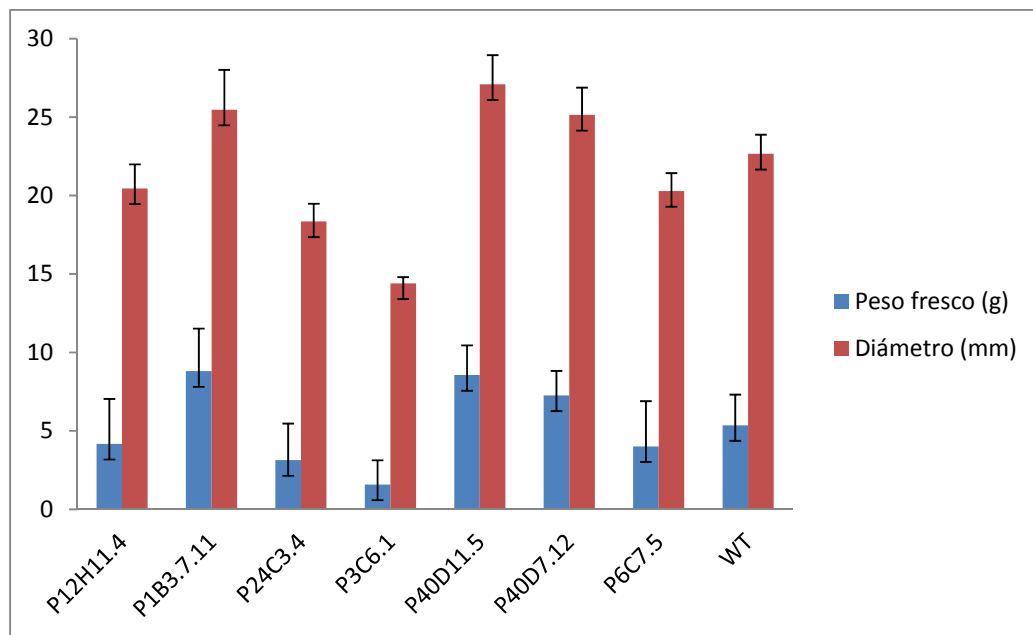


Figura 31. Diferencias de peso y diámetro de los frutos de los mutantes P12H11.4, P1B3.7.11, P24C3.4, P3C6.1, P40D11.5, P40D7.12 y P6C7.5 con respecto a los frutos Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Podemos observar que el mutante más pequeño con respecto al Wild Type es el mutante P3C6.1 con un peso de 1.58 g y un diámetro de 14.40 mm; mientras que el mutante que desarrolló frutos más grandes con respecto al Wild Type es el mutante P40D11.5, con un peso de 8.56 g y un diámetro de 27.09 mm. Estos resultados se muestran en las Figuras 32, 33 y 34.

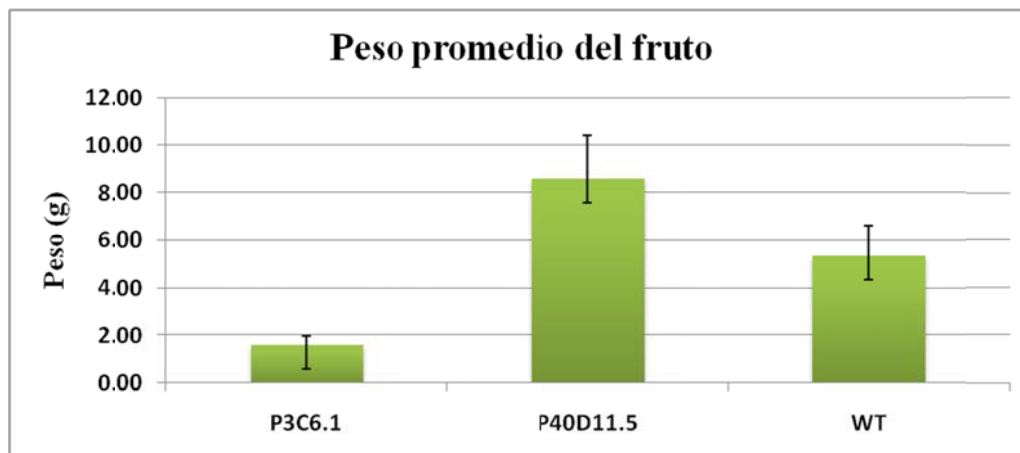


Figura 32. Peso promedio de los frutos de los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 y frutos Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

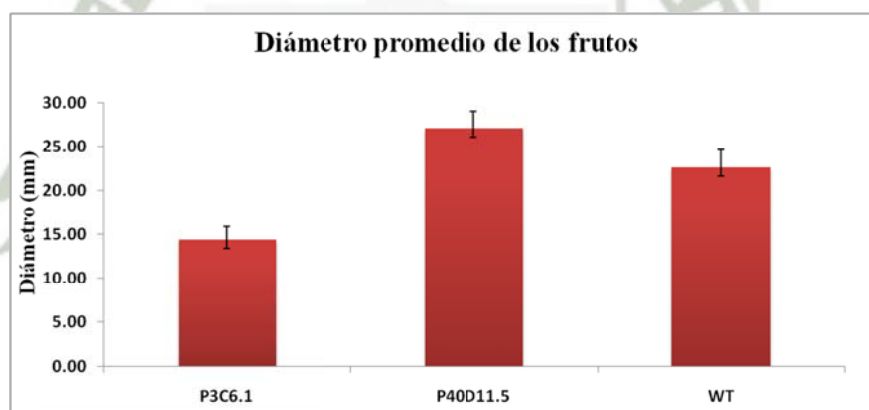


Figura 33. Diámetro promedio de los frutos de los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 y frutos Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.



Figura 34. Diferencia de tamaño del fruto entre el Wild Type y los mutantes P3C6.1 y P40D11.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

La mutación *dwarf* se ha utilizado durante bastante tiempo para crear variedades enanas de tomate (Nadzhimov et al., 1988; Bishop, 2003). Esta mutación provoca una pérdida de 14 bases en el genoma de ‘Micro-Tom’, en comparación con el genoma del tipo salvaje, y es la más estudiada y la responsable del pequeño tamaño de la planta y de sus frutos.

La expresión de esta mutación puede ser evidenciada en el tamaño de los frutos, tanto de las plantas Wild Type, como de las plantas mutantes, ya que sus pesos y diámetros son inferiores a los de distintas variedades, como se muestra en la Tabla N° 3 (Neiker, 2002; Roa de Acevedo, S et al., 1998). Incluso la variedad “Cherry” conocida por ser la que desarrolla los frutos más pequeños del mercado, produce frutos de mayor tamaño que el cultivar ‘Micro-Tom’.

Tabla N° 3. Comparación de pesos y diámetros de los frutos de distintas variedades de *Solanum lycopersicum* y ‘Micro-Tom’.

VARIEDAD	PESO (g)	DIÁMETRO (mm)
Floradade	155,28	67,20
Castle 77	71,19	43,52
Roma VF	61,18	43,27
Limonero	238,0	78,20
Isabel	358,4	91,10
Morado	201,6	78,4
Extremeño	80,1	60,2
Redondo	370,5	94,6
Corazón de moreno	204,4	76,8
Temprano especial	182,0	77,2
Plano rizado	202,4	83,2
Cherry	8,42	30,0
Chonto	89,20	51,3
Francisco	228,87	92,0
Milano	286,40	89,4
Saint Michel	177,50	35,43
‘Micro-Tom’	5,36	22,66

El número de lóculos del fruto depende directamente del número de carpelos en la flor e influye en la forma y el tamaño del fruto. En particular, los genes *fasciated* y *locule number*, ubicados en el cromosoma 11 de *Solanum lycopersicum* (tomate) juegan un papel crucial en la determinación del número de carpelos y lóculos (Lippman y Tanksley, 2001), y por consiguiente, en el tamaño del fruto. En general, la mayoría de especies de tomate que tienden a desarrollar frutos multiloculares, tienen un rendimiento más elevado (Ariizumi et al, 2013).

De acuerdo a Carvalho et al (2011), ‘Micro-Tom’ desarrolla frutos de tres lóculos. En la Tabla N° 2, se observa que el mutante P3D3.12 mostró una tendencia a desarrollar frutos de 4 lóculos, a diferencia del Wild Type y del resto de mutantes, que desarrollaron frutos con 3 lóculos. Sin embargo, si bien el mutante P3D3.12 desarrolló frutos de 4 lóculos, esto no produjo un aumento en el peso fresco ni en el diámetro del fruto, ya que el tamaño de sus frutos fue significativamente menor al de los frutos Wild Type (Tabla N° 2). Esta tendencia del mutante P3D3.12 a desarrollar frutos de 4 lóculos puede ser observada en la Figura 35. También puede observarse que los lóculos de los frutos de este mutante son prominentes, en comparación con los frutos del Wild Type y de otros mutantes, otorgando a este mutante su forma característica.

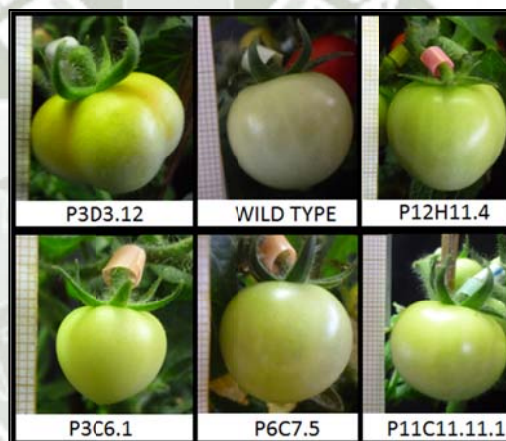


Figura 35. Comparación de los lóculos de P3D3.12, con el Wild Type y otros mutantes de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

4.3.2 Determinación de la dureza de los frutos

La firmeza de frutos de tomate es un parámetro que mide la resistencia de penetración de los tejidos del fruto y depende, entre otros factores, del grado de madurez. La firmeza es un factor importante ya que generalmente está relacionada

con la sanidad del fruto, la concentración de azúcares, el sabor y aroma del fruto, sobre todo al alcanzar la coloración de consumo.

La medición de la dureza se realiza con un penetrómetro, que mide la fuerza necesaria para penetrar el fruto hasta cierta profundidad con un bastón de metal. La dureza es expresada en Kg/superficie del bastón en cm^2 .

En este trabajo de investigación se utilizó un penetrómetro marca Fruit Texture Analyzer (Figura 36) y los resultados se obtuvieron con el programa FTA del equipo. La superficie del bastón metálico del penetrómetro fue de 0.5 cm^2 .



Figura 36. Penetrómetro marca Fruit Texture Analyzer utilizado en la determinación de la dureza de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Estas mediciones fueron realizadas siete días después de que los frutos hubieron alcanzado el estado breaker. Se realizaron tres mediciones por fruto en diferentes lóculos.

En la tabla N° 4 se muestra la dureza de los frutos de cada mutante, como resultado del promedio de las tres mediciones, y de los diez frutos utilizados por cada mutante. Los resultados están expresados en Kg/cm^2 .

Tabla N° 4. Dureza de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

MUTANTE	DUREZA (Kg/cm ²)
P11C11.11.1	1.280 ± 0.16
P12H11.4	0.770 ± 0.11
P1B3.7.11	0.989 ± 0.18
P24C3.4	0.765 ± 0.14
P29C1.7	0.781 ± 0.18
P3C6.1	0.919 ± 0.27
P3D3.12	2.818 ± 0.71
P40D11.5	0.974 ± 0.30
P40D7.12	0.857 ± 0.15
P6C7.5	1.575 ± 0.57
WILD TYPE	0.946 ± 0.09

Valores promedio seguidos por la desviación estándar ($p < 0.05$, *Test Wilcoxon*).

La consistencia del fruto se atribuye a cambios en la turgencia, estructura y composición de las paredes celulares (Pinheiro y Almeida, 2002) durante la maduración. Mientras más avanzado sea el estado de maduración, las células del pericarpio se vuelven menos turgentes y las paredes celulares van perdiendo rigidez.

La dureza de los frutos Wild Type fue 0.946 Kg/cm². Como se observa en la Tabla N° 4, los mutantes P1B3.7.11, P3C6.1, P40D11.5 y P40D7.12 no mostraron diferencias significativas en cuanto a la dureza de sus frutos, en comparación con el Wild Type.

Sin embargo, los mutantes P11C11.11.1 y P6C7.5 desarrollaron frutos con durezas mayores a la del Wild Type, siendo éstas, 1.280 Kg/cm² y 1.575 Kg/cm² respectivamente. Estos resultados pueden deberse a que las paredes celulares de las

células que componen el pericarpio sean más rígidas en el caso de estos mutantes, y por lo tanto la dureza de sus frutos es más elevada que la de los frutos Wild Type.

Por el contrario, la dureza de los frutos de los mutantes P12H11.4, P24C3.4 y P29C1.7 fueron significativamente inferiores a la dureza de los frutos Wild Type, siendo éstas, 0.770 Kg/cm², 0.765 Kg/cm² y 0.781 Kg/cm², respectivamente. La disminución de la firmeza de los frutos de estos mutantes puede deberse a una reducción de la adhesión celular del pericarpio, ya que las células han perdido turgencia conforme hubo avanzado la maduración (G. López, 2006) y a la disminución de la rigidez de las paredes celulares. En la figura 37 se muestran las diferencias de dureza entre los distintos mutantes y el Wild Type.

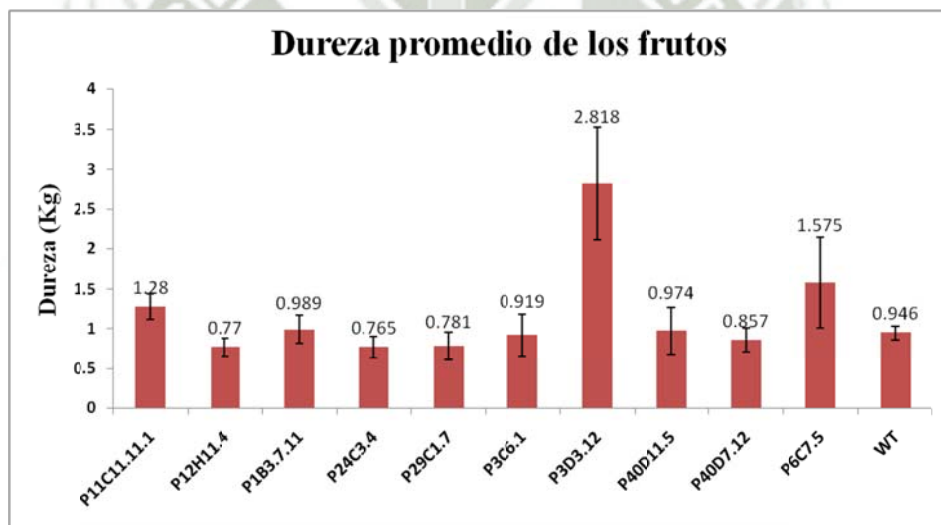


Figura 37. Dureza promedio de los frutos mutantes y frutos Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate). 'Micro-Tom'.

Como se observa en la figura anterior, el mutante P6C7.5 desarrolló frutos de una dureza mayor que la de los frutos Wild Type, mientras que los mutantes P12H11.4, P24C3.4 fueron los que desarrollaron frutos de menor dureza que los frutos Wild Type.

El fruto P3D3.12 también desarrolló frutos de una dureza superior a la de los frutos Wild Type. La dureza promedio de los frutos de P3D3.12 fue 2.818 Kg, mientras que la dureza promedio de los frutos del Wild Type fue 0.946 Kg.

Este resultado puede deberse a que todos los frutos fueron tomados siete días después de que hubieron alcanzado el estado *breaker*. Al momento de la recolección de los frutos, éstos se encontraban en un estado avanzado de maduración, es decir, todos ya habían adquirido un color rojo, a excepción de los frutos del mutante P3D3.12. Este mutante, a los 7 días de haber alcanzado el estado *breaker*, aún se encontraba en un estado temprano de maduración, ya que el color de los frutos aún era verde con halos amarillos en distintas partes de los frutos.

Como se observó en el seguimiento de la maduración (Figura 30), los frutos de este mutante alcanzaban la maduración aproximadamente 19 días después de haber alcanzado el estado *breaker*. Estos frutos debieron haber sido recolectados aproximadamente 20 días después de haber alcanzado su tamaño final para realizar el análisis de dureza.

Los mutantes que desarrollaron frutos de dureza significativamente superior o inferior a la de los frutos Wild Type pueden ser estudiados con mayor profundidad, ya que podrían ser utilizados como una herramienta genética para investigar procesos relacionados con la maduración del fruto y su relación con la determinación del momento de cosecha y la calidad organoléptica de los frutos de tomate.

4.3.3 Determinación del contenido de sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles de frutos de tomate es un parámetro que presenta gran variación en función del cultivar, nutrición de la planta, estrés hídrico, factores ambientales y genéticos, etc. En diversas variedades de fruto de tomate el contenido de sólidos solubles se sitúa entre 4.5 y 5.5 °Brix (N. Clemente, 2010).

Los sólidos solubles son componentes solubles en agua y representan aproximadamente el 75% del peso fresco del fruto maduro (Tiemán, D. et al, 1992). Los azúcares y ácidos orgánicos son los constituyentes principales del fruto de tomate.

La determinación del contenido de sólidos solubles se realizó utilizando diez frutos por mutante. Estos fueron recolectados siete días después de que alcanzaron el estado breaker. Para realizar este análisis se midió el Índice de refracción ($^{\circ}\text{Bx}$) del pericarpio, del gel y del fruto y se determinó si había alguna diferencia en el contenido de sólidos solubles de estas 3 mediciones y también de cada mutante con respecto al Wild Type. Para determinar el Índice de Refracción de las muestras se utilizó un refractómetro digital (Figura 38).



Figura 38. Refractómetro digital Euromex utilizado en la determinación del contenido de sólidos solubles de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

En la Tabla N° 5 se muestran los resultados obtenidos luego de haber realizado el análisis. Los resultados están expresados como el promedio del contenido de sólidos solubles de los 10 frutos utilizados.

Tabla N° 5. Contenido de sólidos solubles (°Bx) de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

MUTANTE	GEL	PERICARPIO	FRUTO
P11C11.11.1	6.36 ± 0.55	7.02 ± 0.54	6.88 ± 0.47
P12H11.4	6.59 ± 0.63	6.69 ± 0.45	6.58 ± 0.48
P1B3.7.11	7.31 ± 0.95	7.75 ± 0.57	8.00 ± 0.52
P24C3.4	7.42 ± 1.78	7.53 ± 0.87	7.55 ± 0.85
P29C1.7	6.51 ± 0.85	6.89 ± 1.27	6.86 ± 1.48
P3C6.1	10.62 ± 0.33	10.78 ± 0.58	10.24 ± 0.58
P3D3.12	4.93 ± 0.70	5.14 ± 0.52	5.14 ± 0.34
P40D11.5	6.06 ± 0.51	6.85 ± 0.49	6.64 ± 0.56
P40D7.12	5.58 ± 1.19	5.91 ± 0.52	5.76 ± 0.54
P6C7.5	7.67 ± 0.56	7.84 ± 1.29	7.58 ± 1.17
WILD TYPE	6.55 ± 0.31	7.04 ± 0.09	6.82 ± 0.44

Valores promedio seguidos por la desviación estándar ($p < 0.05$, *Test Wilcoxon*).

Se encontró que el contenido de sólidos solubles del pericarpio fue ligeramente superior en el pericarpio que en el gel y en el fruto, tanto en el caso de los frutos Wild Type como en el caso de los frutos de los distintos mutantes. Debido a que la diferencia entre el índice de refracción de las tres mediciones no fue grande, se tomó en cuenta el contenido de sólidos solubles del fruto para realizar una comparación entre los frutos Wild Type y los frutos mutantes.

Como se muestra en la tabla N° 5, el Índice de Refracción promedio de los frutos Wild Type fue 6.82 °Bx. Los mutantes P11C11.11.1, P12H11.4, P29C1.7, P40D11.5, P40D7.12 y P6C7.5, no mostraron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles, con respecto al Wild Type.

Por el contrario, los frutos de los mutantes P1B3.7, P24C3.4 y P3C6.1 desarrollaron frutos con un contenido mayor de sólidos solubles con respecto al Wild Type, ya que sus índices de refracción promedio fueron 8.00 °Bx, 7.55 °Bx y 10.24 °Bx, respectivamente. Esta diferencia puede ser observada en la Figura 39 y podría deberse a un mayor aporte de sacarosa por el floema (Walker et al., 1997), o a una mayor capacidad de biosíntesis y almacenamiento de carbohidratos durante las primeras etapas del desarrollo del fruto. La concentración de almidón es elevada durante la fase inicial del desarrollo del fruto y ésta disminuye prácticamente a cero, debido a la maduración, ya que se convierte en azúcares.

Por otro lado, el mutante P40D17.12 desarrolló frutos con un contenido de sólidos solubles significativamente menor al de los frutos Wild Type, ya que su Índice de Refracción promedio fue de 5.76 °Bx, mientras que el índice de refracción promedio de los frutos Wild Type fue de 6.82 °Bx (Figura 39).

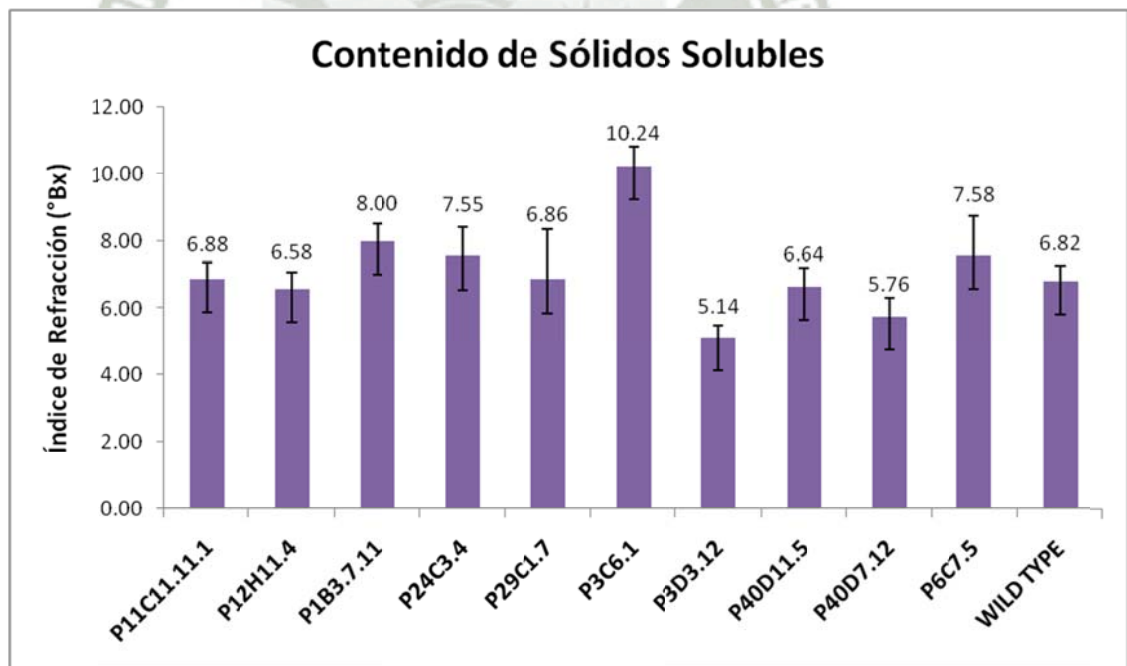


Figura 39. Contenido de Sólidos Solubles de los frutos de los distintos mutantes y los frutos Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Estos resultados podrían indicar que el tamaño del fruto no está relacionado necesariamente con el contenido de sólidos solubles, ya que como se observa en la Figura 40, los frutos del mutante P40D7.12 son significativamente de mayor tamaño que los frutos Wild Type y sin embargo, su contenido de sólidos solubles es inferior. Mientras que los frutos del mutante P3C6.1 fueron los más pequeños de la muestra y sin embargo, su contenido de sólidos solubles es mayor que el de los frutos Wild Type y el resto de mutantes.

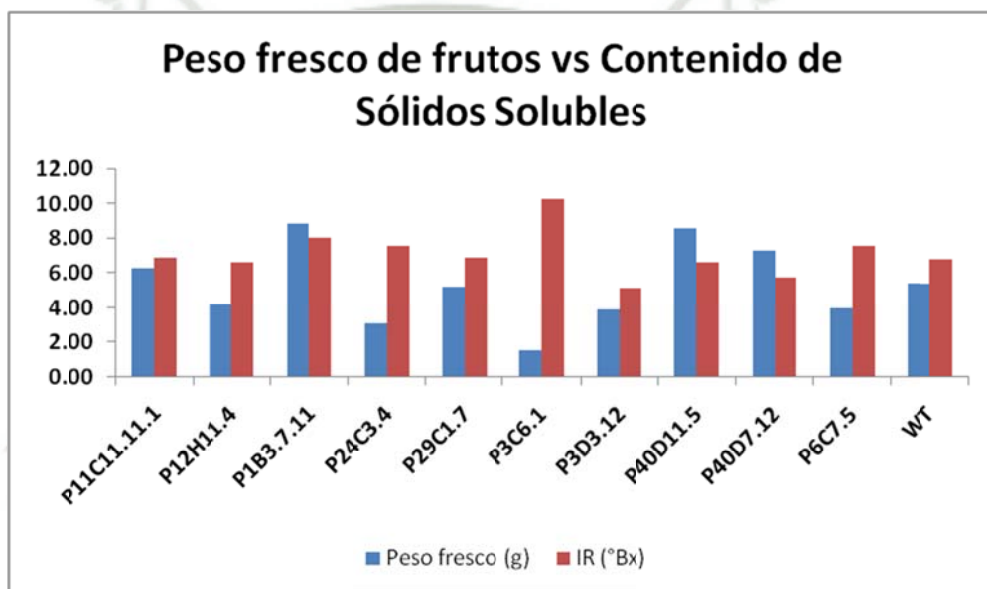


Figura 40. Peso fresco de frutos vs. Contenido de Sólidos Solubles de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

También se encontró que el mutante P3D3.12 desarrolló frutos con un contenido de sólidos solubles menor que el de los frutos Wild Type, ya que su índice de refracción fue de 5.14 °Bx, en comparación a los 6.82 °Bx de los frutos Wild Type. Esta diferencia puede deberse a que todos los frutos, tanto de los mutantes como del Wild Type, fueron recolectados siete días después de que alcanzaron el estado *breaker*, es decir su tamaño final; sin embargo, mientras que los frutos del resto de mutantes y del

Wild Type se encontraban en un estado avanzado de maduración ya que su color era rojo, los frutos del mutante P3D3.12 aún no habían adquirido esta tonalidad. Los frutos de P3D3.12 al no estar en un estado avanzado de maduración, aún no habían convertido todo el almidón en azúcares y los sólidos solubles presentes en el fruto de tomate son, en su mayoría, azúcares. Estos frutos debieron haber sido recolectados aproximadamente 20 días después de haber alcanzado el estado *breaker*, ya que éste es el tiempo que toman estos mutantes para alcanzar la maduración.

Los mutantes P1B3.7.11, P24C3.4 y sobre todo el mutante P3C6.1 pueden ser estudiados con mayor profundidad, ya que al desarrollar frutos con un alto contenido de sólidos solubles, pueden ser de interés en la investigación sobre la acumulación de estos compuestos en los frutos de *Solanum lycopersicum* (Davies et al., 1965) durante su desarrollo, sobre todo en la etapa de maduración.

4.4 ANÁLISIS DE LOS TEJIDOS CONDUCTORES DEL PEDICELO.

Se determinó el área total del pedicelo, el área de los tejidos conductores (xilema y floema) y la capacidad floemiana para conocer la eficiencia del transporte realizado por el floema. La importancia de este análisis radica en que estos tejidos, al ser los encargados del transporte de nutrientes hacia el fruto, pueden influir en el tamaño final del fruto y por consiguiente, en el rendimiento de la planta de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom'.

4.4.1 Adquisición de imágenes de cortes de pedicelo

Se utilizó el colorante Azul de Toluidina para realizar la tinción de las muestras, ya que si bien esta coloración es simple, es útil en la identificación y distinción de los tejidos conductores del pedicelo.

El xilema secundario o metaxilema se observa como un anillo de color azul y el floema se encuentra en la parte externa del metaxilema, y puede ser reconocido por su color violeta.

A continuación se muestran las imágenes microscópicas de los pedicelos del Wild Type y de cada mutante que fueron analizadas con el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260. Se utilizaron tres frutos por cada tipo de mutante y tres frutos Wild Type para realizar este análisis.

- **Wild Type:** en la figura 41 se observan las imágenes de los cortes de pedicelo obtenidos de los frutos Wild Type. En los tres pedicelos se puede observar la presencia de tricomas sobre la epidermis (Figura 41). Debajo de la epidermis hay varias capas de células de colénquima. Se observa también la presencia de rayos medulares que atraviesan el xilema secundario (metaxilema). En el lado externo del metaxilema se encuentra el floema, que forma un anillo mucho más delgado que el del metaxilema. También se puede observar células de esclerénquima, que rodean la parte exterior del floema; debido a la coloración con azul de toluidina, estas células están teñidas de color azul, y forman una delgada capa celular (Figura 42).

Durante el desarrollo de la planta, el floema y el xilema secundario empujan al xilema primario (protoxilema) hacia el centro del pedicelo. El protoxilema puede ser observado en el lado interno del metaxilema y sus elementos se encuentran agrupados en círculos (Figura 42). La parte central del pedicelo está conformada por células parenquimatosas de mayor tamaño que el resto de células del pedicelo.

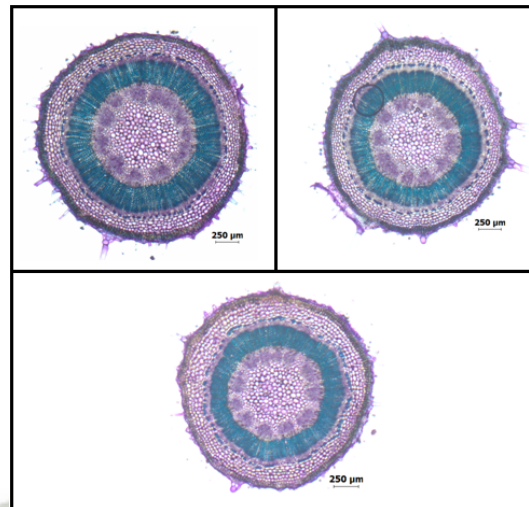


Figura 41. Pedicelos de los frutos de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' Wild Type.

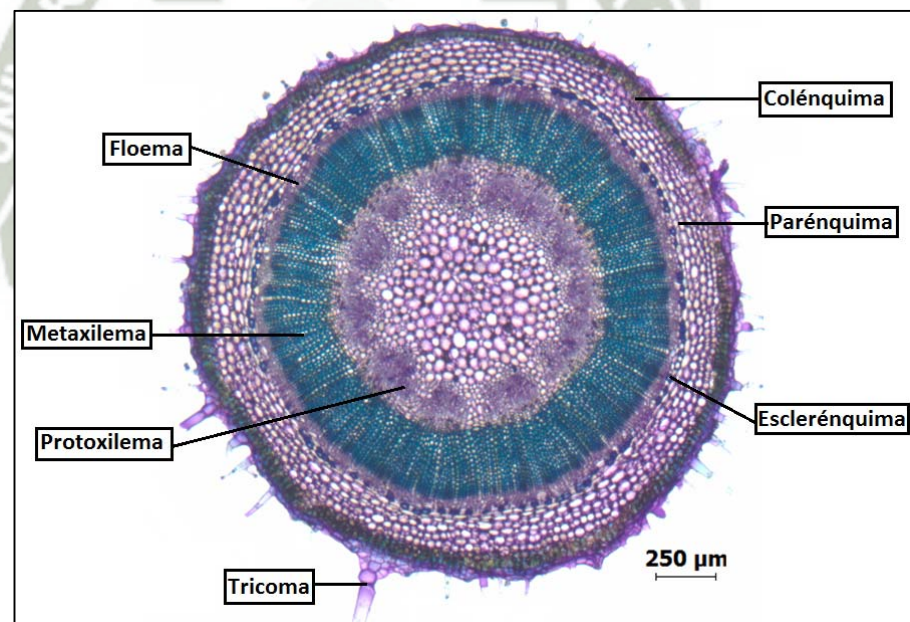


Figura 42. Estructura del pedicelo de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom', Wild Type.

- **Mutante P1B3.7.11:** En la figura 43 se observan los tres pedicelos del mutante P1B3.7.11. En el primer pedicelo, se observa que el floema forma un anillo discontinuo, pero esto no es observado en los otros dos pedicelos.

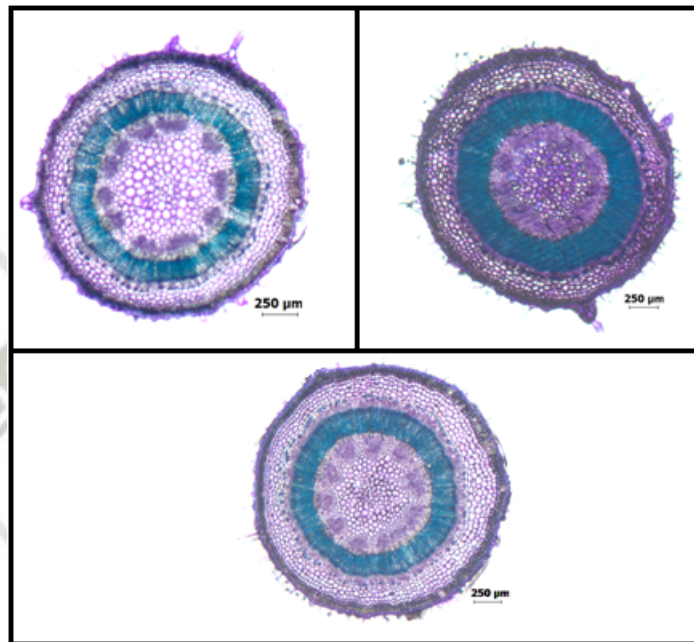


Figura 43. Pedicelos del mutante P1B3.7.11 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P3C6.1:** como se observa en la figura 44, en los tres pedicelos de este mutante hubo una coloración verde – marrón, que podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos.

Esta coloración se presentó tanto en las células del colénquima, como en las células que se encuentran entre el xilema primario y el xilema secundario. Incluso las células de esclerénquima que rodean al floema poseen esta coloración.

Esto pudo deberse a que posiblemente transcurrió demasiado tiempo entre la tinción y la observación de las muestras, lo que provocó que estos compuestos fenólicos se oxidaran.

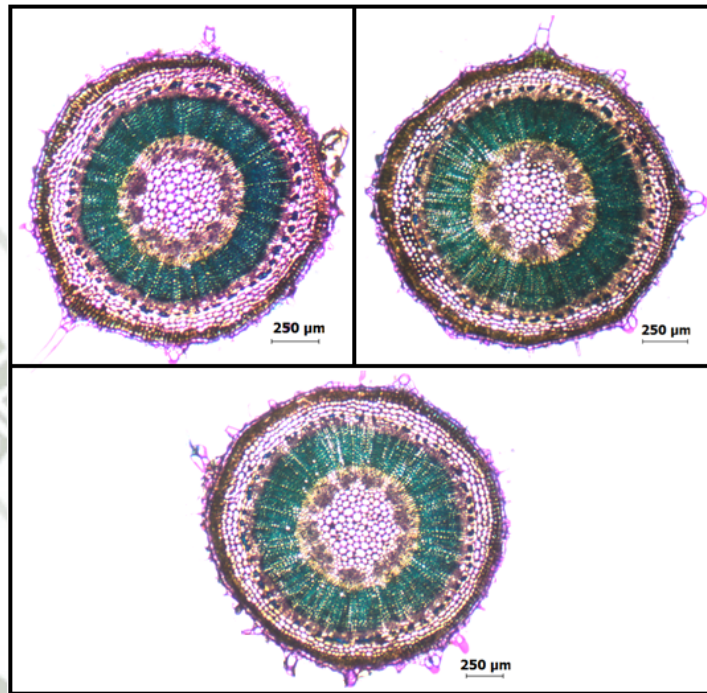


Figura 44. Pedicelos del mutante P3C6.1 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P3D3.12:** En el caso de este mutante se puede observar que hay una mayor cantidad de rayos medulares que atraviesan el metaxilema en comparación con los pedicelos Wild Type (Figura 45).

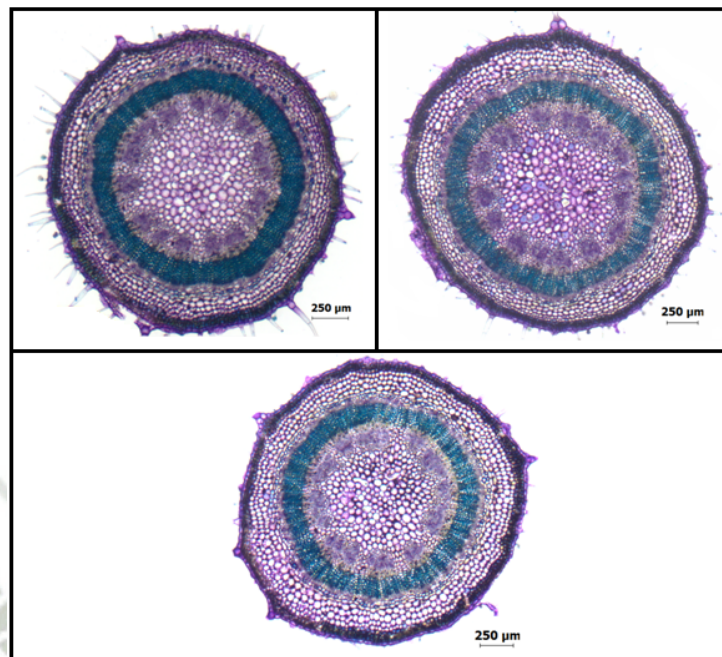


Figura 45. Pedicelos del mutante P3D3.12 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P6C7.5:** En los tres pedicelos de este mutante también se observa una coloración verde – marrón en las células del clorénquima, esclerénquima y en las que separan el metaxilema del protoxilema.

Esta coloración también podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos en el pedicelo, como en el caso del mutante P3C6.1 (Figura 46).

Incluso esta coloración puede ser observada en algunas zonas del metaxilema de los tres pedicelos.

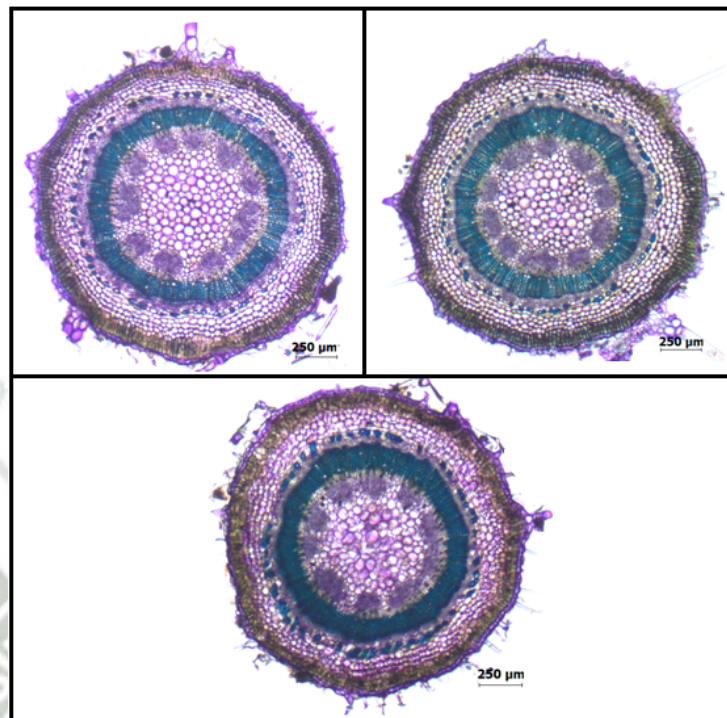


Figura 46. Pedicelos del mutante P6C7.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P11C11.11.1:** En el caso de este mutante se observó que el protoxilema de los tres pedicelos era de mayor tamaño que el de los pedicelos Wild Type (Figura 47).

Se puede observar que el protoxilema del mutante P11C11.11.1 está formado por una mayor cantidad de círculos y que éstos se encuentran juntos, y no separados como en el caso del Wild Type.

Por otro lado, también se observó que en el caso de dos de los pedicelos de este mutante, gran parte de las células de la parte central se encontraban coloreadas de color azul, al igual que algunas células del parénquima (Figura 47).

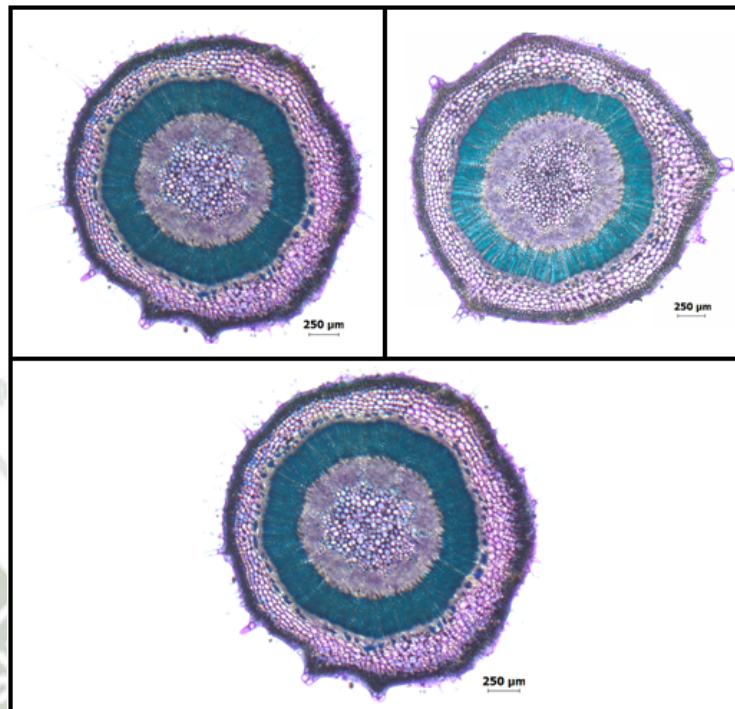


Figura 47. Pedicelos mutante P11C11.11.1 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P12H11.4:** En la figura 48 se muestran los pedicelos del mutante P12H11.4.

Se observó que el floema del segundo pedicelo formó un anillo discontinuo, pero esto no fue observado en los otros dos pedicelos.

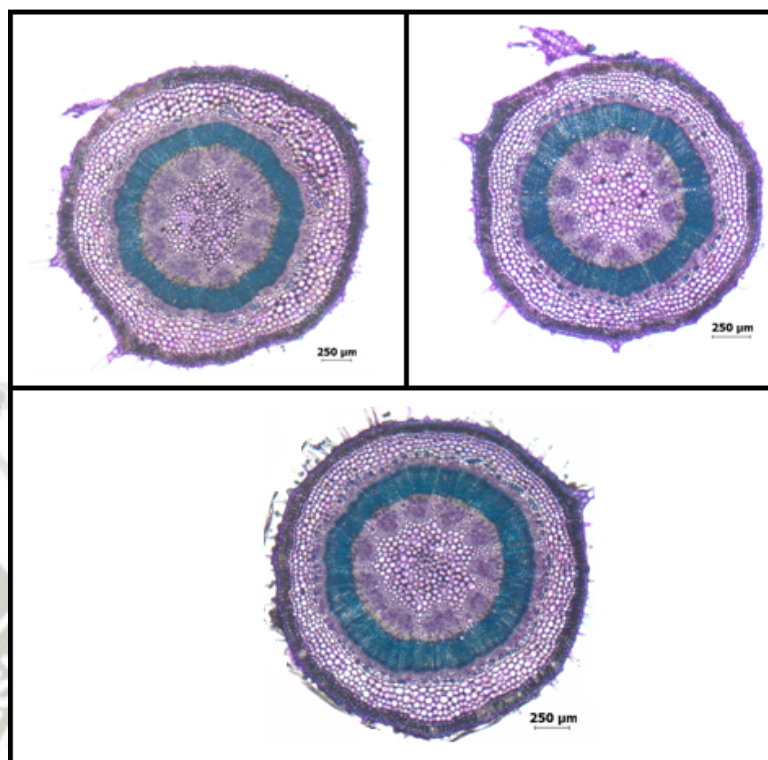


Figura 48. Pedicelos del mutante P12H11.4 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P24C3.4:** En el caso de este mutante se puede observar que hay una mayor cantidad de rayos medulares que atraviesan el metaxilema (Figura 49), al igual que en los pedicelos del mutante P3D3.12, y a diferencia de los pedicelos Wild Type.

Por otro lado, también se observó una coloración marrón en el tercer pedicelo. Esta coloración que cubrió toda el área del pedicelo, pudo deberse a la oxidación de compuestos fenólicos; sin embargo, esto no interfirió con el análisis, ya que se pudo distinguir tanto el xilema como el floema.

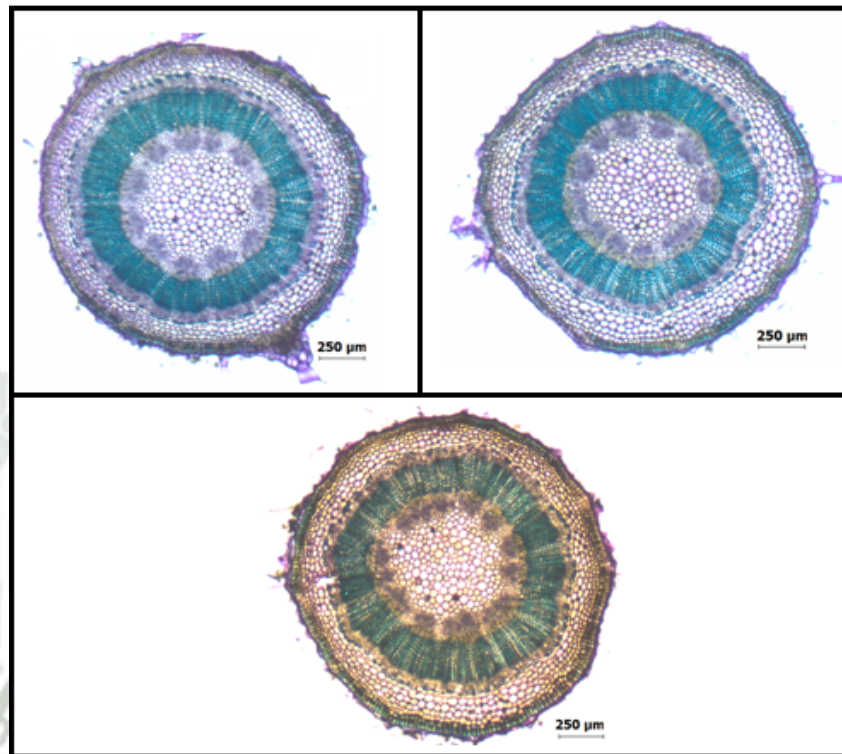


Figura 49. Pedicelos del mutante P24C3.4 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P29C1.7:** Se observó que en el caso de este mutante algunas células del parénquima adquirieron una coloración azul (Figura 50).

También se pudo observar en el segundo pedicelo, que el corte no fue del todo plano, ya que algunas células de la parte de abajo del cortex se encuentran superpuestas.

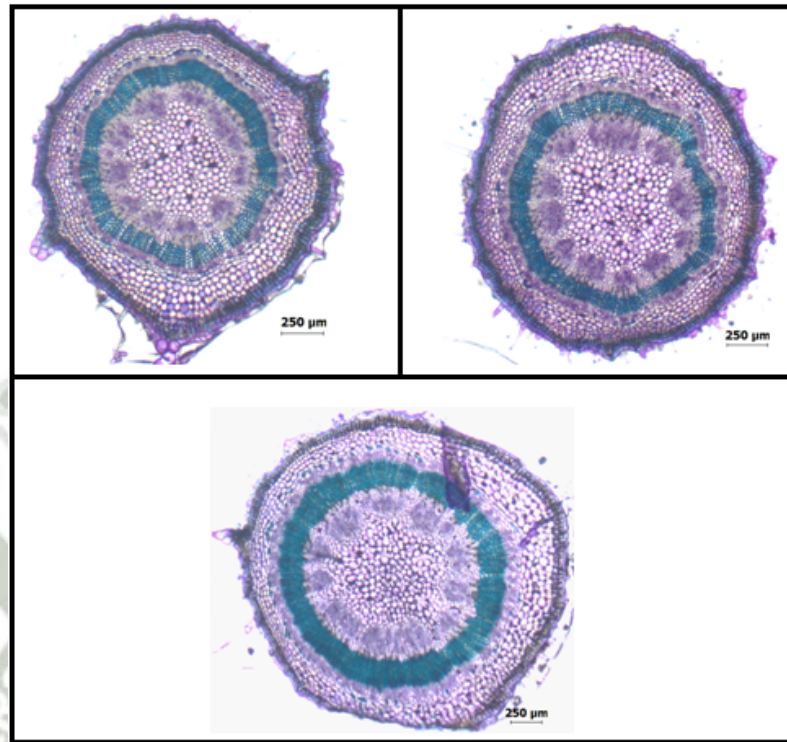


Figura 50. Pedicelos del mutante P29C1.7 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P40D7.12:** En el caso de este mutante, se observó que el protoxilema de los tres pedicelos era de mayor tamaño que el de los pedicelos Wild Type (Figura 51) y que forma círculos que no se encuentran separados como en el Wild Type.

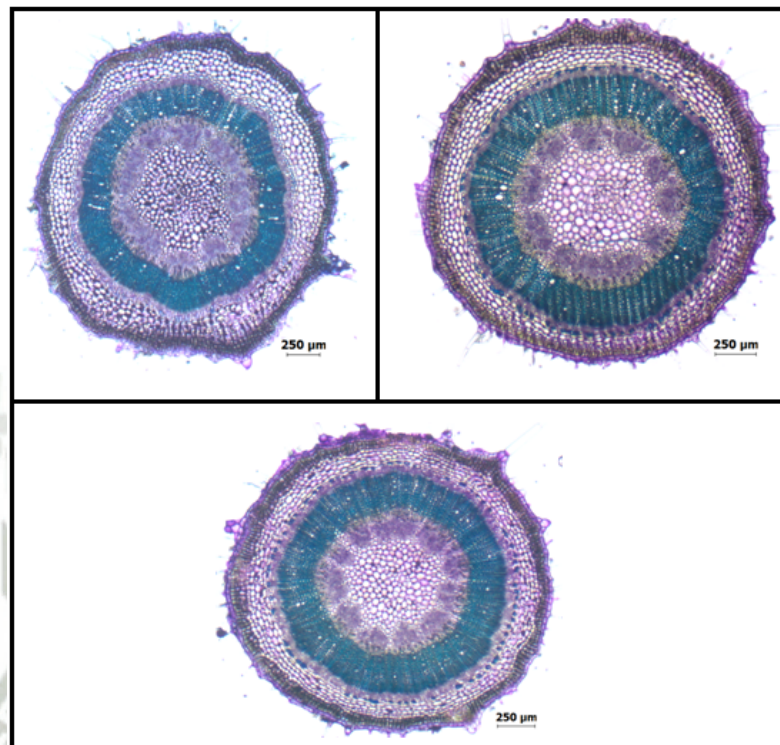


Figura 51. Pedicelos del mutante P40D7.12 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P40D11.5:** Se pudo observar que hay una mayor cantidad de rayos medulares que atraviesan el metaxilema (Figura 52), al igual que en los pedicelos de los mutantes P3D3.12 y P24C3.4, y a diferencia de los pedicelos Wild Type. Este elevado número de rayos medulares es más evidente en el segundo pedicelo de P40D11.5.

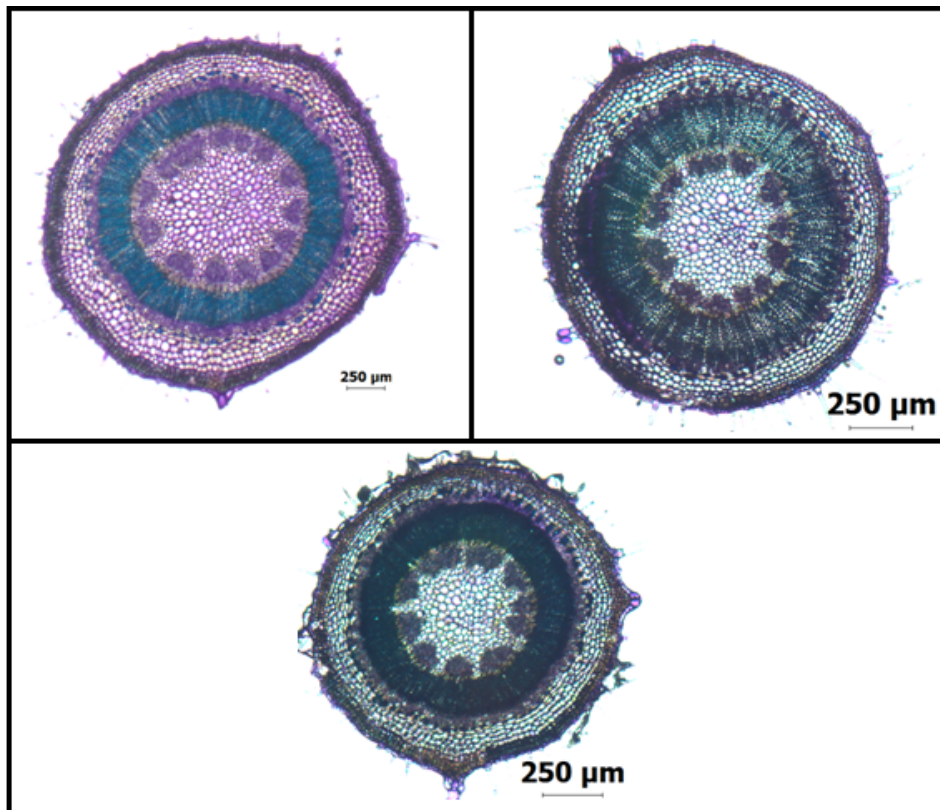


Figura 52. Pedicelos del mutante P40D11.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

4.4.2 Determinación del área total del pedicelo

Se determinó el área total de los pedicelos utilizando el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260. Estos resultados se muestran en la Tabla N° 6 y son el resultado del promedio del área total de los tres pedicelos.

Tabla N° 6. Área total del pedicelo.

MUTANTE	ÁREA (μm^2)	ÁREA (mm^2)	PESO FRUTO (g)
P11C11.11.1	4 930 450.75	821 741.8	6.28
P12H11.4	4 166 362.917	694 393.8	4.17
P1B3.7.11	2 979 303.00	496 550.5	8.81
P24C3.4	2 578 347.667	429 724.6	3.13
P29C1.7	3 685 732.667	614 288.8	5.20
P3C6.1	2 119 283.5	353 213.9	1.58
P3D3.12	3 949 085.00	658 180.8	3.92
P40D11.5	3 920 371.267	653 395.2	8.56
P40D7.12	3 857 747.333	642 957.9	7.26
P6C7.5	2 689 691.00	448 281.8	4.01
WT	3 674 183.583	612 363.9	5.36

El área total promedio de los pedicelos Wild Type fue 612 363.9 mm^2 . Se encontró que el área promedio de los pedicelos del mutante P11C11.11.1 fue significativamente mayor que el área promedio de los pedicelos Wild Type, ya que su área fue 821 741.8 mm^2 .

También se encontró que el área promedio de los pedicelos de los mutantes P1B3.7.11, P24C3.4, P3C6.1 y P6C7.5 fue significativamente inferior que el área de los pedicelos Wild Type, siendo éstas 496 550.5 mm^2 , 429 724.6 mm^2 , 353 213.9 mm^2 , 448 281 mm^2 , respectivamente. Éstos resultados se pueden observar en la Figura 53, expresados en μm^2 .

Se observó que no existe una relación entre el área del pedicelo y el tamaño final del fruto de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom', ya que la planta mutante que desarrolló pedicelos de mayor área fue P11C11.11.1; sin embargo no desarrolló frutos que fueran de un mayor tamaño que los frutos Wild Type (Tabla N° 2). Igualmente, dentro de las plantas que desarrollaron pedicelos de área inferior a las plantas Wild

Type, se encuentra el mutante P1B3.7.11, uno de los que produjeron frutos de tamaño significativamente mayor al de los frutos Wild Type (Tabla N° 2). Finalmente, la planta mutante P12H11.4 produjo pedicelos de mayor área que los pedicelos Wild Type, pero los frutos que desarrolló fueron de tamaño inferior a los frutos Wild Type (Tabla N° 2).

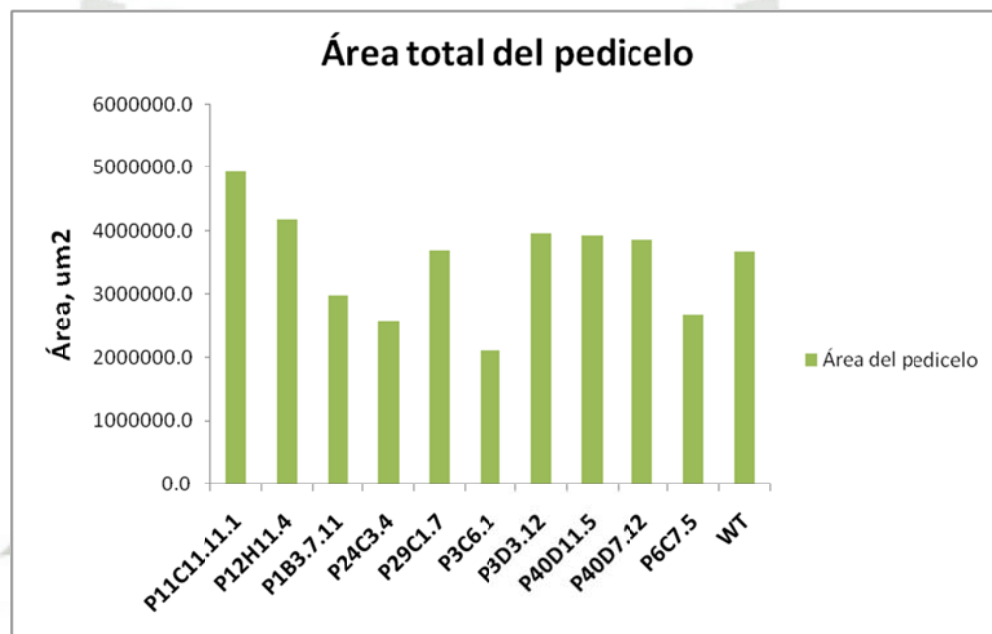


Figura 53. Área total del pedicelo de los distintos mutantes vs. Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

4.4.3 Determinación del área del xilema.

Se determinó el área del xilema de los pedicelos utilizando el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260. Estos resultados se muestran en la Tabla N° 7 y son el resultado del promedio del área del xilema de los tres pedicelos.

Tabla N° 7. Área del Xilema.

Mutante	Área (μm^2)	Peso fruto (g)
P11C11.11.1	1 293 409.9	6.28
P12H11.4	801 844.3	4.17
P1B3.7.11	609 814.6	8.81
P24C3.4	663 639.2	3.13
P29C1.7	661 279.9	5.20
P3C6.1	650 320.3	1.58
P3D3.12	697 863.3	3.92
P40D11.5	1 044 030.1	8.56
P40D7.12	970 222.7	7.26
P6C7.5	432 358.7	4.01
WT	954 100.8	5.36

Se encontró que el área promedio de los pedicelos Wild Type fue $954\ 100.8\ \mu\text{m}^2$. No hubo diferencia entre los pedicelos de los mutantes P40D11.5 y P40D7.12 y el Wild Type con respecto al área del xilema. Por el contrario, el mutante P11C11.11.1 desarrolló pedicelos con un xilema de mayor área que en el caso del Wild Type, ya que ésta fue de $1\ 293\ 409.9\ \mu\text{m}^2$.

La mayoría de los mutantes desarrollaron pedicelos con xilemas de mayor área con respecto al Wild Type, pero el mutante P6C7.5 fue el que mostró una diferencia mayor, ya que el área de su xilema fue $432\ 358.7\ \mu\text{m}^2$. Estas diferencias pueden ser observadas en la Figura 54.

Sin embargo, esto no influyó en el tamaño final del fruto, ya que no se observó una relación directamente proporcional entre el área del xilema y el tamaño del fruto. Como se observa en la Figura 54, el área del xilema de la mayoría de mutantes es inferior a la del Wild Type, pero por ejemplo, en el caso del mutante P1B3.7.11, que

desarrolla frutos de mayor tamaño que el Wild Type su área del xilema fue una de las menores.

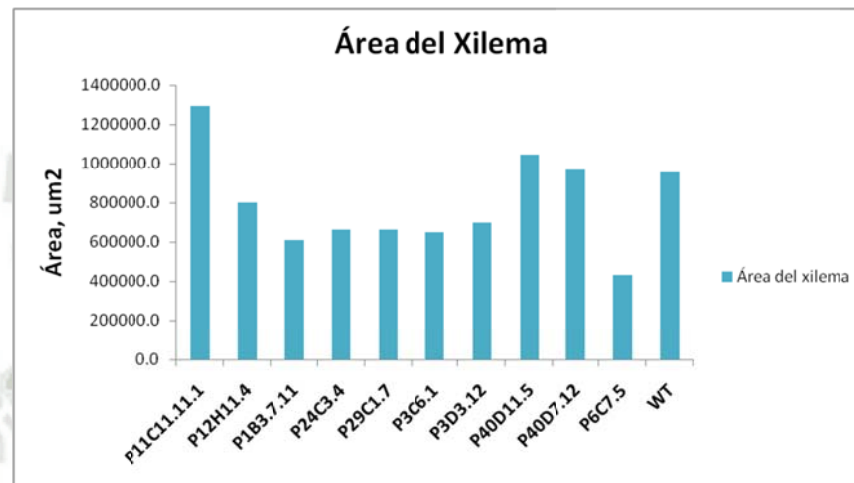


Figura 54. Área del xilema de los distintos mutantes vs el Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Aunque la fotosíntesis de un fruto inmaduro no es insignificante, representa menos del 10% del peso seco del fruto y el crecimiento de éste depende mayormente del aporte de agua y nutrientes de otras partes de la planta (Rančić et al., 2010). La mayoría del material del cual depende el crecimiento del fruto es transportado desde el tallo hacia al fruto a través del pedicelo, por el xilema y el floema. De acuerdo a Rančić et al. (2010), el transporte de agua en el pedicelo por el xilema y floema ocurre en la misma dirección, para que de esta forma el fruto acumule agua continuamente.

En distintos frutos, incluyendo el tomate, el transporte es realizado por el xilema durante las primeras etapas del desarrollo del fruto (fertilización y división celular), y el floema contribuye en menos del 10% (Rančić et al., 2010). Sin embargo, poco antes de que el fruto alcance su tamaño final y al comienzo de la maduración, el

transporte del floema representa casi el 80% del transporte total. Conforme el proceso del proceso de maduración va progresando, se estima que el transporte de nutrientes por el floema llega al 95%, mientras que el transporte realizado por el xilema, se detiene. Se cree que la reducción del transporte del xilema se debe a la presencia de la zona de abscisión, donde hay una alta resistencia hidráulica (Rančić et al, 2010).

Esta podría ser la razón por la cual no exista una relación entre el tamaño final del fruto y el área del xilema, ya que si bien el xilema es el tejido conductor de mayor área, en el tomate, aproximadamente el 20% es funcional, ya que debido al rápido crecimiento del fruto, los vasos del xilema se estiran y se rompen (Rančić et al, 2010), mientras que el floema sigue siendo funcional porque está compuesto básicamente por células vivas con paredes celulares elásticas, que pueden mantener sus funciones mientras el fruto se desarrolla, sin ser dañadas.

4.4.4 Determinación del área del floema y la capacidad floemiana

Se determinó el área del floema de los pedicelos utilizando el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260. Estos resultados se muestran en la Tabla N° 8 y son el resultado del promedio del área del floema de los tres pedicelos. A partir del área del floema, se calculó la eficiencia del transporte del floema (capacidad floemiana), dividiendo el peso seco del fruto entre el área del floema.

Tabla N° 8. Área del floema y capacidad floemiana.

Mutante	Área del floema (μm^2)	Capacidad Floemiana ($\text{g PS}/\mu\text{m}^2$)	PESO FRUTO (g)
P11C11.11.1	271 651.3	2.20×10^{-6}	6.28
P12H11.4	276 100.0	1.49×10^{-6}	4.17

P1B3.7.11	169 744.0	2.47×10^{-6}	8.81
P24C3.4	200 946.3	7.90×10^{-7}	3.13
P29C1.7	316 225.3	1.72×10^{-6}	5.20
P3C6.1	180 145.0	1.17×10^{-6}	1.58
P3D3.12	218 688.7	1.72×10^{-6}	3.92
P40D11.5	324 528.3	2.73×10^{-6}	8.56
P40D7.12	239 670.6	2.12×10^{-6}	7.26
P6C7.5	211 377.1	1.30×10^{-6}	4.01
WT	255 224.7	1.75×10^{-6}	5.36

PS: Peso Seco

Se encontró que el área promedio del floema de los pedicelos Wild Type fue 255 224.7 μm^2 . En este caso tampoco se observó una relación entre el área del floema y el tamaño final del fruto. Por ejemplo, en el caso del mutante P1B3.7.11, uno de los que desarrollaron frutos de mayor tamaño en comparación con el Wild Type, el área del promedio del floema fue 169 744.0 μm^2 , inferior al área del floema Wild Type. El área promedio del floema de los pedicelos del mutante P3C6.1 fue inferior a la del Wild Type (180 145.0 μm^2) y este mutante fue el que desarrolló los frutos de menor tamaño. El mutante P12H11.4 también produjo frutos de menor tamaño que el Wild Type y sin embargo, el área promedio del floema es superior a la del Wild Type (276 100.0 μm^2).

De acuerdo a Rančić et al. (2010), el área del floema se incrementa durante el desarrollo del fruto, en la etapa de elongación celular. Un floema de gran área puede proveer una mayor asimilación de nutrientes por parte del fruto y también un crecimiento más rápido, pero el transporte depende más de la eficiencia del floema que de su área.

Como se observa en la Tabla N° 8, la capacidad floemiana de los pedicelos Wild Type fue 1.75×10^{-6} g/ μm^2 . Los mutantes con una capacidad floemiana mayor a la

del Wild Type fueron los mutantes P11C11.11.1, P1B3.7.11, P40D11.5 y P40D7.12, siendo éstas $2.20 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, $2.47 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, $2.73 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$ y $2.12 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, respectivamente.

Los mutantes con una capacidad floemiana inferior a la del Wild Type fueron los mutantes P12H11.4, P24C3.4, P3C6.1 y P6C7.5 ($1.49 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, $7.90 \times 10^{-7} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, $1.17 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$ y $1.30 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, respectivamente). La Figura 55 muestra estas diferencias.

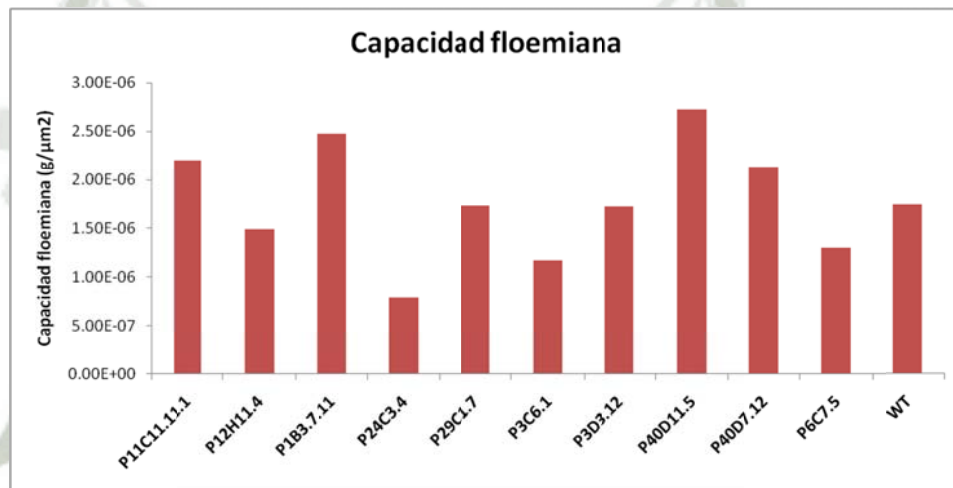


Figura 55. Eficiencia del transporte realizado por el floema de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Se encontró que la capacidad floemiana está relacionada con el tamaño final del fruto. Se observó que los mutantes que desarrollaron frutos de mayor tamaño que los frutos Wild Type, también desarrollaron una capacidad floemiana superior a la del Wild Type. Igualmente, los mutantes que produjeron frutos de menor tamaño que los frutos Wild Type, desarrollaron una capacidad floemiana inferior. En la Figura 56, se muestran los mutantes que desarrollaron los frutos de mayor y menor tamaño y su capacidad floemiana.

Como se observa en la Figura 56, existe una relación directa entre la capacidad floemiana y el tamaño final del fruto. Una mayor capacidad floemiana podría permitir el desarrollo de frutos de mayor tamaño.

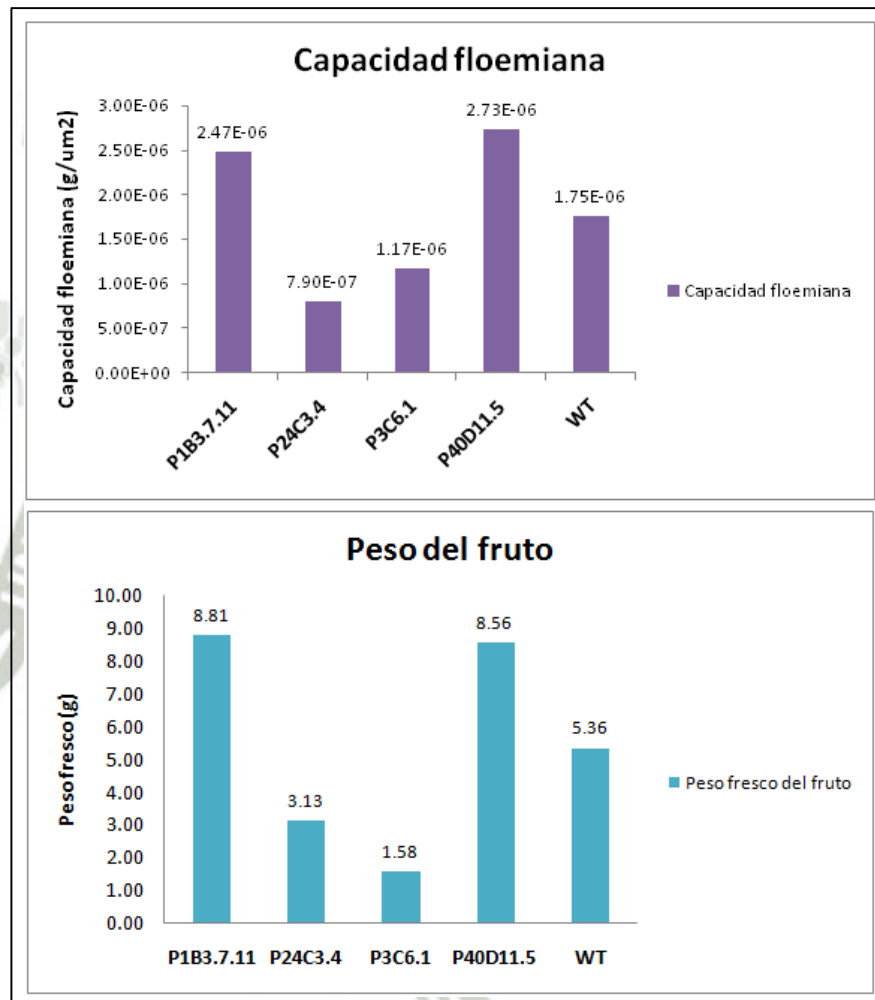


Figura 56. Relación entre la capacidad floemiana y el peso de los frutos de los mutantes P1B3.7.11, P24C3.4, P3C6.1, P40D11.5 y Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

La eficiencia en el transporte de nutrientes realizado por el floema podría ser un factor que influya en el tamaño final del fruto de *Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’.

Por otro lado, los mutantes P1B3.7.11 y P40D7.11 son de interés, ya que desarrollaron los frutos de mayor tamaño y su eficiencia del transporte del floema también es mayor. Estos mutantes podrían seguir siendo estudiados para realizar investigación sobre cómo influye la capacidad floemiana en el tamaño final del fruto y por lo tanto, en el rendimiento de la planta.

Sin embargo, ya que la capacidad floemiana y el tamaño final del fruto podrían estar relacionados, las mutaciones *dwarf*, *miniature* y *self-pruning*, también podrían ejercer un efecto sobre la capacidad floemiana, ya que ésta está determinada por el área del floema y por el peso seco del fruto.

4.5 ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS DEL PERICARPIO

Se realizó un análisis de las células que componen el fruto de *Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’, con el fin de determinar si existe una relación entre el número de capas celulares, el espesor del pericarpio y el área de estas células con el tamaño final del fruto y el rendimiento de la planta.

4.5.1 Adquisición de imágenes de cortes de pericarpio

Se utilizó el colorante Calcoflúor, un colorante fluorescente que marca las paredes celulares vegetales, para realizar la tinción de las muestras de pericarpio.

A continuación se muestran las imágenes microscópicas de los cortes de pericarpio del Wild Type y de cada mutante que fueron analizadas con el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260. Se utilizaron dos frutos de cada mutante y dos frutos Wild Type que estuvieran en estado *breaker*.

- **Wild Type:** como se observa en la Figura 57, la estructura del pericarpio de los frutos Wild Type es característica de *Solanum lycopersicum*. Las células del exocarpio forman una delgada capa celular y son células pequeñas, finas y alargadas. Las células del endocarpio también son pequeñas pero un poco más redondas que las del exocarpio. Las células del mesocarpio son más grandes y redondas que el resto de las células, sobre todo las células del centro. En el segundo pericarpio se observan restos de gel al costado del endocarpio.

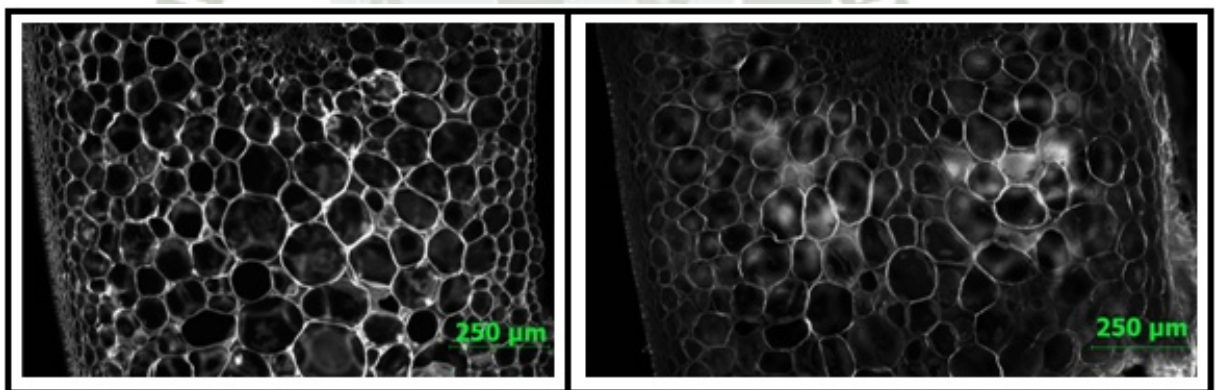


Figura 57. Pericarpios de los frutos de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' Wild Type.

En el mesocarpio también se observa tejido vascular (Figura 58) que está conectado a al tejido vascular del pedicelo. También se observa que las

células del mesocarpio siguen una distribución ordenada y las células centrales son de mayor tamaño que el resto de las células del mesocarpio.

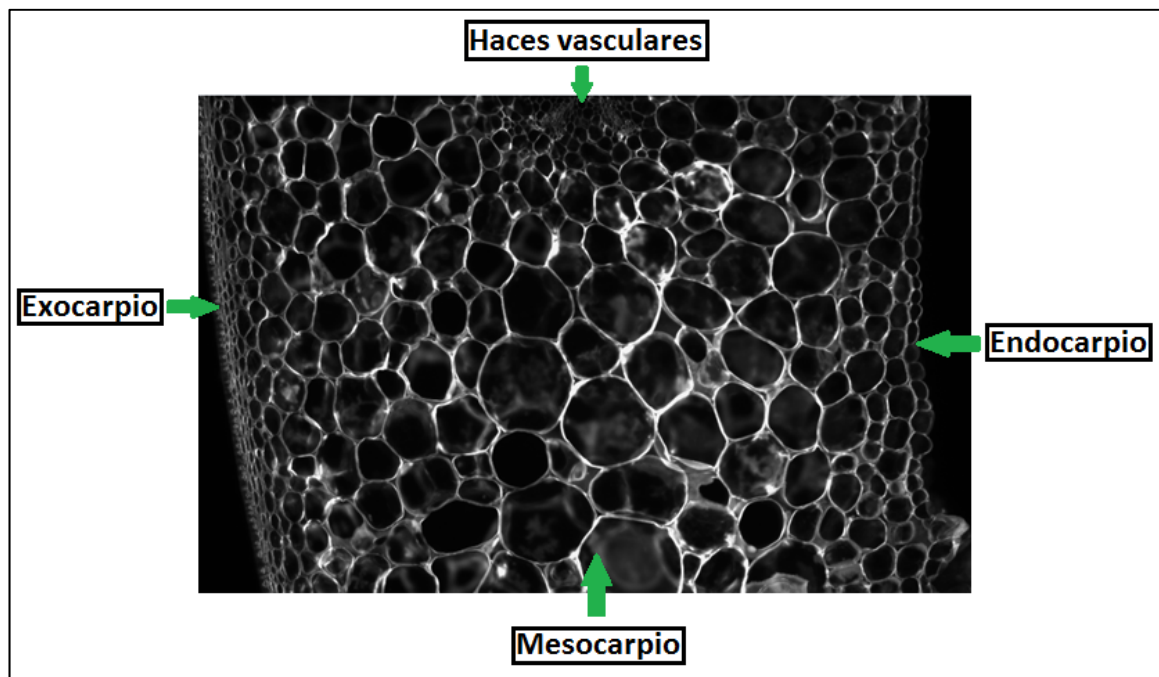


Figura 58. Estructura del Pericarpio de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom', Wild Type.

- **Mutante P1B3.7.11:** En ambos pericarpios se observó la presencia de haces vasculares muy próximos entre sí. Y también se observó que las células del mesocarpio del segundo pericarpio (Figura 59, derecha), son más grandes que las del primero. La estructura del exocarpio y del endocarpio es similar a la del Wild Type.

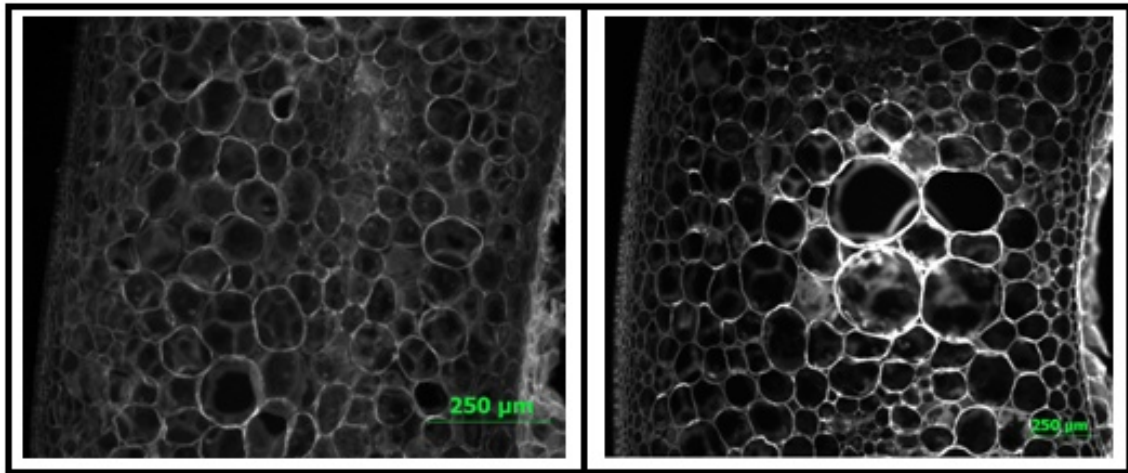


Figura 59. Pericarpios del mutante P1B3.7.11 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P3D3.12:** La estructura del exocarpio de este mutante es similar a la del Wild Type, se puede observar que sus células son pequeñas y alargadas (Figura 60). Sin embargo, las células del mesocarpio no son redondas como las del Wild Type, y no tienen una distribución ordenada. Estas células son alargadas e incluso se puede observar que las que se encuentran en los extremos del mesocarpio son más grandes que las del centro.

Finalmente, se puede observar que las células del endocarpio son más grandes que las del Wild Type.

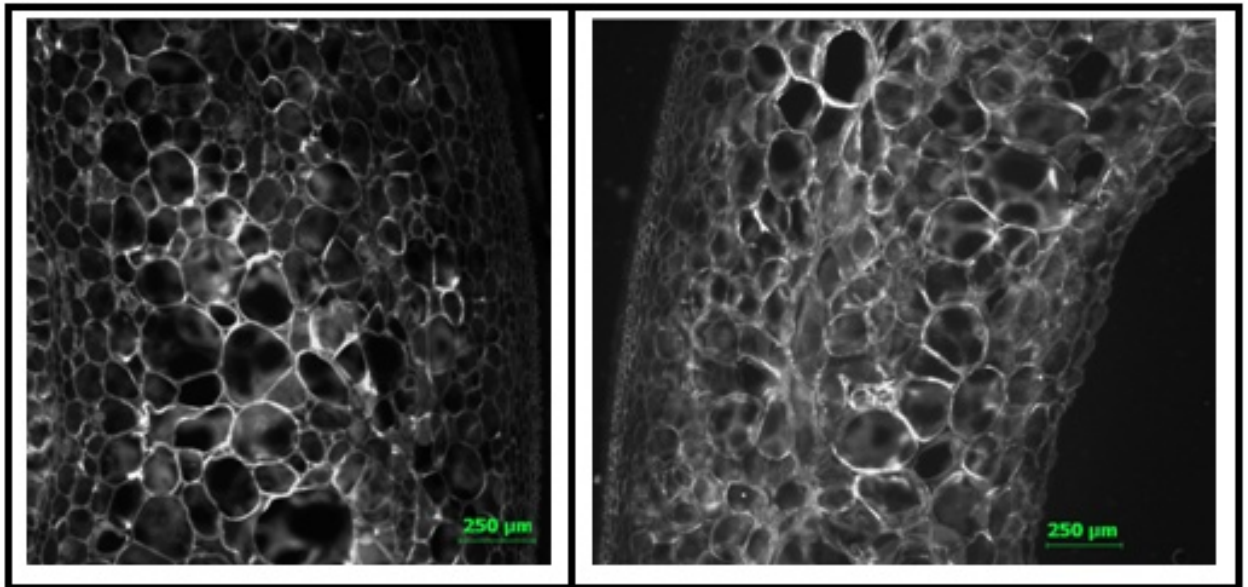


Figura 60. Pericarpios del mutante P3D3.12 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P6C7.5:** La estructura del pericarpio de este mutante es similar a la del Wild Type (Figura 61); pero se puede observar en el primer pericarpio, que algunas de las paredes celulares de las células del mesocarpio fueron destruidas durante el corte. Esto pudo deberse a que la cuchilla no se haya encontrado en buen estado, provocando un daño en el tejido. Sin embargo, esto no influyó en el análisis de la imagen.
- **Mutante P11C11.11.1:** En el caso de este mutante, se observó que tanto la estructura del endocarpio como la del exocarpio son similares a las del Wild Type, pero las células del mesocarpio tienen todas un mismo tamaño (Figura 62). También se observó la presencia de haces vasculares.

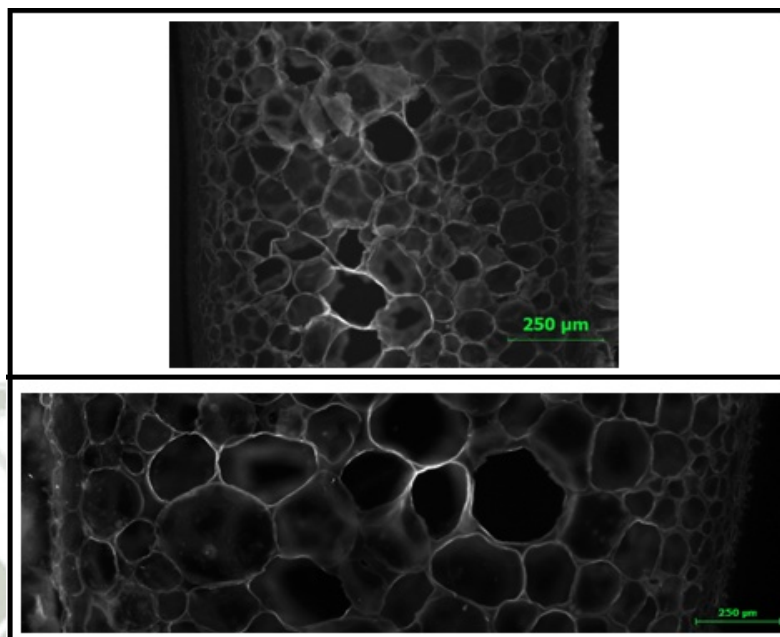


Figura 61. Pericarpios del mutante P6C7.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

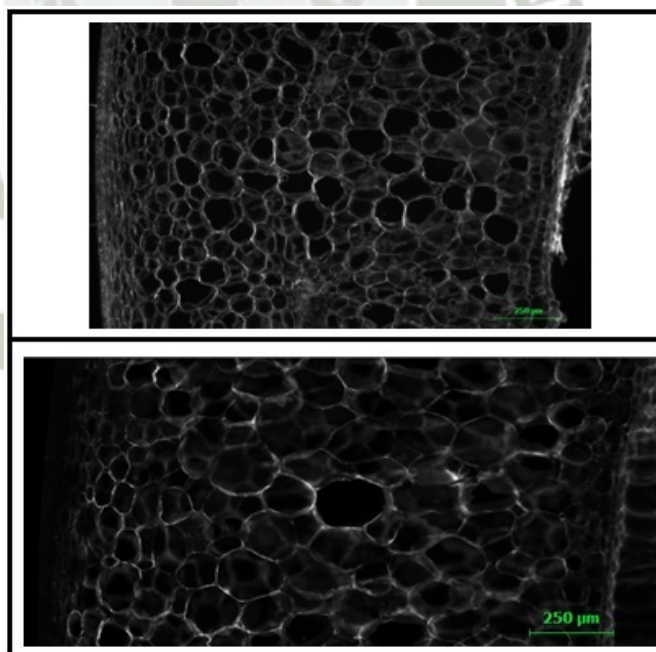


Figura 62. Pericarpios del mutante P11C11.11.1 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P12H11.4:** La estructura del pericarpio de este mutante es similar a la del Wild Type (Figura 63).

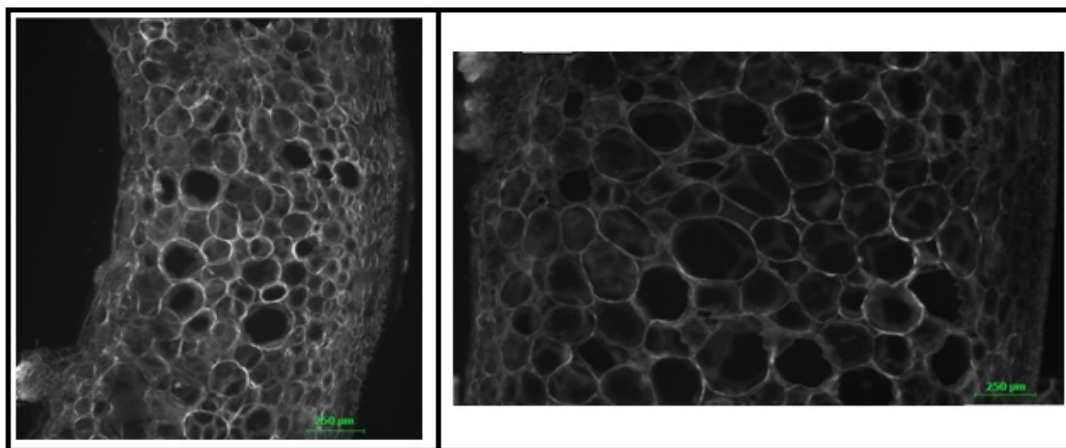


Figura 63. Pericarpios del mutante P12H11.4 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P24C3.4:** Se observó que la estructura del pericarpio de este mutante es similar a la del Wild Type (Figura 64), pero algunas de las células del mesocarpio (Figura X, derecha) son de mayor tamaño.

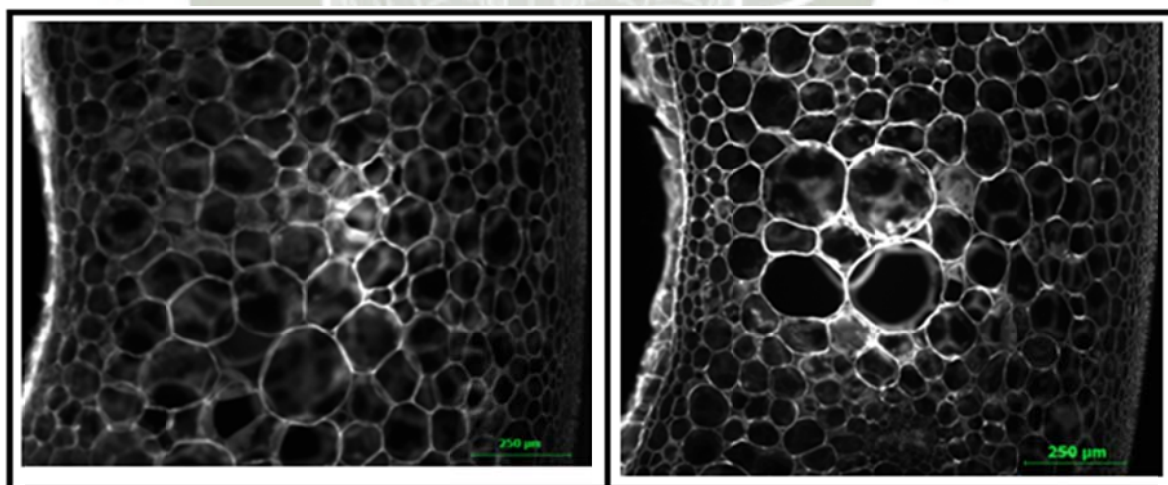


Figura 64. Pericarpios del mutante P24C3.4 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P29C1.7:** Como se observa en la Figura 65, las células del mesocarpio son casi todas del mismo tamaño y algunas de las paredes celulares de estas células se encuentran dañadas, posiblemente debido al corte o a la preparación de la muestra.

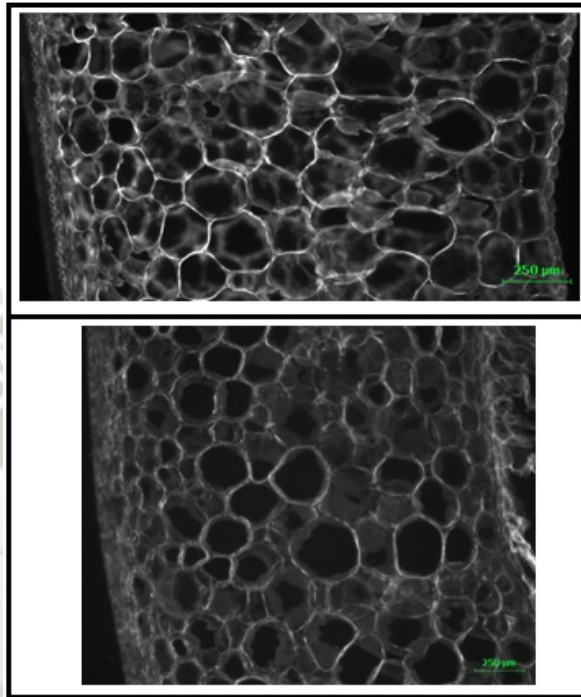


Figura 65. Pericarpio del mutante P29C1.7 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

- **Mutante P40D7.12:** Se puede observar que las células del mesocarpio de este mutante son más grandes que las del Wild Type (Figura 66). Las células del exocarpio y del endocarpio son similares a las del pericarpio Wild Type.

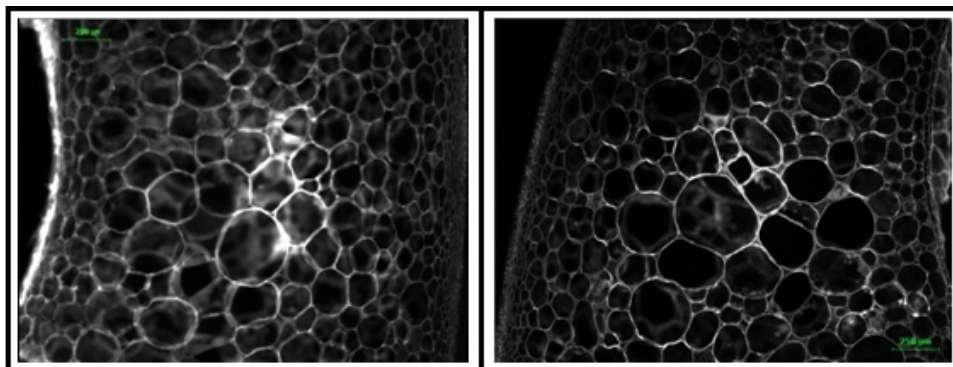


Figura 66. Pericarpios del mutante P40D7.12 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P40D11.5:** La estructura del pericarpio de este mutante es similar a la del pericarpio Wild Type (Figura 67). En el segundo pericarpio se puede observar que las paredes celulares de algunas células del mesocarpio se encuentran rotas, dando la impresión de que se tratara de una célula.

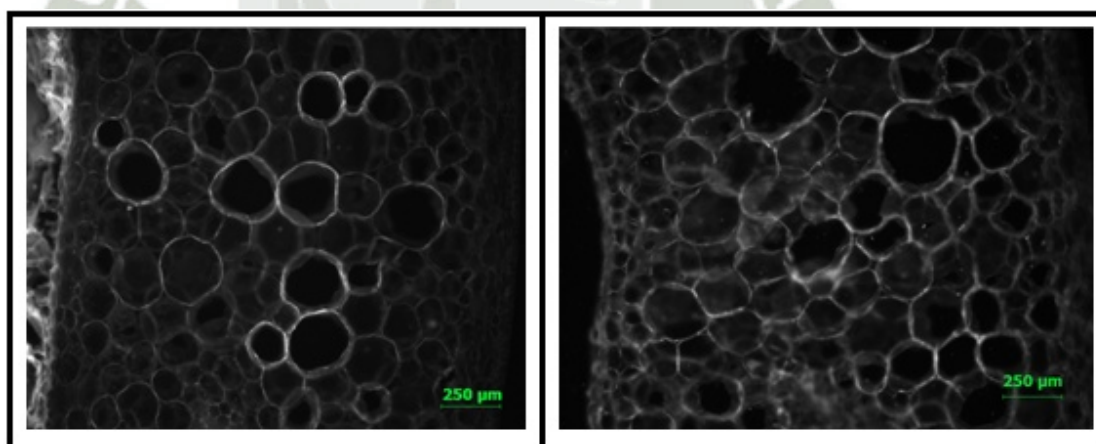


Figura 67. Pericarpios del mutante P40D11.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

- **Mutante P3C6.1:** En el caso de este mutante, solo se obtuvo una sola imagen analizable de pericarpio, ya que en la segunda muestra (Figura 68) se observaron varios haces vasculares que no permitieron el análisis de la imagen.

Se observó que las células del mesocarpio de este mutante son más alargadas que las del Wild Type (Figura 68).

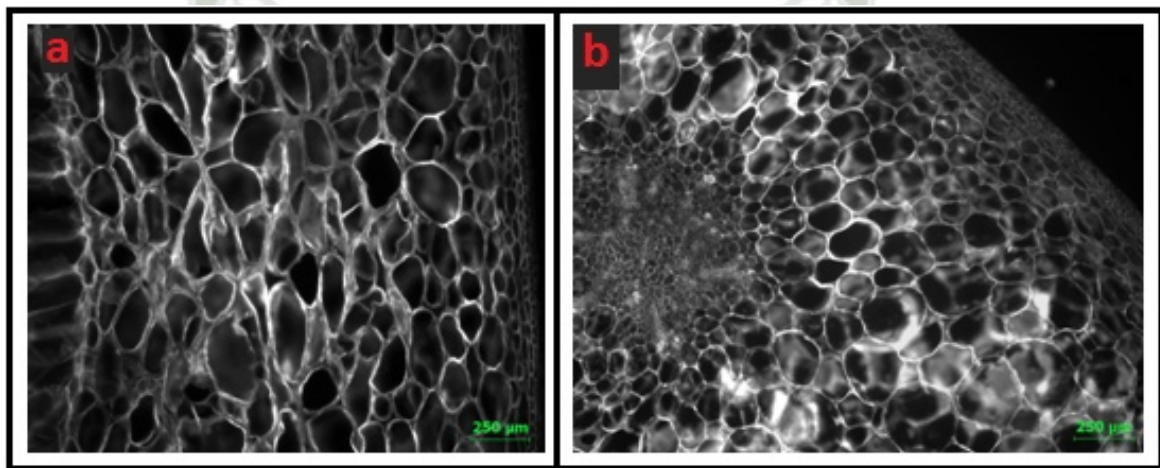


Figura 68. Pericarpios del mutante P3C6.1 de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

4.5.2 Determinación del espesor del pericarpio y del número de capas celulares

Se utilizó el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260 para determinar el espesor del pericarpio y el número de capas celulares del pericarpio, a partir de las imágenes microscópicas adquiridas, luego de haber realizado cortes de pericarpio con el equipo Vibratomo.

En la Tabla N° 9 se muestran los resultados de la medición del espesor del pericarpio en mm y el número de capas celulares del pericarpio, como resultado del promedio de los dos pericarpios utilizados por cada mutante y Wild Type.

Tabla N° 9. Espesor y número de capas celulares del pericarpio de los frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

MUTANTE	ESPESOR (mm)	N° de Capas celulares	Peso Fruto (g)
P11C11.11.1	2.52	22	6.28
P12H11.4	1.21	23	4.17
P1B3.7.11	2.55	17	8.81
P24C3.4	1.97	19	3.13
P29C1.7	1.88	18	5.20
P3C6.1	1.19	20	1.58
P3D3.12	1.61	25	3.92
P40D11.5	2.52	20	8.56
P40D7.12	2.24	20	7.26
P6C7.5	1.07	21	4.01
WT	2.45	20	5.36

Se encontró que podría haber una relación entre el espesor del pericarpio y el tamaño final del fruto, ya que los mutantes que desarrollaron frutos de menor tamaño que los frutos Wild Type (P12H11.4, P24C3.4, P3C6.1, P3D3.12 y P6C7.5), también tuvieron pericarpios más finos que los del Wild Type (Figura 69).

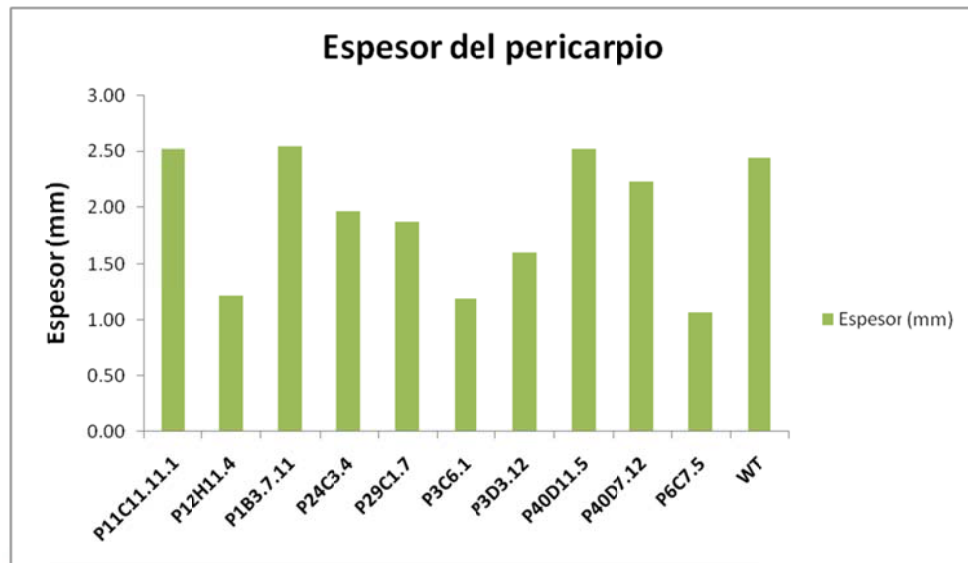


Figura 69. Espesor del pericarpio de los frutos de los distintos mutantes vs Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

Los mutantes que produjeron frutos de mayor tamaño que el Wild Type (P1B3.7.11 y P40D11.5) también produjeron frutos de pericarpio más espeso que el de los frutos Wild Type. Sin embargo, esta diferencia no fue muy notoria como en el caso de los frutos de menor tamaño.

Se encontró que el número de capas celulares no tiene ninguna influencia en el espesor del pericarpio. Por ejemplo, el mutante P3D3.12 fue el que contó con un mayor número de capas celulares, pero su pericarpio fue uno de los más delgados de la muestra de mutantes. Igualmente, el mutante P1B3.7.11 fue el que contó con el menor número de capas celulares, pero su pericarpio fue uno de los más espesos de la muestra, y es el que produjo los frutos de mayor tamaño.

Por lo tanto, el número de capas celulares no influye en el espesor del pericarpio ni en el tamaño final del fruto. Éste podría estar determinado por el espesor del pericarpio.

4.5.3 Determinación del área de las células del pericarpio

Se utilizó el software ImagePro-Plus v.6.0.0.260 para determinar el área de las células del pericarpio, a partir de las imágenes microscópicas adquiridas luego de haber realizado cortes de pericarpio con el equipo Vibratomo.

Este análisis fue realizado con el fin de determinar si existe una relación entre el área de estas células y el tamaño final del fruto de 'Micro-Tom'.

En la Tabla N° 10 se muestran los resultados de la medición del área de las células del pericarpio en μm^2 . Estos resultados son el promedio de los dos pericarpios utilizados por cada mutante y Wild Type.

Tabla N° 10. Área de las células del pericarpio.

MUTANTE	Área de células (μm^2)	Peso fruto(g)
P11C11.11.1	8 978.40	6.28
P12H11.4	7 637.29	4.17
P1B3.7.11	10 865.21	8.81
P24C3.4	9 416.22	3.13
P29C1.7	9 848.40	5.20
P3C6.1	7 213.90	1.58
P3D3.12	4 987.95	3.92
P40D11.5	10 784.37	8.56
P40D7.12	10 184.89	7.26

P6C7.5	10 128.18	4.01
WT	10 137.16	5.36

Se encontró que el área de las células del pericarpio Wild Type es de 10 137.16 μm^2 . Los mutantes que mostraron mayor diferencia con respecto al Wild Type fueron los mutantes P3D3.12 (4 987.95 μm^2), P3C6.1 (7 213.90 μm^2) y P12H11.4 (7 637.29 μm^2). El área de las células de sus pericarpios fue inferior a la del Wild Type (Figura 68).

El área de las células del pericarpio de los mutantes P1B3.7.11 y P40D11.5 fue ligeramente superior al área de las células del pericarpio Wild Type (10 865.21 μm^2 y 10 784.37 μm^2 , respectivamente) (Figura 70).

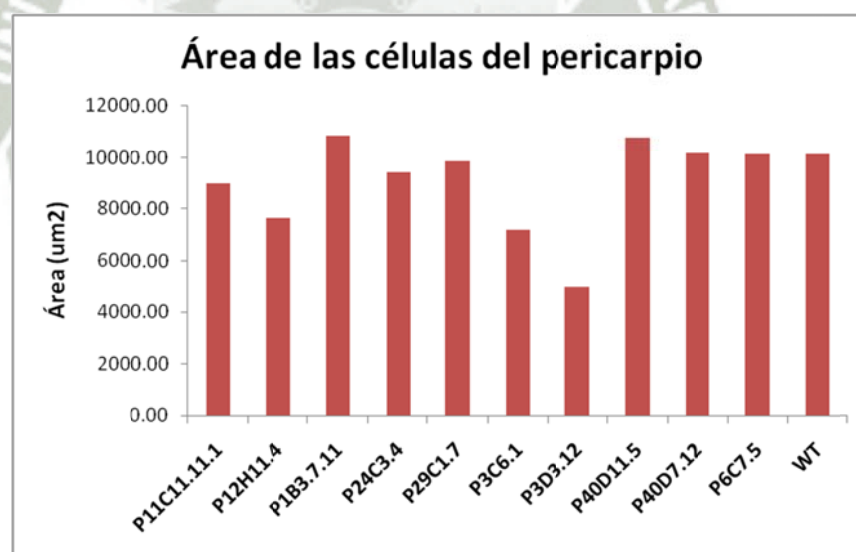


Figura 70. Área de las células del pericarpio de los frutos de los distintos mutantes vs Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Se observó que los mutantes cuyas áreas de las células del pericarpio fueron inferiores al área de las células Wild Type, desarrollaron frutos de menor tamaño que el Wild Type. Igualmente, los mutantes cuyas áreas de las células del pericarpio fueron ligeramente superiores al área de las células Wild Type, desarrollaron frutos de mayor tamaño que los frutos Wild Type. Esto indica que el área de las células del pericarpio podría influir en la determinación del tamaño final del fruto de *Solanum lycopersicum* cv. 'Micro-Tom'. Por otro lado, las mutaciones que determinan el pequeño tamaño de la planta y de los frutos de 'Micro-Tom', también podrían influenciar en el área de las células del pericarpio

4.6 MEDICIÓN DE LA ALTURA DE LAS PLANTAS DE *SOLANUM LYCOPERSICUM* (TOMATE) 'MICRO-TOM'.

La medición de la altura de las plantas fue tomada desde el inicio del tallo hasta el extremo apical. Los resultados se muestran en la tabla N° 11, y están expresados como el promedio de las tres plantas.

Tabla N° 11. Altura de las plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

MUTANTE	ALTURA DE PLANTA (cm)	PESO FRUTO (g)
P11C11.11.1	17	6.28
P12H11.4	13.13	4.17
P1B3.7.11	16.95	8.81
P24C3.4	14	3.13

P29C1.7	14.13	5.20
P3C6.1	16	1.58
P3D3.12	14.67	3.92
P40D11.5	18.27	8.56
P40D7.12	15.27	7.26
P6C7.5	15.93	4.01
WT	13.15	5.36

La altura promedio de las plantas Wild Type fue 13.15 cm y se encontró que fueron las más pequeñas junto con las plantas P12H11.4. El resto de mutantes mostraron una altura promedio mayor a la del Wild Type. Las plantas de mayor altura fueron P11C11.11.1 (17 cm), P1B3.7.11 (16.95 cm), P3C6.1 (16 cm) y P40D11.5 (18.27 cm). Estas diferencias se muestran en la Figura 71.

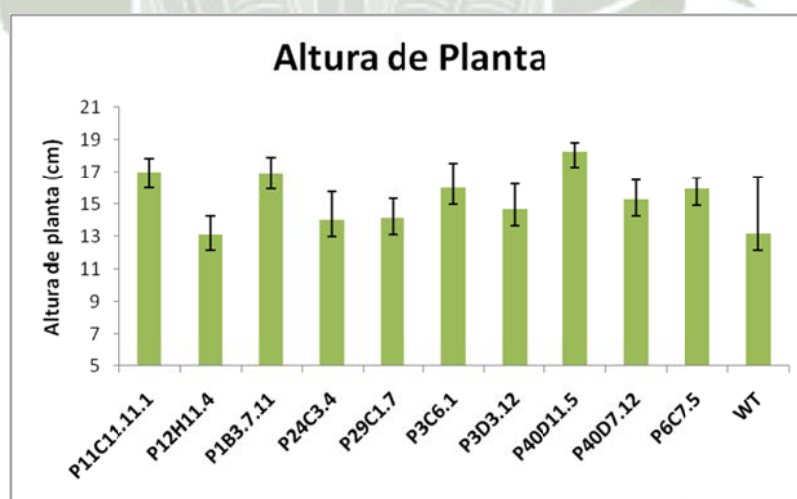


Figura 71. Altura promedio de las plantas mutantes y Wild Type de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'.

En la Figura 72 se muestra la diferencia de altura entre el Wild Type y la altura de la planta del mutante P40D11.5, que fue el mutante con las plantas más altas de la muestra.



Figura 72. Comparación de la altura de una planta Wild Type y una planta P40D11.5 de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Se encontró que no existe una relación entre la altura de la planta y el tamaño del fruto, ya que las plantas Wild Type fueron las más pequeñas. Incluso las plantas mutantes P3C6.1 y P6C7.5 que desarrollaron frutos pequeños mostraron una altura significativamente superior a la de las plantas Wild Type.

Por lo tanto, la altura de la planta no es un factor que influya en la determinación del tamaño final del fruto de *Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’.

Las plantas de *Solanum lycopersicum* cv. ‘Micro-Tom’ tienen una altura promedio de 15 cm, de acuerdo a los resultados mostrados. En la Figura 73 se muestra una comparación entre la altura de ‘Micro-Tom’ y otras variedades y se puede observar que las plantas ‘Micro-Tom’ son las más pequeñas.

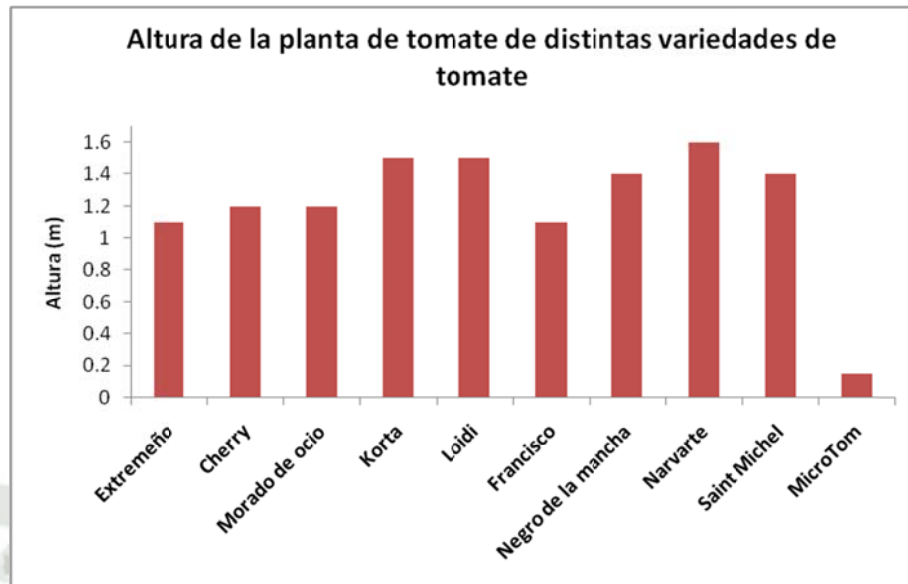


Figura 73. Comparación de la altura de distintas variedades de tomate vs el cultivar ‘Micro-Tom’ de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

El pequeño tamaño de las plantas de *Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’ se debe a la presencia de las mutaciones *mnt*, *sp* y *dwarf*.

La mutación *dwarf* es la más estudiada y responsable del tamaño de la planta y de los frutos, ya que se expresa en todos los tejidos vegetativos y reproductivos.

Esta mutación también es responsable del color verde oscuro de las hojas de ‘Micro-Tom’ y su aspecto rugoso (Figura 74), que difiere de las hojas lisas y de color verde claro de otras variedades.

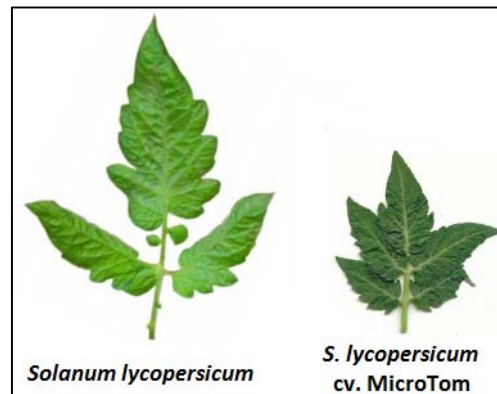


Figura 74. Características de una hoja de *S. lycopersicum* ‘Micro-Tom’.

La mutación *sp* provoca que el extremo apical del tallo deje de desarrollarse y de producir meristemos axilares.

Finalmente, la mutación *mnt* reduce la longitud internodal, ocasionando que la planta tenga una apariencia compacta (Figura 75), debido a un desequilibrio hormonal.



Figura 75. Apariencia compacta de la planta de *S. lycopersicum* ‘Micro-Tom’.

4.7 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS PLANTAS DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) 'MICRO-TOM'.

El rendimiento de cada mutante y del Wild Type fue determinado por el peso total de los seis frutos de cada planta. En la tabla N° 12 se muestran los resultados obtenidos, expresados como el promedio del rendimiento de las tres plantas.

Tabla N° 12. Rendimiento de las plantas de *S. lycopersicum* 'Micro-Tom'.

MUTANTE	RENDIMIENTO (g)
P11C11.11.1	37.70
P12H11.4	24.99
P1B3.7.11	54.28
P24C3.4	18.55
P29C1.7	31.17
P3C6.1	9.46
P3D3.12	23.49
P40D11.5	51.37
P40D7.12	43.54
P6C7.5	24.08
WT	32.24

Se encontró que el rendimiento del Wild Type fue 32.24 g. Los mutantes que tuvieron un rendimiento menor al del Wild Type fueron P12H11.4 (24.99 g), P24C3.4 (18.55 g), P3C6.1 (9.46 g), P3D3.12 (23.49 g) y P6C7.5 (24.08 g). Esto se debe a que sus frutos fueron los más pequeños de la muestra, sobre todo los del mutante P24C3.4.

Los mutantes que tuvieron un mayor rendimiento con respecto al Wild Type fueron P1B3.7.11 (54.28 g), P40D11.5 (51.37 g) y P40D7.12 (43.54 g), debido a que sus frutos fueron los de mayor tamaño, sobre todo los frutos del mutante P1B3.7.11.

Por lo tanto, el rendimiento de la planta de *Solanum lycopersicum* 'Micro-Tom' depende de manera directa del tamaño final de los frutos, y éste, a su vez depende de la eficiencia del transporte de nutrientes realizado por el floema y del área de las células del pericarpio, que se encuentran en expansión durante la segunda fase de desarrollo del fruto.

4.8 RELACIÓN ENTRE LAS MUTACIONES SELF-PRUNING (SP), DWARF (D) Y MINIATURE (MNT) Y LOS PARÁMETROS QUE PODRÍAN INFLUIR EN EL TAMAÑO FINAL DEL FRUTO Y EL RENDIMIENTO DE *Solanum lycopersicum* (TOMATE) 'MICRO-TOM'.

Las mutaciones *self-pruning*, *dwarf* y *miniature* son las que determinan el fenotipo de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'. De estas mutaciones, la más estudiada es *dwarf* (*d*), ya que es la que provoca la reducción del tamaño de la planta, y debido a que se expresa en los tejidos reproductivos, también es el origen de la reducción del tamaño del fruto.

De acuerdo a los resultados obtenidos, estas mutaciones además de afectar el tamaño de la planta y el tamaño final del fruto, también podrían tener un efecto en el área de las células del pericarpio, ya que éstas, durante la etapa de elongación celular, determinan el tamaño final del fruto de tomate (Tabla N° 13).

Se encontró que el tamaño del fruto depende también de la eficiencia del transporte del floema (capacidad floemiana), mas no del área del xilema o del pedicelo (Tabla N° 13).

Tabla N° 13. Relación entre la capacidad floemiana, el área de las células del pericarpio y el espesor del pericarpio con el rendimiento de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

Mutante	Capacidad Floemiana (g/μm²)	Área de las Células del Pericarpio (μm²)	Espesor del Pericarpio (mm)	Rendimiento (g)
P11C11.11.1	2.20x10 ⁻⁶	8978.40	2.52	37.70
P12H11.4	1.49x10 ⁻⁶	7637.29	1.21	24.99
P1B3.7.11	2.47x10 ⁻⁶	10865.21	2.55	54.28
P24C3.4	7.90x10 ⁻⁷	9416.22	1.97	18.55
P29C1.7	1.72x10 ⁻⁶	9848.40	1.88	31.17
P3C6.1	1.17x10 ⁻⁶	7213.90	1.19	9.46
P3D3.12	1.72x10 ⁻⁶	4987.95	1.61	23.49
P40D11.5	2.73x10 ⁻⁶	10784.37	2.52	51.37
P40D7.12	2.12x10 ⁻⁶	10184.89	2.24	43.54
P6C7.5	1.30x10 ⁻⁶	10128.18	1.07	24.08
WT	1.75x10 ⁻⁶	10137.16	2.45	32.24

4.9 CUADRO RESUMEN RESULTADOS

MUTANTE	PLANTA		FRUTO				TEJIDOS CONDUCTORES					ANATOMÍA DEL FRUTO		
	Altura (cm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	N° de lóculos	Dureza (Kg/cm ²)	SS (°Bx)	Área xilema (µm ²)	Área floema (µm ²)	Área pedicelo (µm ²)	Capacidad Floemiana (g/µm ²)	Espesor del pericarpio (mm)	N° Capas Celulares	Área de células pericarpio (µm ²)	
P11C11.11.1	17.00	6.28	23.72	3	1.280	6.88	1293409.9	271651.3	4930450.8	2.20x10 ⁻⁶	2.52	22	8978.40	
P12H11.4	13.13	4.17	20.45	3	0.770	6.58	801844.3	276100.0	4166362.9	1.49x10 ⁻⁶	1.21	23	7637.29	
P1B3.7.11	16.95	8.81	25.47	3	0.989	8.00	609814.6	169744.0	2979303.0	2.47x10 ⁻⁶	2.55	17	10865.21	
P24C3.4	14.00	3.13	18.35	3	0.765	7.55	663639.2	200946.3	2578347.7	7.90x10 ⁻⁷	1.97	19	9416.22	
P29C1.7	14.13	5.20	21.35	3	0.781	6.86	661279.9	316225.3	3685732.7	1.72x10 ⁻⁶	1.88	18	9848.40	
P3C6.1	16.00	1.58	14.4	3	0.919	10.24	650320.3	180145.0	2119283.5	1.17x10 ⁻⁶	1.19	20	7213.90	
P3D3.12	14.67	3.92	21.97	4	2.818	5.14	697863.3	218688.7	3949085.0	1.72x10 ⁻⁶	1.61	25	4987.95	
P40D11.5	18.27	8.56	27.09	3	0.974	6.64	1044030.1	324528.3	3920371.3	2.73x10 ⁻⁶	2.52	20	10784.37	
P40D7.12	15.27	7.26	25.14	3	0.857	5.76	970222.7	239670.6	3857747.3	2.12x10 ⁻⁶	2.24	20	10184.89	
P6C7.5	15.93	4.01	20.29	3	1.575	7.58	432358.7	211377.1	2689691.0	1.30x10 ⁻⁶	1.07	21	10128.18	
WT	13.15	5.36	22.66	3	0.946	6.82	954100.8	255224.7	3674183.6	1.75x10 ⁻⁶	2.45	20	10137.16	

SS: Sólidos Solubles.



CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

PRIMERA. Los frutos Wild Type tuvieron un peso promedio de 5.36 g y un diámetro promedio de 22.06 mm. Los mutantes P1B3.7.11, P40D11.5 y P40D7.12 fueron los que desarrollaron frutos de mayor tamaño en comparación con los frutos Wild Type, con un peso promedio de 8.81 g, 8.56 g y 7.26 g, respectivamente, y un diámetro promedio de 25.47 mm, 27.09 mm y 25.14 mm, respectivamente. Por consiguiente, también fueron los mutantes que mostraron un mayor rendimiento.

SEGUNDA. La eficiencia del transporte realizado por el floema tiene un efecto en el tamaño final del fruto, durante la etapa de elongación celular. La capacidad floemiana del Wild Type fue $1.75 \times 10^{-6} \text{ g}/\mu\text{m}^2$, mientras que la de los mutantes P1B3.7.11 y P40D11.5 fue $2.47 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2$ y $2.73 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2$, respectivamente, siendo estos mutantes los que desarrollaron frutos de mayor tamaño que los frutos Wild Type.

TERCERA. Tanto el espesor del pericarpio, como el área de las células del pericarpio tienen un efecto en la determinación del tamaño del fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom'. Los mutantes P1B3.7.11 y P40D11.5 que produjeron frutos de mayor tamaño que el Wild Type también produjeron frutos de pericarpio más espesos (2.55 mm y 2.52 mm, respectivamente) que el Wild Type (2.45 mm). Así mismo, el área de las células del pericarpio de estos mutantes ($10865.21 \mu\text{m}^2$ y $10784.37 \mu\text{m}^2$, respectivamente) fue mayor que en el Wild Type ($10137.16 \mu\text{m}^2$).

CUARTA. La altura de la planta y el tamaño final del fruto son dos variables independientes con una correlación negativa.

QUINTA. Las mutaciones *Sefl-Pruning*, *Dwarf* y *Miniature* presentes en el genoma de *Solanum lycopersicum* (tomate) 'Micro-Tom' además de reducir el tamaño de la

planta, tienen un efecto en el área de las células del pericarpio y en el espesor del pericarpio; dos parámetros involucrados en la determinación del tamaño final del fruto y en el rendimiento de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar más trabajos de investigación con los mutantes P1B3.7.11, P40D11.5 y P40D7.12, ya que fueron los que desarrollaron frutos de mayor tamaño y mostraron un mayor rendimiento. Estos mutantes podrían ser de utilidad en investigación sobre los parámetros que determinan el tamaño final del fruto de *Solanum lycopersicum* (tomate) ‘Micro-Tom’ y que puedan incrementar el rendimiento de la planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulnabi, A., Emhemed, A., Hussein, G & Peter, A. (1996). Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chem.* 60, 207-212.
- Anderson, L., Dible, M. & Tukki, P. (1998). *Nutrição*. Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil.
- Ariizumi, T., Shinozaki, Y. & Ezura, H. (2013). Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science*, 63, 3–13 .
- Arbo, M. (2001). Morfología de plantas vasculares. Tema 15: Tejidos Conductores o Vasculares. *Universidad Nacional del Nordeste*.
- Atta-Aly, M.A., El Beltagy, A.S., Lacheene, Z.S. & Riad, G.S. (1999). Delaying tomato fruit ripening using ethanol vapor through a dynamic air-flow system. *Post-harvest losses of perishable horticultural products in the Mediterranean region*. In : Gerasopou los D . (ed.), 19 -34.
- Bertin, N., Ghichard, N., Leonardi, C., Longuesse, J., Langlois, D. & Naves, B. (2000). Seasonal evolution quality of fresh glasshouse tomato under Mediterranean conditions, as affected by vapour pressure deficit and plant fruit load. *Ann. Bot.* 85, 741-750.
- Bishop GJ. (2003). Brassinosteroid mutants of crops. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, 325–335.
- Bishop, GJ., Nomura, T., Yokota, T., Harrison, K., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Jones, JDG. & Kamiya Y. (1999). The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 1761–1766.
- Bourdon, M. (2011). L'endoréduplication dans le développement du fruit de tomate : de la structure à la croissance cellulaire. *Université Bordeaux I*.

- Bramlage, W. (1983). Measuring Fruit Firmness with a Penetrometer. *Post Harvest Pomology Newsletter*, 1, N° 3.
- Bussieres P. (1994). Water Import Rate in Tomato Fruit: A Resistance Model. *Annals of Botany*, 73, 75-82.
- Campos, M., Carvalho, R., Benedito, V. & Pereira Peres, L. (2010). Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. *Plant Signaling & Behavior* 5 (3), 267-270.
- Carvalho, R., Campos, M., Pino, L., Crestana, S., Zsögön A., Lima, J., Benedito, V., & Peres, L. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7:18.
- Czerednik, C., Busscher, M., Bielen, B., Wolters-Arts, M., A. de Maagd, R & Angenent, C. (2012). Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. *Journal of Experimental Botany*, 1-13.
- Cheniclet, C., Rong, W., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, JP. & Renaudin, JP. (2005). Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiology*, 139, 1984–1994.
- Clemente, N. (2010). Calidad postcosecha de tomate (*Solanum lycopersicon L.*) producido con agua residual y de pozo en hidroponía y suelo. *Universidad Autónoma Chapingo*.
- Clutter, M. & Miller, E. (1961). Ascorbic acid content and time of ripening of tomatoes. *Society for economic botanic*, 15, 218-222.
- Cong, B., Barrero, L & Tanksley, S. (2008).Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, 40 (6), 800-804.

- Coombe, B. (1976). The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 27, 207-222
- Davies, JN. & Cocking, EC. (1965). Changes in the carbohydrates, proteins and nucleic acids during cellular development in tomato fruit locule tissue. *Planta*, 67, 242-246.
- Davies, JN., & Robson, G. (1981). The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition and genotype. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 205-280.
- Dorais, M., Gosselin, A. & Papadopoulos, P. (2001). Greenhouse tomato fruit quality. *Hortic. Rev.* 26, 239-306.
- Erner, Y. & Shomer, I. (1995). Morphology and Anatomy of Stems and Pedicels of Spring Flush Shoots Associated with Citrus Fruit Set. *Annals of Botany*, 77, 537-545.
- Fajardo, R. & Mahecha, C. (1992). Seguimiento del proceso de maduración del tomate (*Lycopersicon esculentum mili*) y desarrollo de normas preliminares de calidad en las variedades chonto y milano. *Revista colombiana de química*, 21, 43-54.
- Frery, A., Nesbitt, T., Frery, A., Grandillo, S., van der Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K. & Tanksles, S. (2000). fw2.2: A Quantitative Trait Locus Key to the Evolution of Tomato Fruit Size. *Science*, 289, 85.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. & Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, 5, 1439-1451.
- Giordano, L., and Silva, J. (2000). Tomate para processamento industrial. *Embrapa comunicação para transferência de tecnologia*. Brasília, Distrito Federal, Brazil.
- Giovanelli, G., Lavelli, V., Peri, C. & Guidi, L. (1998). Variation of antioxidant content in tomato during ripening. *Proc. Tomato and Health Seminar*, 25, 122-130.
- Giovannoni, J. (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 283-289.

Greenspan, MD., Shackel, KA. & Matthews, MA. (1994). Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell and Environment*, 17, 811–820.

Grierson, D. & Kader, A. (1986). Fruit ripening and quality. In: Atherton, J. & Rudich J. [eds.]. *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall, London, UK, 241-280.

Harrington, BJ. & Hageage, GJ. (2003). Calcofluor white: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology, *Lab Med*, 34, 361-7.

Ho, L. (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J. Exp. Bot.*, 47, 1239-1243.

Ho, L. & Hewitt, D. (1986). Fruit development. *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. In: J.G. Atherton and J. Rudich. (eds.). Chapman and Hall, London, UK. 201-240.

Jones, JB., Jones, JP., Stall, R. & Zitter, T. (1991). *Compendium of Tomato Diseases*. APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.

Joubès, J., Phan, TH., Just, D., Rothan, C., Bergounioux, C., Raymond, P. & Chevalier, C. (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol*, 121, 857–869.

Kevany, B., Tieman, D., Taylor, M., Dal Cin V. & Klee, H. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, 51, 458–467.

Kojima, K., Sakurai, N., Kuraishi, S., Yamamoto, R. and Nevins, D. Novel Technique for Measuring Tissue Firmness within Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). (1991). Fruit *Plant Physiol*, 96, 545-550.

- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C & Rothan, C. (2005). Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology*, 139, 750–769.
- Lippman, Z. & Tanksley S. (2001). Dissecting the Genetic Pathway to Extreme Fruit Size in Tomato Using a Cross Between the Small-Fruited Wild Species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158, 413–422.
- López, G. (2006). Biomecánica de la epidermis y la cutícula del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y su relación con el agrietado. *Universidad de Málaga*.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G., Dixon, M. & García-Martínez, J. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, 57 (9), 2037–2047.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., & Levy, A., (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, 12, 1465–1472.
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Bérard, A., Rolland, S & Duffé, P. (2011). Increase in Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near WUSCHEL *Plant Physiology*, 156, 2244–2254.
- Montoya, T., Nomura, T., Yokota, T., Farrar, K., Harrison, K., Jones, JGD., Kaneta, T., Kamiya, Y., Szekeres, M., Bishop, GJ. (2005). Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant Journal*, 42, 262–269.
- Nadzhimov, UK., Jupe, SC., Jones, MG. & Scott, IM. 1988. Growth and gibberellin relations of the extreme dwarf dx tomato mutant. *Physiologia Plantarum*, 73, 252–256.
- Neiker (2002). Caracterización de variedades locales de hortalizas. *Euskal Herriko Hazien sarea*, 66-68.

- Olimpia G.; Casanova A.; Laterrot H.; Anaïs G. (2000). Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe. *Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova"*, 159.
- Pinheiro, S. & Almeida, D. (2002). Modulation of tomato pericarp firmness through pH and calcium: Implications for the texture of fresh-cut fruit. *Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Praca Gomes Teixeira*, 4099-002 Porto, Portugal.
- Pino, E., Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M., Scotton, D., Borgo, L., Quecini, V., Figueira, A. & Peres, L. (2010). The Rgl allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. *Plant Methods* 6, 23.
- Pirrello, J., Regad, F., Latché, A., Pech, J.C. & Bouzayen, M. (2009). Regulation of tomato fruit ripening. *CAB Reviews*, 4 (51), 1-14.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D. & Lifschitz, E. (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development*, 125, 1979-1989.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N. & Lifschitz E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *The Plant Cell*, 13, 2687-2702.
- Preed, V. & Watson, R. (2008). Tomatoes and Tomato Products: Nutritional, Medicinal and Therapeutic Properties. *Science Publishers*.
- Rančić, D., Pekić Quarrie S. & Pećinar, I (2010). Anatomy of tomato fruit and fruit pedicel during fruit development. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.), 851 – 861.
- Rancic, D., Quarrie, S., Terzic, M., Savic, S. and Stikic, R. (2008). Comparison of light and fluorescence microscopy for xylem analysis in tomato pedicels during fruit development. *Journal of Microscopy*, 232, 618-622.

Rao, K., Kiranmayee, K., Pavan, U., Rao, T & Sadanandam, A. (2005). Induction of multiple shoots from leaf segments, in vitro-flowering and fruiting of a dwarf tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Plant Physiology*, 162, 959—962.

Roa de Acevedo, S. y Arcia, A. (1988). Comportamiento de tres variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en diferentes años de siembra. *Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía*.

Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D & Hirschberg, J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal*, 17(4), 341–351.

Sauca, E. & Marcelino, S. (2009). Recuperación y mantenimiento de la biodiversidad agrícola de interés en Álava: Fichas de caracterización. *Euskal Herriko Hazien sarea*, 46-71.

Scott, J., & Harbaugh, B. (1989). Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experimental Station Circular*, S-370, 1–6.

Salisbury F. & Ross C. (2000). Fisiología de las plantas I: Células: agua, soluciones y superficies. *Thomson editores Spain*. 243-247, 269-270.

Silva, D., Abreu, F., Caliman, F., Antonio, A. & Patel, V. (2008). Tomatoes: Origin, Cultivation Techniques and Germplasm Resources. *Tomatoes and tomato products: nutritional, medicinal and therapeutic properties*. Science Publishers, 3-25.

Srdić, M. (2004). Influence of partial root drying on morpho-anatomical and physiological characteristics of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* L.). *Journal of Agricultural Sciences*, 49, 13-23.

Stevens, A. & Rick, C. (1986). Genetics and breeding. *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. In: J.G. Atherton and J. Rudich. (eds.). Chapman and Hall, London, UK. 35-110.

- Stevens, M. (1972). Citrate malate concentrations in tomato fruits: genetic control and maturational effects. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 97, 655-658.
- Sun, H., Uchii, S., Watanabe, S. & Ezura, H. (2006). A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. *Plant Cell Physiol.* 47(3): 426-431.
- Tanksley, S. (2004). The Genetic, Developmental, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. *The Plant Cell*, 16, 181-189.
- Tieman, D., Harriman, R., Ramamohan G & Handa, A. (1992). An Antisense Pectin Methylesterase Gene Alters Pectin Chemistry and Soluble Solids in Tomato Fruit. *Plant Cell*, 4, 667-679.
- Valero, C., Crisosto, C. & Slaughter, D. (2007). Relationship between nondestructive firmness measurements and commercially important ripening fruit stages for peaches, nectarines and plums. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 248-253.
- Viron, N. (2010). Identification et validation de nouveaux gènes candidats impliqués dans la régulation du développement du fruit de tomate. *Université de Bordeaux 1*.
- Walker, A. & Ho, L. (1977). Carbon Translocation in the Tomato: Carbon Import and Fruit Growth. *Annals of Botany*, 41 (4), 813-823.
- Wang, X., Liu, D., Li, A., Sun, X. & Zhang, R. (2013). Transcriptome Analysis of Tomato Flower Pedicel Tissues Reveals Abscission Zone-Specific Modulation of Key Meristem Activity Genes. *PLoS ONE* 8(2): e55238. doi:10.1371/journal.pone.0055238.
- Walker, AJ & Ho, LC. (1977). Carbon translocation in the tomato: Carbon import and fruit growth. *Ann. Bot.*, 41, 813-823.
- Young, T., Juvik, JA. & Sullivan, JG. (1993). Accumulation of the Components of Total Solids in Ripening Fruits of Tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118, (2),286-292.