



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL MICRO-INJERTO IN
VITRO DE TOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) VAR. TOMATE ROSADO
SOBRE PATRÓN 'MAXIFORT'**

ALONDRA MORALES OLGUÍN

**Santiago, Chile
2022**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL MICRO-INJERTO IN VITRO DE TOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) VAR. TOMATE ROSADO SOBRE PATRÓN ‘MAXIFORT’

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR IN VITRO MICRO-GRAFTING OF TOMATOES (*Solanum lycopersicum* L.). ROSADO TOMATO VARIETY ON ‘MAXIFORT’ ROOTSTOCK

ALONDRA MORALES OLGUÍN

Santiago, Chile

2022



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL MICRO-INJERTO IN
VITRO DE TOMATES (*Solanum lycopersicum* L.) VAR. TOMATE ROSADO
SOBRE PATRÓN 'MAXIFORT'**

Memoria para optar al título
Profesional de Ingeniera Agrónoma

ALONDRA MORALES OLGUÍN

PROFESOR (A) GUÍA

Sr. Ricardo Pertuzé C.
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

Calificaciones

6,7

PROFESORES EVALUADORES

Sra. María Loreto Prat D.
Ingeniera Agrónoma, Mg. Sc.

6,5

Sra. María Teresa Varnero M.
Químico Farmacéutico

6,0

Santiago, Chile
2022

A MIS PADRES

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres Sofía y Marco, que los admiro y amo profundamente, sin ellos no estaría donde estoy. A mi hermano Franco por ser mi amigo y confidente. Agradezco inmensamente a mi pareja Edgar por su apoyo incondicional, amor y compañerismo todos estos años,

A mis abuelos Olga y Malaquías por entregarme las enseñanzas y el amor a la vida de campo, les rindo homenaje por todos sus años de esfuerzo y vida.

A mi profesor guía Ricardo Pertuzé por su enseñanza, comprensión y orientación constante, no solo durante la memoria sino en todo mi desarrollo académico.

Al equipo del laboratorio de cultivo de tejidos y del laboratorio de mejoramiento hortícola, en especial a Marisol Valdés por su tiempo, cariño y enseñanza, no hubiese sido posible sin su paciencia y dedicación.

A la profesora Verónica Díaz por escucharme en momentos de inseguridad y orientarme.

A cada amigo y amiga que me presto su hombro en momentos difíciles y me entrego sus sonrisas.

CON MUCHO AMOR PARA TODOS USTEDES.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
METODOLOGÍA	6
Materiales	6
Metodología.....	6
Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Ensayo A. Efecto del momento de la micro-injertación de tomate ‘Maxifort’ autoinjertados.....	13
Ensayo B. Efecto de la concentración de sacarosa en micro-injertos de tomate var. Rosado sobre patrones ‘Maxifort’	15
Trasplante y aclimatación.....	17
Porcentaje de contaminación	20
Otras observaciones	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
APÉNDICES	27
ANEXO.....	29

RESUMEN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Chile mantiene una alta rentabilidad y un sostenido desarrollo. Siendo el injerto tradicional una práctica muy usada, esta puede presentar algunas desventajas, tales como, altos costo de las plantas, incompatibilidad entre patrón e injerto, efectos negativos sobre la calidad de los frutos, etc. Por otra parte, el micro-injerto permite investigar la función genética y la traducción de señales a larga distancia, proporciona información sobre la compatibilidad de los injertos y el comportamiento nutricional de las plantas. En búsqueda de nuevas tecnologías para injertos de tomate se planteó la siguiente investigación ‘Establecimiento de un protocolo para el micro-injerto de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) var. Tomate Rosado sobre patrón ‘Maxifort’ permitiendo así potenciar el conocimiento e innovación, y detectar los factores que afectan el éxito de micro-injertos para estas variedades de tomate. La investigación constó de dos etapas, Ensayo A y Ensayo B respectivamente, en ambos ensayos se utilizó la misma metodología, es decir, desinfección de las semillas, siembra, micro-injertación y, pegado del injerto. Se evaluó el porcentaje de prendimiento para dos tiempos de crecimiento en autoinjertos de tomate ‘Maxifort’, a los 19 y 26 días desde la siembra. Además, se evaluó el porcentaje de prendimiento de tomate var. Rosado sobre patrones ‘Maxifort’ y el efecto de dos concentraciones de sacarosa (30 g L^{-1} y 20 g L^{-1}) sobre el porcentaje de prendimiento y crecimiento promedio (por tratamiento) en estas variedades. Se determinó que no existieron diferencias significativas en los tiempos de crecimiento desde la siembra sobre el porcentaje de prendimiento en tomates var. Maxifort autoinjertados. La concentración de sacarosa en el medio MS si provocó efectos en el crecimiento de las plantas var. Rosado sobre patrón ‘Maxifort’, arrojando mayor crecimiento en el largo total de las plantas y el largo del esqueje en micro-injertos suplementados con 30 g L^{-1} de sacarosa. Por otra parte, el porcentaje de prendimiento no se vio afectado por la concentración de sacarosa, por ende no demostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Palabras claves

Porcentaje de prendimiento, Concentración de sacarosa.

SUMMARY

The cultivation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Chile maintains high profitability and sustained development. Being traditional grafting a widely used practice, it can present some disadvantages, such as high cost of the plants, incompatibility between rootstock and graft, negative effects on the quality of the fruits, etc. On the other hand, micro-graft allows to investigate the genetic function and the translation of signals at long distances, it provides information on the compatibility of the grafts and the nutritional behavior of the plants. In search of new technologies for tomato grafting, the following investigation was proposed 'Establishment of a protocol for in vitro micro-grafting of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) Rosado Tomato variety on 'Maxifort' rootstock', thus allowing to enhance knowledge and innovation, and to detect the factors that affect the success of micro-grafting for these tomato varieties. The investigation consisted of two stages, Test A and Test B respectively, both trials went through processes of seed disinfection, sowing, micro-grafting and graft bonding. The percentage of graft bonding was evaluated at two growing times in tomatoes var. Maxifort autografted, at 19 y 26 days from sowing. In addition, the bonding percentage of tomato var. Rosado on 'Maxifort' standards and the effect of two concentrations of sucrose (30 g L⁻¹ and 20 g L⁻¹) on the bonding percentage and growth (per treatment) in these varieties. It was determined that there were no significant differences in growing time on the autograft bonding percentages in tomatoes var. Maxifort. The sucrose concentration in the MS medium did cause effects on plants var. Rosado on a 'Maxifort' rootstock growth, yielding greater growth in the total length of the plants and the length of the cutting in micro-grafts supplemented with 30 30 g L⁻¹ of sucrose. On the other hand, the bonding percentage was not affected by the concentration of sucrose, therefore it did not show significant differences between the treatments.

Key words

Bonding percentages, sucrose concentration.

INTRODUCCIÓN

El tomate fresco en Chile es el tercer cultivo con mayor superficie en el país con 4.900 ha, siendo la Región Metropolitana la que presenta la mayor extensión con 1.187 ha (ODEPA, 2019). Chile posee una producción de 872.485 toneladas de tomate, cuyo rendimiento promedio para fresco es de 63 t ha⁻¹, esta supera a países como China, Italia, México, Brasil. En Chile este cultivo mantiene una alta rentabilidad y un sostenido desarrollo hace más de una década, obligando a los agricultores a sumar nuevas tecnologías, para así mantener sus rendimientos (INIA, 2017).

A nivel mundial, el uso de injertos en hortalizas ha presentado un crecimiento considerable (Lee, 1994), ya que, proporciona resistencia y/o tolerancia en condiciones de estrés biótico (enfermedades y nemátodos) y abiótico (salinidad, bajas temperaturas, sequía) (Moreno *et al.*, 2015). El injerto considera la unión de dos secciones de tejidos vegetales vivientes permitiendo que se unan, crezcan y desarrollen como una sola planta (Velasco, 2013). El segmento que aportará las raíces en un futuro es conocido como patrón o portainjerto, mientras que el que contribuye con la parte aérea (hojas y tallo) de la planta se denomina injerto (Moreno *et al.*, 2015).

Cabe mencionar la relevancia que tiene la humedad relativa y temperatura para el éxito del injerto, siendo ideal entre un 80 a 90% HR y una temperatura óptima entre 25-28°C, esta influye notablemente en la división celular y, por ende, en la formación del callo (conexión entre el vástago y el portainjerto) y la diferenciación de nuevos haces vasculares (floema y xilema). Todos estos factores tendrán un efecto en la tasa de supervivencia y calidad del injerto (Villasana, 2010).

El injerto es una práctica cultural, siendo un importante componente de los sistemas de Manejo Integrado de Plagas en los cultivos protegidos de solanáceas y cucurbitáceas (Farah *et al.*, 2008). Muy usado en cultivos de tomate bajo condiciones de invernadero (Villasana, 2010), ya que, posibilita el uso de portainjertos resistente a enfermedades transmitidas desde el suelo y nemátodos, disminuyendo el uso de agroquímicos y por ende el impacto ambiental del cultivo (Lows y Rivard, 2008). Considerando que un 20% de la superficie total cultivada de tomate fresco en el país corresponde a invernadero (INIA, 2017) y que pueden existir algunas desventajas en el uso del injerto tradicional como el alto costo de las plantas, incompatibilidad entre patrón e injerto, y efectos negativos sobre la calidad de los frutos (Moreno *et al.*, 2015) es relevante realizar investigaciones que potencien la innovación y nuevas tecnologías en injertos.

Una potencial forma de estudiar los injertos es a través de micro-injertos. Esta técnica se desarrolló en 1980 y consiste en colocar en condiciones asépticas un vástago miniaturizado sobre un patrón cultivado *in vitro* o *in vivo* (Jonard, 1986), el cual proporciona información sobre la compatibilidad de los injertos (Rêgo *et al.*, 2010) y permite conocer el comportamiento nutricional de las variedades del patrón, facilitando así elaborar programas de fertilización acordes a las demandas del cultivar (INIA, 2017). Además, la técnica del

micro-injerto se puede utilizar como una herramienta clave para la evaluación de la función de genes y su traducción de señales a larga distancia en distintos estados de desarrollo y fisiológicos, un ejemplo de ello fue el estudio realizado en *Nicotiana attenuata* por Fragoso *et al.* (2011).

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un fragmento de tejido (protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva en forma aséptica, en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (CIAT 1991). La técnica *in vitro* permite replicar todos los factores que inciden en el crecimiento y desarrollo de las plantas, en ausencia de patógenos por ende dejando a disposición material vegetal libre de enfermedades (Castillo, 2004), además de proporcionar una tasa alta de multiplicación de plantas (Rêgo *et al.*, 2010). Estas características permiten estudiar y posteriormente introducir al mercado nuevas variedades de plantas seleccionadas por sus características (Holdgate y Zandvoort, 1992).

Existen muchos factores que influyen en el éxito del micro-injerto *in vitro*, tales como el procedimiento realizado, la posición del injerto, tipo de vástago, longitud del vástago, siendo un factor de gran importancia la edad del vástago (Tanuja *et al.*, 2017). Truong y Thi (2018) demostraron que al utilizar plantas de tomate de edad 5 días después de germinación permite un mayor éxito del injerto que en plantas con 10 y 15 días de edad, ya que, plantas más jóvenes poseen gran capacidad de regeneración de tejidos. Así mismo se evaluó la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo MS (medio Murashige y Skoog), determinando que los niveles de sacarosa afectan la tasa de éxito del micro-injerto. Injertos interespecíficos tomate/berenjena y berenjena/tomate alcanzaron las tasas de éxito más altas (83% para ambos injertos) en el medio suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, seguido por los tratamientos de 20 g L⁻¹ (78 y 80%, respectivamente). Por otra parte, los niveles de sacarosa afectaron el potencial de crecimiento de las plantas, influyeron ligeramente en el número de hojas y drásticamente en el número de raíces, longitud de tallo y el crecimiento total de las plantas injertadas, dando excelentes resultados en medios suplementados con 20-30 g L⁻¹ de sacarosa para injertos auto-específicos e interespecíficos. Por otro parte Rêgo *et al.* (2010) determinó que el medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa es el más adecuado para micro-injertos de *Solanum lycopersicum* con método de T invertida, presentando la mayor tasa de supervivencia en plantas comparadas con micro-injertos estilo bisel.

Basándose en los antecedentes presentados, la presente investigación describe un protocolo para la micro-injertación *in vitro* de tomate contribuyendo así con el desarrollo y conocimiento de la especie y las variedades usadas para el micro-injerto.

Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la micro-injertación in vitro de tomates.

Objetivos específicos

Evaluar el porcentaje de prendimiento para dos tiempos de crecimiento desde la siembra del material vegetal, en autoinjertos (micro-injerto) de tomate 'Maxifort'.

Evaluar el porcentaje de prendimiento para vástagos de tomate 'Rosado' sobre patrones de tomate 'Maxifort'.

Determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de prendimiento y crecimiento de micro-injertos de tomate 'Rosado' (vástago) sobre patrón 'Maxifort'.

METODOLOGÍA

La investigación fue realizada durante los años 2019-2021. Se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos y el laboratorio de Mejoramiento hortícola la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Campus Antumapu, Avenida Santa Rosa 11.315, comuna de La Pintana, Santiago de Chile.

Materiales

El proyecto consistió en dos etapas, **Ensayo A** y **Ensayo B**, para los cuales se dispuso de los siguientes materiales:

Para el Ensayo A se utilizaron semillas de tomate variedad Maxifort como vástago y portainjerto. Para el caso del Ensayo B se emplearon semillas de tomate variedad Rosado sobre patrones de la variedad Maxifort. El tomate ‘Rosado’ es una variedad antigua, de color rosado, de tamaño grande, piel delgada, con mucha pulpa, muy sabroso y de exquisito sabor. Es una variedad escasa (Manzur *et al.*, 2016). El tomate ‘Maxifort’ es una variedad muy utilizada como portainjertos de tomate y berenjena, presenta buen vigor, buen comportamiento con bajas temperaturas y en condiciones de alta salinidad (Vanina, 2017). Se utilizó semillas Maxifort ‘RUDE’, con un 90% de germinación envasada el 06/2016. Las semillas fueron obtenidas del Banco de semillas Hortícolas de la Universidad de Chile (BSHUCH).

El ensayo se realizó sobre medio MS, el cual ha sido ampliamente utilizado para el estudio de cultivo de tejidos vegetales, y contiene macronutrientes, micronutrientes y vitaminas descritos por Murashige y Skoog (1962).

Metodología

Tratamiento y diseño experimental

Se realizó una primera etapa (**Ensayo A**) donde se evaluó dos condiciones para la micro-injertación. Los tratamientos se establecieron en un ensayo con un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones cada uno. El primer tratamiento estaba compuesto de plántulas con 26 días de crecimiento al momento del injerto (T1) y el segundo tratamiento 19 días de crecimiento al momento del injerto (T2), definidos por la cantidad de días desde la siembra al momento de la micro-injertación (Cuadro 1). La unidad experimental

consistió en 12 tubos de ensayo con una planta injertada en cada uno. Todos los injertos fueron de tipo púa con corte en T.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos empleados en el Ensayo A, en base a los días de crecimiento desde la siembra hasta la micro-injertación de vástagos var. Maxifort sobre sí mismo.

Tratamiento	Vástago	Patrón	Crecimiento plántulas al momento del injerto (Días desde la siembra)
T1	'Maxifort'	'Maxifort'	26
T2	'Maxifort'	'Maxifort'	19

Se desarrolló una segunda etapa (**Ensayo B**) donde se evaluaron dos concentraciones de sacarosa en el medio cultivo (20 g L^{-1} y 30 g L^{-1}) sobre el crecimiento de micro-injertos y su impacto en el porcentaje de prendimiento. Para ello se establecieron dos tratamientos con un diseño completamente aleatorizado (DCA), considerando tres repeticiones cada uno (Cuadro 2). En este caso la unidad experimental fueron cuatro tubos de ensayo con una planta cada uno.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos utilizados en el Ensayo B, con sus respectivos niveles de concentraciones de sacarosa para la micro-injertación de vástagos de tomate 'Rosado' sobre patrones variedad Maxifort.

Tratamiento	Vástago	Patrón	Concentración de sacarosa (g L^{-1})
T1	'Rosado'	'Maxifort'	30
T2	'Rosado'	'Maxifort'	20

Manejo del ensayo

Los siguientes pasos fueron realizados para los Ensayos A y B:

Desinfección de semillas. Las semillas fueron desinfectadas en una botella de vidrio de 200 mL (Figura 1), en 40 mL de solución de agua destilada estéril más hipoclorito de sodio al 20% (V/V) para el Ensayo A y 5% (V/V) para el Ensayo B, con una gota de Tween 80 y colocadas en el agitador durante un período de 15 minutos. Posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar (Apéndice I) para mantener la condición de asepsia, entre cada enjuague el tubo fue posicionado 5 minutos en el agitador.

Para el **Ensayo A** se consideró la desinfección de seis grupos de semillas (G1-G6), con 25 a 32 semillas cada uno (Cuadro 3).

Para el **Ensayo B** se desinfectó un total de 100 semillas de la variedad tomate Rosado en dos grupos.

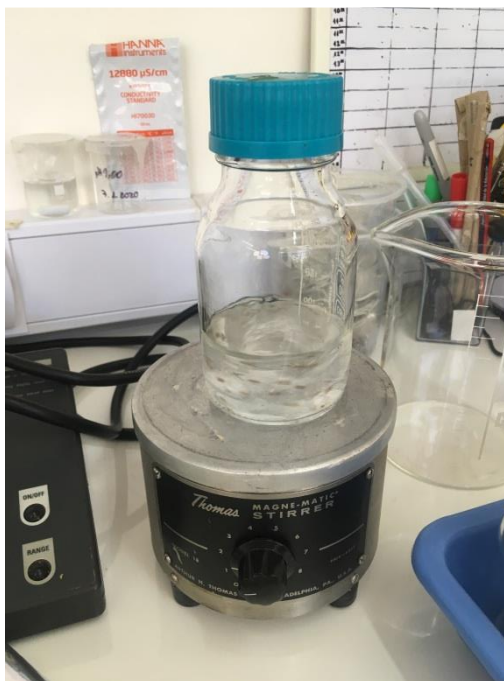


Figura 1. Proceso de agitación de semillas con 20% V/V de cloro para desinfección de semillas 'Maxifort', Ensayo A.

Siembra in vitro. Las semillas se sembraron en un medio de cultivo estéril que se suplementó con $4,43 \text{ g L}^{-1}$ de MS (Murashige y Skoog, 1962), 8 g L^{-1} de agar L^{-1} , $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarosa para el **Ensayo A**. Para el caso del **Ensayo B** donde la concentración de sacarosa fue uno de los factores a evaluar se utilizaron 30 g L^{-1} de sacarosa para el T1 y 20 g L^{-1} de sacarosa para el tratamiento T2. Una vez terminado el proceso de preparación del medio se ajustó a un pH 5,5 y se vertió 10 mL en cada uno de los frascos para siembra, se dejaron enfriar y posteriormente fueron refrigerados 24 horas previas a la esterilización en autoclave. Esta esterilización eleva la temperatura a 121°C durante un periodo de 10-20 min, dependiendo del volumen de los objetos (Madigan *et al.*, 1997).

Para el **Ensayo A**, la siembra fue efectuada en seis grupos distintos (G1-G6), asignando tres grupos a cada tratamiento a modo de repetición. Sembrados en orden T1 y T2 respectivamente en el tiempo para así cumplir los días necesarios para ser injertados (Cuadro 3).

Para el **Ensayo B**, 40 semillas de tomate var. Rosado fueron sembradas el día 21 de diciembre de 2020 y 60 semillas el 29 de diciembre del 2020.

Para ambos ensayos la siembra se realizó en frascos de vidrio dentro de la cámara de flujo laminar. Posterior a ella los frascos fueron colocados en la cámara de crecimiento con una temperatura de 25°C , fotoperiodo 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Cuadro 3. Calendario de desinfección y siembra del Ensayo A con sus respectivos tratamientos (T1 y T2) y grupos de desinfección (G1-G6) para las 3 repeticiones.

T1			T2		
Desinfección/Siembra			Desinfección/Siembra		
03/12/20	04/12/20	09/12/20	10/12/20	11/12/20	16/12/20
G1	G2	G3	G4	G5	G6
32 Sem	27 Sem	27 Sem	28 Sem	30 Sem	26 Sem
Total= 3 repeticiones			Total= 3 repeticiones		

Sem: semillas

Micro-injertación. Fue efectuada dentro de la cámara de flujo laminar, se utilizó un bisturí hoja 11 mango 3 para la disección de las plantas. Se injertó en la región del hipocótilo, eliminando los cotiledones para así evitar crecimiento de yemas laterales, ya que este crecimiento debe ser descartado al entregar el material vegetal para su cultivo (Bletsos y Christos, 2008). Las plantas fueron cortadas en dos segmentos (inferior y superior), y el vástago al ser de tipo púa presentó de 3-4 yemas. Se usaron pinzas alargadas y puntiagudas esterilizadas para posicionar la variedad sobre el patrón, permitiendo así la introducción del material vegetal a los tubos de ensayo.

Para el **Ensayo A** se usó un total de 46 plantas de tomate var. Maxifort, esto fue determinado por la baja germinación presentada. La micro-injertación se realizó en tres fechas distintas definidas en el calendario de micro-injertación presentado en el Cuadro 4. Las plantas de tomate ‘Maxifort’ se cortaron en dos segmentos (inferior y superior). El segmento inferior se utilizó como patrón, siendo eliminadas las raicillas formadas durante el periodo inicial de crecimiento. El segmento superior fue empleado como vástago.

Cuadro 4. Calendario de micro-injertación del Ensayo A con sus respectivos grupos y número total de plantas injertadas por tratamiento.

Fecha de injertación					
22/12/2020		23/12/2020		28/12/2020	
G1	G4	G2	G5	G3	G6
2 Pla	7 Pla	12 Pla	11 Pla	8 Pla	6 Pla

Pla: Plantas

Para el **Ensayo B** se usaron 24 plantas de tomate ‘Rosado’ como vástagos, 12 plantas por tratamiento. Los segmentos usados como patrón fueron obtenidos del material vegetal no utilizado del Ensayo A y se injertaron a través de un corte tipo púa en T.

Pegado del micro-injerto. Para determinar una exitosa unión patrón/injerto es importante considerar la cohesión del portainjerto y el vástago; la proliferación de un callo en la unión y diferenciación vascular entre ambas partes (Villasana, 2010). Para ello se efectuó un monitoreo constante de las plantas.

En el caso del **Ensayo A** se monitoreo desde la micro-injertación del primer grupo (G1), permitiendo determinar si fue efectiva la unión del injerto en el patrón. La evaluación del total de plantas fue realizada el día 06 de enero 2021, cuando las plantas tenían entre 9 y 15 días de ser injertadas.

Para el **Ensayo B** la evaluación del micro-injerto fue realizado en dos fechas distintas, 05 y el 12 de febrero de 2021, cuando las plantas tenían entre 14 y 21 días de ser injertadas.

Trasplante y aclimatación. Para el **Ensayo A y B** se realizó un trasplante haciendo una cuidadosa extracción de la plantas in vitro. Se procuró eliminar el agar de las raíces a través del lavado de estas con agua destilada estéril. Posteriormente se les aplicó una solución de fungicida (Tebuconazol 2 g y Carbendazima 1 g) de 10 g por 1 L de agua, luego las plantas fueron colocadas en un vaso de 250 mL de turba. Solo en el caso del **Ensayo A** se procedió a la aclimatación. Es proceso fue realizado paulatinamente, controlando la humedad relativa, para así evitar la deshidratación excesiva del material vegetal y la pérdida de este según recomendaciones de Botti, 1992.

Para el proceso de aclimatación las plantas fueron cubiertas con un vaso (250 mL) limpio y rociado con fungicida. Ésta cubierta permitió mantener una humedad relativa elevada, para lograr que los cambios fuesen graduales y así minimizar el estrés y poseer mayor tasa de sobrevivencia (Castillo, 2004). Además, en plantas que presentaban raicillas en la zona del injerto, se realizó poda de estas, ya que es primordial mantener la zona injertada lejos del sustrato. Posterior a esto las plantas fueron colocadas en la cámara de crecimiento en tres bandejas distintas. Bandeja 1, injertos realizados el 22 de diciembre 2020. Bandeja 2, injertos del 23 de diciembre 2020. Bandeja 3, injertos del 28 de diciembre 2020. Las bandejas contenían 5, 12 y 9 plantas respectivamente, fueron regadas con agua potable con 800 mL por bandeja cada 4 días aproximadamente. Luego de dos semanas en la cámara de crecimiento (*ex vitro*) los vasos que cubrían las plantas fueron desplazados, dejando un 50% expuesto al ambiente.

Se definió un porcentaje de aclimatación por tratamiento, considerando aclimatación efectiva con valor de 100% y a la no efectiva con valor 0% por planta.

Muestreos y mediciones

Prendimiento injerto/patrón (%). Para determinar el efecto que tuvo el tiempo de crecimiento al injerto (**Ensayo A**) y la concentración de sacarosa en el medio (**Ensayo B**) sobre el porcentaje de prendimiento, se consideró como criterio de evaluación la efectividad del injerto.

La efectividad del injerto está definido en base a:

- **Presencia de callo.** Aparente conexión (visual) de las partes u órganos combinados, debido a la diferenciación de parenquima en la unión de estos (Fragoso *et al.*, 2011), presentado en la Figura 2.
- **Sobrevivencia de la planta completa.** Se observa unido y vivo el vástago con el patrón.

Se estableció que aquellas plantas que cumplan con ‘presencia de callo’ y ‘sobrevivencia de la planta completa’ se les otorga un porcentaje de prendimiento del 100%, y por el contrario plantas de tomate ‘sin presencia de callo’ y/o ‘inviabiles’ (injertos fallidos) 0% de prendimiento.

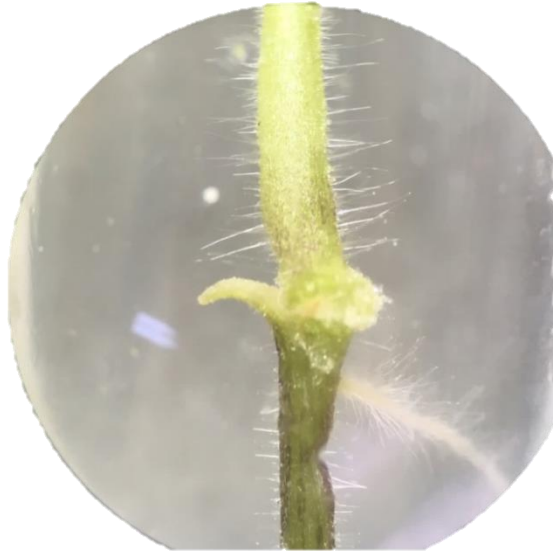


Figura 2. Callo bien formado en la zona del injerto de tomate ‘Rosado’ sobre patrón ‘Maxifort’. Observado a través de lupa 40X.

Crecimiento. Estas mediciones solo fueron realizadas para el **Ensayo B**. Permitted determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento del micro-injerto. Se llevaron a cabo las siguientes medidas por planta:

- **Largo del esqueje (cm)**
- **Largo del patrón (cm)**
- **Largo total de la planta (cm)**

Se evaluó en tres momentos distintos para ambos tratamientos, ‘tamaño inicial’ día de la injertación (22 de enero 2021); ‘crecimiento intermedio’ día 14 desde el injerto (05 de febrero 2021); ‘tamaño final’ día 21 desde el injerto (12 de febrero 2021). Estas mediciones fueron consideradas de tipo directas, tal como lo son la altura de la plantas, diámetro del tallo, número de hojas, área foliar, masa seca, etc. (Barraza *et al.*, 2004).

Contaminación visual (%). El porcentaje de plantas contaminadas con hongos y/o bacterias para cada tratamiento, fue evaluado para ambos ensayos.

Análisis estadístico

Previo a los análisis estadísticos se verificó el supuesto de distribución normal de las variables evaluadas para ambos ensayos (A y B), la homogeneidad de varianza solo fue evaluada para el Ensayo A. Se determinó que las variables cumplen con los criterios de normalidad y homogeneidad requeridos, con un nivel de significancia de 5%.

Los resultados obtenidos del Ensayo A fueron sometidos a la transformación de Bliss, y se utilizó un análisis de varianza para determinar la presencia de diferencias significativas con un nivel de significancia del 5%. Para el caso de los resultados obtenidos en el Ensayo B se analizaron a través de la prueba T-Student para determinar diferencias entre los tratamientos, también con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo A. Efecto del momento de la micro-injertación de tomate ‘Maxifort’ autoinjertados

Se determinó que no existen diferencias significativas entre injertos a los 26 (T1) o a los 19 (T2) días de crecimiento (Figura 3). Siendo T2 el tratamiento con menos días al injerto el cual presentó un mayor porcentaje de prendimiento (59,45%). Esta tendencia coincide con el trabajo realizado por Truong y Thi (2018) los cuales demostraron que plantas más jóvenes poseen mayor éxito en la adhesión del micro-injerto, ya que, en etapas tempranas posteriores a la germinación se facilita el proceso de unión del tejido vascular. El porcentaje de prendimiento fue obtenido del total de datos por tratamiento.

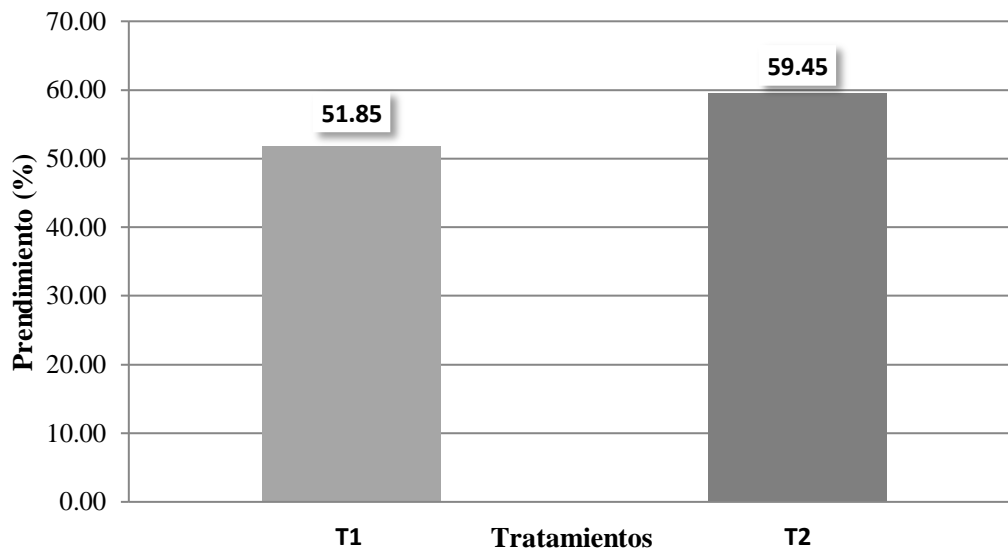


Figura 3. Porcentaje de prendimiento total de los micro-injertos realizados a los 26 días de crecimiento (T1) y 19 días de crecimiento (T2). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Durante el desarrollo del Ensayo A se presentaron imprevistos, tales como una baja germinación (25%) mostrada por las semillas de tomates ‘Maxifort’. Se consideró como un factor preponderante para esta baja germinación la concentración de cloro aplicada en el proceso de desinfección 20% V/V, posteriormente se determinó reducir su concentración a un 5% V/V para el Ensayo B.

Inicialmente se consideró realizar tres tratamientos para el Ensayo A, pero debido a la baja y lenta germinación se manifestó una carente disponibilidad de plantas para los tratamientos, por lo que no fue posible realizar un tercer tratamiento con 12 días de

crecimiento desde la siembra. Esto igualmente afectó la cantidad de material vegetal propuesto para T1 y T2, dejando valores dispares entre las repeticiones y unidades experimentales de cada uno de ellos. Solo una de las repeticiones ‘R2’ cumplió con el número de plantas propuestas (señalada con * en el Cuadro 5), mostradas en la Figura 4.

Cuadro 5. Número de plantas micro-injertas y efectividad de los micro-injertos en vástagos de tomate ‘Maxifort’ autoinjertados con 26 (T1) y 19 (T2) días de crecimiento.

Tratamiento	Repetición	Plantas injertadas (N°)	Plantas con injerto efectivo (N°)
T1	R1	2	1
	R2*	12	6
	R3	9	5
T2	R1	7	4
	R2	11	6
	R3	6	4



Figura 4. Injertos efectivos realizados el 23 de Diciembre 2020; R2. Tratamientos T1.

Dentro de los criterios utilizados para determinar el porcentaje de prendimiento de los injertos, fue la presencia de callo y sobrevivencia de la planta completa. Cabe destacar que la coloración verde de las hojas no fue considerada un determinante para el éxito de la micro-injertación, ya que las plantas al encontrarse en los tubos de ensayo donde la humedad relativa es cercana al 100% y la temperatura de la cámara de crecimiento es controlada, pueden presentar hojas verdes sin necesidad de existir conexión de los haces vasculares del patrón y la variedad (Figura 5). Es preciso mencionar que se decidió trabajar con autoinjertos ya que así se evitan posibles incompatibilidades entre vástago/patrón (Truong y Thi, 2018), de esta manera se descarta la incompatibilidad como factor preponderante de injertos infructuosos.



Figura 5. Injertos no efectivos en un pre ensayo en 2019, sin conexión vascular pero con follaje coloración verde.

Ensayo B. Efecto de la concentración de sacarosa en micro-injertos de tomate var. Rosado sobre patrones ‘Maxifort’

En cultivo in vitro es muy importante la adición de una fuente de carbono al medio de cultivo, ya que es primordial para el crecimiento y desarrollo de las especies, debido que la fotosíntesis, que es la principal productora de energía para la planta, es insuficiente o prácticamente nula (Singha *et al.*, 1987).

Estudios realizados por Truong y Thi en 2018 definieron lo importante que es la sacarosa para el éxito de micro-injertos, precisando que los medios suplementados con 20-30 g L⁻¹ de sacarosa dan excelentes resultados en el crecimiento de las plantas injertadas (autoespecíficos e interespecíficos), destacando que la adición de 30 g L⁻¹ dieron plantas de tomate autoinjertadas longitud de tallo de 6,1 cm en promedio, versus plantas con medios MS sin sacarosa solo alcanzaron una longitud de tallo de 4,5 cm luego de dos semanas del injerto.

El éxito del injerto depende en gran medida de la conexión y la formación de tejidos vasculares en la unión del vástago/patrón. Dado que la conexión del cambium vascular dará lugar más tarde al floema y al xilema durante el crecimiento secundario, se requiere que los vástagos y portainjertos sean de tamaño similar (Melnik y Meyerowitz, 2015). En el tomate, los haces conductores están dispuestos en círculo, alrededor del tallo. Si el portainjerto y la variedad tienen diámetros similares en la zona de unión, la proximidad entre los haces vasculares de las dos plantas es máxima y, por lo tanto, la facilidad de la unión también lo es (Miguel *et al.*, 2007).

Para el desarrollo del Ensayo B fue necesario utilizar como patrón segmentos del material vegetal derivados del Ensayo A. Debido al lento crecimiento presentado en ‘Maxifort’, las plantas no consiguieron un diámetro de tallo óptimo para ser injertadas con vástagos de tomate ‘Rosado’, siendo esta variedad más vigorosa y por ende manifestando un diámetro de tallo superior al de plantas ‘Maxifort’ con la misma edad.

Se determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos (T1, 30 g L⁻¹ y T2, 20 g L⁻¹), consiguiendo un mayor crecimiento en plantas suplementadas con 30 g L⁻¹ de sacarosa. Luego de 14 días del micro-injerto se observaron diferencias en el largo total de las plantas (Figura 6) y asimismo solo a los 14 días del micro-injerto variaciones en el largo del vástago entre los tratamientos (Apéndice II).

Se presentó una leve diferencia pero no significativa (0,4 cm) en el tamaño inicial promedio de los injertos T1 y T2 (Figura 6). Cabe destacar que el tamaño del vástago afecta el éxito de los micro-injertos (Khalafalla y Daffalla, 2008), según el ensayo realizado por Truong y Thi (2018) determinaron que al comparar vástagos de 0,5 y 1,0 cm de largo esta diferencia no afectó la tasa de éxito (%) de los autoinjertos de tomates, el número de hojas y raíces, la longitud del tallo, corroborando así que hay ciertas diferencias de tamaño del vástago que no son significativas en el crecimiento de los micro-injertos (Anexo I).

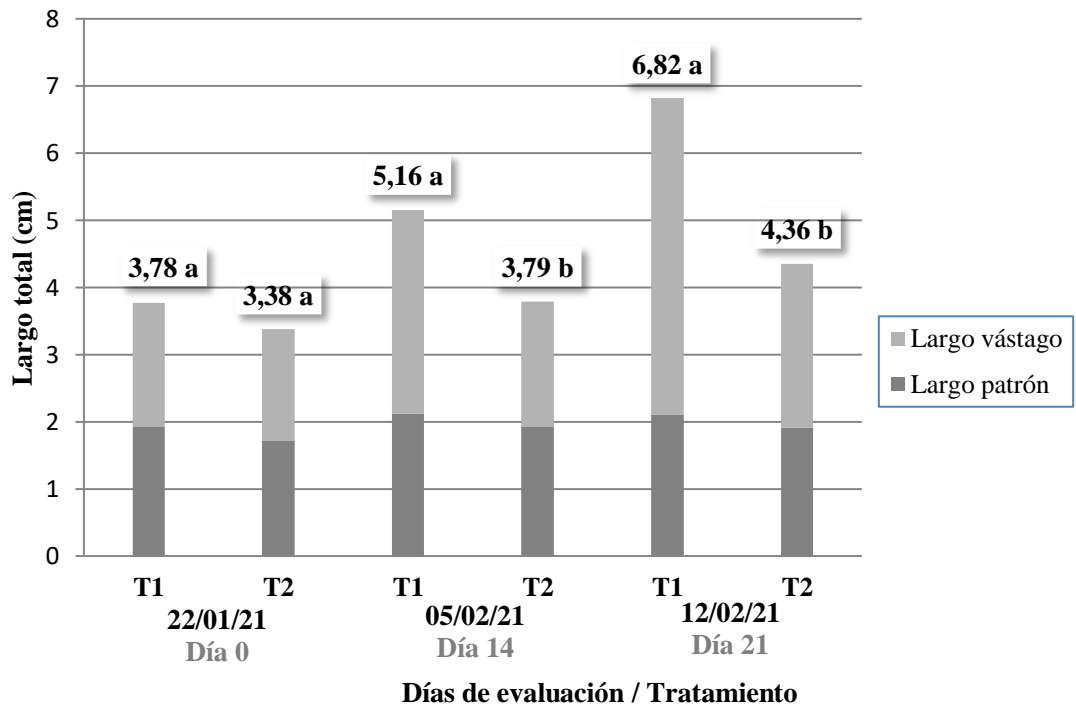


Figura 6. Efecto de la concentración de sacarosa (T1:30 g L⁻¹ y T2:20 g L⁻¹) sobre el largo total en plantas de tomate ‘Rosado’ micro-injertadas sobre patrones ‘Maxifort’, luego de 14 y 21 días del injerto. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamiento para una misma fecha ($p > 0,05$).

Los injertos de tomates var. Rosado sobre patrones ‘Maxifort’ alcanzaron un 58,33% de prendimiento máximo (Figura 7), con un variación de 8,33% entre los tratamientos, la cual no es estadísticamente significativa, arrojando así que la concentración de sacarosa en el medio resultó sin efectos relevantes en el porcentaje de prendimiento.

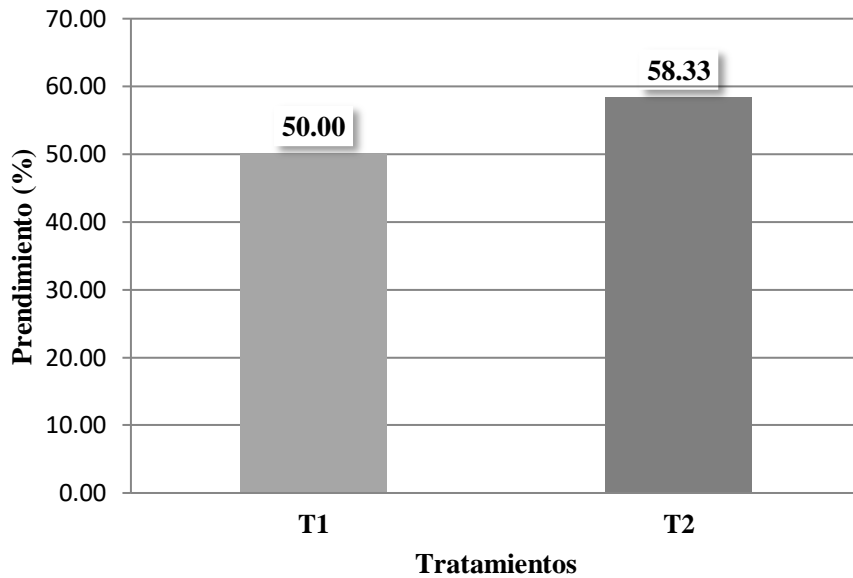


Figura 7. Porcentaje de prendimiento total por tratamiento; T1 con 30 g L⁻¹ de sacarosa; T2 con 20 g L⁻¹ de sacarosa. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Trasplante y aclimatación

Las plantas *in vitro* se desarrollan sobre un medio gelificado que contiene nutrientes que permiten mantener un crecimiento heterótrofo de las plantas a diferencia del crecimiento *in vivo* que es de tipo autótrofo (Ramos, 2012). Otras características propias del cultivo *in vitro* son, las condiciones asépticas, bajos niveles de luz a los que está expuesta la planta, baja tasa de intercambio gaseoso y alta humedad relativa en la atmosfera del recipiente, mínimas variaciones de temperatura, etc. (Majada y Sánchez-Tamés, 2003). Cabe destacar que las plantas *in vitro* poseen ineficiencia fotosintética por un bajo desarrollo de pigmentos en cloroplastos y la presencia de granas desorganizadas en ellos (Preece y Sutter, 1991), además de una reducida capacidad para formar cutícula cerosa (Amara *et al.*, 1995). Por ello, es importante realizar la aclimatación a *ex vitro* de manera gradual para que las plantas desarrollen adecuadamente sus estomas y cutícula (Sánchez, 2000).

El material vegetal derivado del **Ensayo A** pudo aclimatarse. Algunas plantas murieron en el proceso, debido a la disminución de la HR generado en el cambio a *ex vitro* o por el

manejo realizado a la hora del trasplante, ya que, esto implicó manipular invasivamente las plantas pudiendo romperlas o deteriorarlas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, pero si se observó un mayor porcentaje de aclimatación en los micro-injertos de T2 (86,11%) que son aquellos injertos con menos días al momento de realizar el injerto (Figura 8).

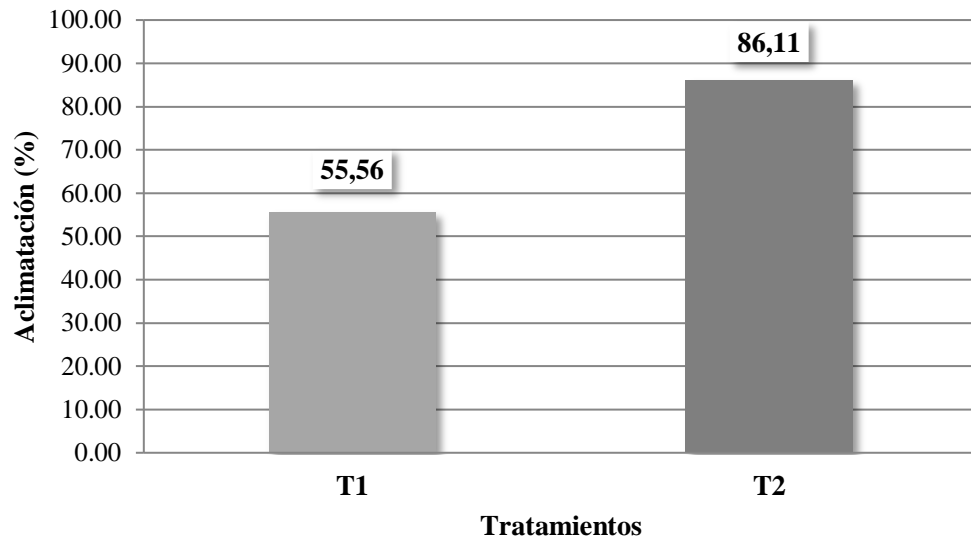


Figura 8. Porcentaje de aclimatación Ensayo A autoinjertos de tomate ‘Maxifort’ realizados a los 26 días de crecimiento (T1) y 19 días de crecimiento (T2). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

Es relevante destacar la importancia que tiene el control de los factores ambientales, buscando simular las condiciones *in vitro* hasta que las plantas logren adaptarse paulatinamente a la nueva condición (Sánchez, 2000). Para el caso del ensayo A recién a la tercera semana de aclimatación se destapó la cubierta de las plantas injertadas, esto permitió asegurar un porcentaje de aclimatación mayor al 50% en ambos tratamientos (Figura 9).

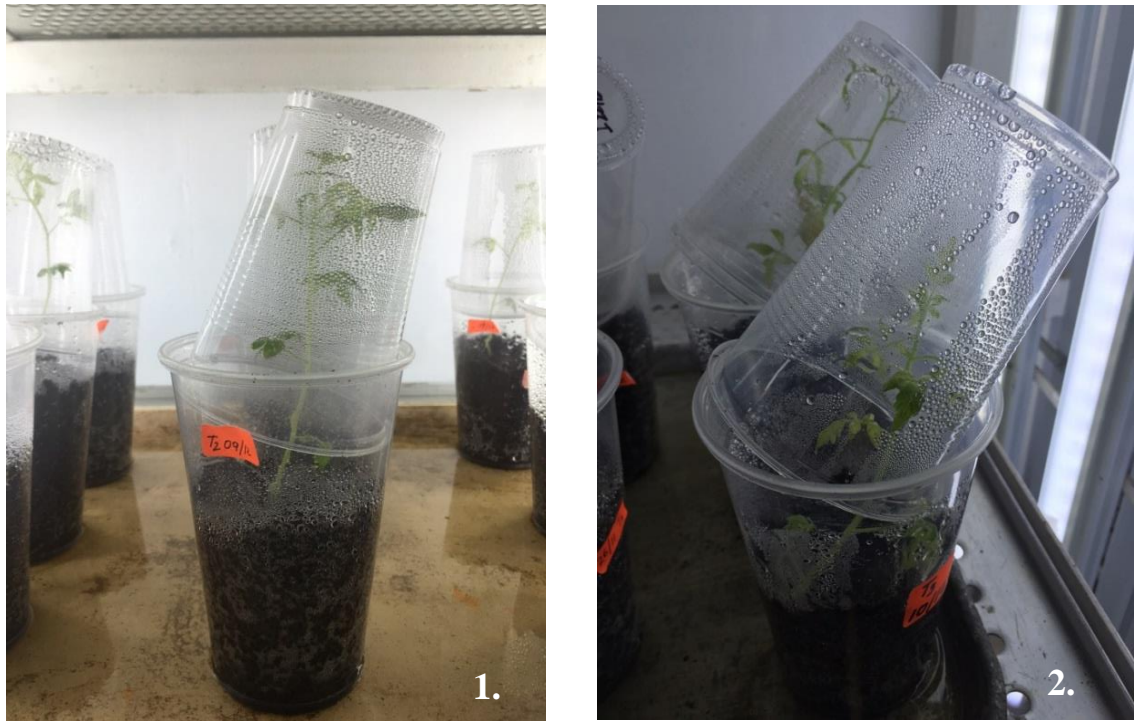


Figura 9. Aclimatación Ensayo A. 1. Primera semana de aclimatación, recipientes completamente cerrados. 2. Tercera semana de aclimatación, recipientes parcialmente abiertos.

Durante el periodo de aclimatación se realizaron dos podas de raíces presentes en el callo (Figura 10), ya que fue importante evitar que el vástago entrara en contacto con el sustrato.

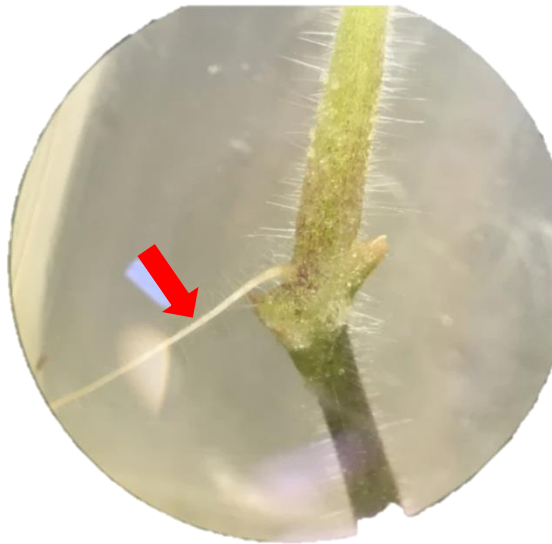


Figura 10. Crecimiento de raicilla lateral presente en la zona de unión patrón/injerto (flecha), que debió ser eliminada. Observada con aumento de lupa 40X.

Si bien en el **Ensayo B** el material vegetal pudo ser trasplantado, del total de plantas un 50% de T1 y 58,3% de T2 llegó a esta instancia del manejo, no fue posible aclimatarlas como en el Ensayo A.

Porcentaje de contaminación

Fue relevante realizar una desinfección de las semillas y un manejo de los ensayos lo más prolijo posible. Esto permitió mantener las plantas y el medio de cultivo libres de contaminación (fitopatógenos), tanto para el material vegetal previo al injerto como las plantas ya injertadas.

En el **Ensayo A** se utilizó una concentración de cloro de 20% V/V para realizar la desinfección de la semillas y gracias a ello no se presentaron plantas contaminadas (0%) en la siembra o posteriormente en el injerto, demostrando así la importancia de un buen método de desinfección del material y una prolija metodología de trabajo. Posteriormente para el **Ensayo B** se redujo la concentración de cloro utilizado para la desinfección a 5% V/V, por problemas de toxicidad presentados anteriormente en ciertos materiales vegetales. Esto provocó que se presentara contaminación en la siembra. Se utilizó un total de 70 frascos para siembra, considerando un 10% de contaminación con fitopatógenos (Figura 11). Posteriormente, durante el periodo de injerto y crecimiento de las plantas ya injertadas no se observó contaminación.

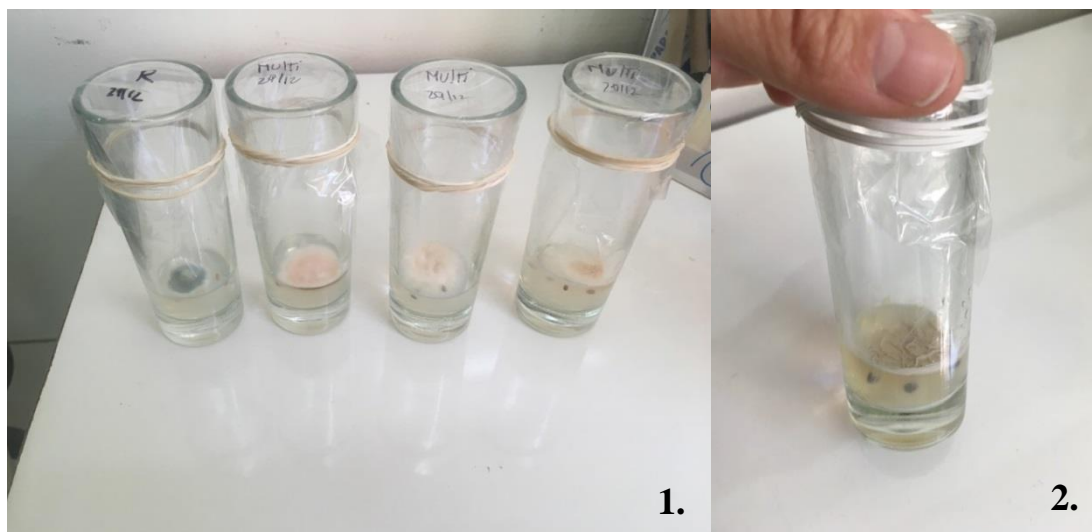


Figura 11. Contaminación en siembra **Ensayo B**, 1. Contaminación por hongos luego de 9 días desde la siembra. 2. Contaminación luego de 25 días desde la siembra, aparentemente por levaduras.

Otras observaciones

Las plantas de tomate manipuladas in vitro son muy propensas a la deshidratación y al utilizar un mechero de alcohol dentro de la cámara de flujo laminar este aumenta la temperatura interior, y por ende acorta el tiempo en el cual las plantas están en una condición turgente para ser injertadas. Por ello fue de gran utilidad el uso de un esterilizador de perlas de vidrio, el cual fue eficaz destruyendo microorganismos/esporas, y dado que no posee llama no emite calor, ni gases/vapores y no contiene líquidos perjudiciales en su interior (Cole-Parmer, s/a). Es por estas características que evita la sobreexposición a temperaturas más altas, por ende a la deshidratación del material vegetal (Figura 12).



Figura 12. Esterilizador de perlas de vidrio utilizado durante toda la investigación.

Otro punto importante a considerar es el geotropismo de las plantas a la hora de realizar el injerto. Siempre se debe tener presente la posición original de los patrones y esquejes. Dado que los esquejes en ocasiones se manipulan sin hojas y a los patrones ocasionalmente se cortan sus raicillas, por ello es posible confundir la orientación de las plantas si no se tiene el debido cuidado.

También es importante considerar el periodo de permanencia que tienen las plantas in vitro, ya que es necesario que la disponibilidad de macro y micronutrientes vaya acorde a este. Fue posible notar que cuando el periodo de cultivo se extendió demasiado las plantas manifestaron sintomatología por carencias de nutrientes en sus hojas y tallos a causa del envejecimiento del medio de cultivo (Figura 13).



Figura 13. Planta con follaje blanquecino y éxito en el micro-injerto pre ensayos año 2019.

CONCLUSIONES

Micro-injertos realizados a los 12 y 19 días desde la siembra no manifiestan diferencias sobre el porcentaje de prendimiento en autoinjertos de tomate 'Maxifort'.

Concentraciones de sacarosa de 20 y 30 g L⁻¹ no manifiestan diferencias sobre el porcentaje de prendimiento en micro-injertos de tomate 'Rosado' sobre patrones var. Maxifort, presentando porcentajes de prendimiento superiores o iguales a 50% en ambos casos. La concentración de sacarosa si afecta el crecimiento de las plantas micro-injertadas, provocando mejores resultados en medios de cultivo suplementados con 30 g L⁻¹ de sacarosa frente a aquellos suplementados con 20 g L⁻¹.

Cabe destacar la importancia de una correcta desinfección del material, zona de trabajo y una prolija metodología a la hora de ejecutar las actividades y labores definidas para el trabajo in vitro de manera de evitar contaminaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Amara, S.; L. Pérez, y G.B. Kerbauy. 1995. Análisis comparativo del contenido de ceras en hojas de *Catsetum fimbriatum* (Morres Lindi in vitro y ex Vitro. Pp 267-268. *In*: Riberao, A. Congreso Nacional de Botánica.
- Barraza, F., G. Fischer, y C. Cardona. 2004. Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle del Sinú medio, Colombia. *Redalyc*. 22(1):81-90.
- Bletsos, F.A. and M. Christos. 2008. Rootstocks and Grafting of Tomatoes, Peppers and Eggplants for soil-borne disease Resistance, Improved Yield and Quality. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 62-73.
- Botti, C. 1992, Marzo. Aplicaciones de la biotecnología en la micropropagación y en el mejoramiento genético de especies vegetales. *Simiente* 62 (1): 25-30.
- Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay.
- Manzur, M., O. Lama, Á. Pumarino, y E. Méndez. Chile. 2016. Chile Sustentable. Catálogo de semillas tradicionales de Chile. [Santiago: Chile]: Chile Sustentable. 280p. (Serie N° 2).
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. Cali (Ed.), Colombia: CIAT. 970p. (Publicación CIAT N°151).
- Cole-Parmer. s.f. Catálogo Virtual, esterilizadores. [en línea] 665p. Disponible en: <http://www.coleparmer.com/assets/Catalog_pdfs/PDF_CP/JZ_0665.pdf> Leído el 21 de julio 2021.
- Farah, M., A. Hernández, A. Casanova, T. Depestre, L. Gómez, y M. Rodríguez. 2008. El injerto herbáceo: Alternativa para el manejo de plagas del suelo. *Revista de Protección vegetal*. 23(2): 69-74.
- Fragoso, V., H. Goddard, I. Baldwin and S. Kim. 2011. A simple and efficient micrografting method for stably transformed *Nicotiana attenuata* plants to examine shoot-root signaling. *Plant Methods* 7(34): 1-8.
- Holdgate, D.P., and E.A. Zandvoort , 1992 Automated micropropagator abo the applicator of a laser beam for cutting. Pp 297-311. *In*: Kurata, K y T, Kozai. *Transplant Production Systems*. Yokohama, Japón. 21-26 July 1992. Kluwer academic publishers.

INIA (Instituto de Innovación Agropecuaria e Instituto de Desarrollo Agropecuario Chile). 2017. Manual de cultivo del tomate bajo invernadero. (Bol. Tec. N° 12), INIA La Cruz. Santiago, Chile: INIA. 112p.

Jonard, R. 1986. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I: Micrografting and its applications to tree improvement. Springer-Veerlag, Berlin, Heidelberg (Ed.), New York, Tokyo: Y.P.S. Bajaj. 48p.

Khalafalla, M. M., and H. M. Daffalla. 2008. In vitro micropropagation and micrografting of gum arabic tree (*Acacia Senegal* (L.) wild). International Journal of Sustainable Crop Production. 3: 19-27.

Lee, J.M. 1994, April. Cultivation of grafted vegetables I. Current Status, Grafting Methods and benefits. Hort science. 29 (4): 235-239.

Lows, F., and C. Rivard. 2008. Grafting for Disease Resistance in Heirloom Tomatoes. North Carolina Cooperative Extension Service. 9(06): 1-8.

Madigan, M., J. Martinko, K. Bender, D. Buckley, D. Stahl. 1997. Brock Biología de los Microorganismos. Trad: Barrachina, C., M. Berlanga, G. Claro, C. Garda, M. Gacto, I. Giberty, *et al.* 14^a ed. PEARSON EDUCACIÓN S.A. Madrid, España. 1.099 p.

Majada, J.P. y R. Sánchez-Tamés. 2003. Capítulo 34 Ecofisiología del cultivo in vitro: aclimatación de plantas: 1017-1054. *In*: Sánchez, A., M. Reigosa, N. Bonjoch. La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis. Agricultural Plant Science. Madrid, España. 1.193p.

Melnyk, C., and E. Meyerowitz. 2015. Plant grafting. Current Biology. 25(5): 183-188.

Miguel, A., F. De la Torre, C. Baixauli, J.V. Maroto, C. Jordá, M. López, *et al.* 2007. Finalidad del Injerto. Injerto de Hortalizas. Ed. A. Miguel y Martín, M. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General de Agricultura y Alimentación. España. 2: 23-26.

Moreno, B., S. Contreras, C. Krarup H. 2015. Uso de injertos en sandía Tecnología para mayor sostenibilidad. Revista agronomía y forestal UC. 51(14): 14-18.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962, April. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3): 473-497.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias del Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile). 2019, Febrero. Boletín Hortalizas Frescas (Bol. Tec.). Santiago, Chile: ODEPA. 15p.

Preece, J.E. and E.G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field: 71-93. *In: Debergh P.C y R.H. Zimmerman.* Micropropagation technology and application. Dordrech Kluwer Academic Press. 484p.

Ramos J. 2012. Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. Especialización en Biotecnología Agraria, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Bogotá, Colombia. 71p.

Rêgo, M.M., E.R. Rêgo, and O. de Lima Coutinho. 2010. In vitro micrografting protocol in *Lycopersicon esculentum*. (pp. 365-370). En: Simposio Internacional sobre Cultivo In Vitro y Cría Hortícola (Nº6, 2009, Brazil). R.J. Geijskes (Eds.) ISHS Acta Horticulturae. 829p.

Sánchez, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile.

Singha, S., G.H. Oberly and E.C. Townsend. 1987. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11: 209-220.

Tanuja P., D. Thippesha, and N. Kavyashree. 2017. Effect of age and curing of scion on cost: benefit ratio of softwood grafting of sapota (*Achras zapota* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(8): 2.678-2.682.

Truong, D., and T. Thi. 2018. Establishment of Reciprocal Micrografting of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Vietnam Journal of Agricultural Sciences* 1(1): 156-165.

Vanina, E. 2017 Efecto de los portainjertos sobre las características Físico-químicas y sensoriales de frutos de cultivares criollos y comerciales de tomate. Licenciada en Bromatología. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. 67p.

Velasco, M. 2013. Anatomía y manejo agronómico de plantas injertadas en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis maestro en ciencias de la horticultura. Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo. 153h.

Villasana, J. 2010. Efecto del injerto en la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo condiciones de invernadero en Nuevo León. Tesis maestro en ciencias en producción Agrícola. Escobedo, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. 84h.

APÉNDICES

Apéndice I

Cámaras de flujo laminar en el laboratorio de cultivo de tejidos, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Campus Antumapu.



Apéndice II

Efecto de la concentración de sacarosa (T1 y T2) en el crecimiento de micro-injertos de tomate var Rosado sobre patrones 'Maxifort' **Ensayo B.**

Fecha de evaluación	Trat.	Conc. sacarosa	Largo total promedio	Largo Vástago promedio	Largo patrón promedio
		g L ⁻¹	-----	cm	-----
22/01/21	T2	20	3,38 ± 0,5	1,66 ± 0,55	1,72 ± 0,4
	T1	30	3,78 ± 0,57	1,84 ± 0,38	1,93 ± 0,28
	p-valor		0,0844	0,3592	0,1400
05/02/21	T2	20	3,79 ± 0,51 b	1,86 ± 0,33 b	1,93 ± 0,34
	T1	30	5,16 ± 1,47 a	3,03 ± 1,51 a	2,12 ± 0,4
	p-valor		0,0265*	0,0506*	0,2941
12/02/21	T2	20	4,36 ± 0,64 b	2,44 ± 0,63	1,91 ± 0,22
	T1	30	6,82 ± 2,22 a	4,72 ± 2,3	2,10 ± 0,37
	p-valor		0,0474*	0,0737	0,2983

*Letras distintas para cada fecha indica diferencias significativas entre los tratamientos en cada parámetro evaluado (p-valor ≤ 0,05).

ANEXO

Anexo I

Efecto del tamaño del vástago en la tasa de éxito del micro-injerto recíproco dos semanas después del injerto.

Scion/rootstock	Scion size (cm)	Grafting success rate (%)	Number of leaves (leaves/plant)	Number of roots (roots/plant)	Stalk length (cm)	Growth observation
Self-grafted tomato	0.5	63	2.7 ± 0.13	1.0 ± 0.0	5.5 ± 0.20	Very good
	1.0	65	3.1 ± 0.21	1.1 ± 0.09	4.6 ± 0.20	Very good
Self-grafted eggplant	0.5	75	2.7 ± 0.33	1.0 ± 0.0	3.7 ± 0.33	Good
	1.0	67	2.5 ± 0.29	1.0 ± 0.0	4.7 ± 0.25	Very good

Note: Scion size was the length from shoot tip to the cut hypocotyl tissue.

Fuente: Truong y Thi, 2018.