

EVALUACIÓN DEL GERMOPLASMA DE TOMATE (*Solanum* L. sección *Lycopersicon*) CONSERVADO *Ex Situ* EN CUBA UTILIZANDO PRUEBA *In Vitro* PARA PREDECIR LAS RESPUESTAS A ALTAS TEMPERATURAS

Marilyn Florido[✉], Marta Alvarez, Regla M. Lara, Dagmara Plana, C. Moya y A. Caballero

ABSTRACT. This research work was conducted with the aim of evaluating thermotolerance at tissue level in a representative sample of *ex situ* preserved tomato (*Solanum* L. section *Lycopersicon* subsection *Lycopersicon*) germplasm in Cuba, besides identifying the most tolerant accessions to be used in plant breeding programs. Thus, cell viability was measured by reducing tetrazolium salt to formazan through dehydrogenase enzyme action in 122 tomato accessions, which were classified for their thermotolerance, taking into account three well known controls: Nagcarlang, Amalia and AN-104-1. Concerning the *ex situ* preserved germplasm in Cuba, there are thermotolerant accessions, mainly from *S. lycopersicum* var. *Cerasiforme* and *S. pimpinellifolium*, that can be employed in plant breeding programs, to obtain good-behaving varieties and hybrids under these conditions.

Key words: cell viability, heat tolerance, tomato, screening

RESUMEN. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar la tolerancia al calor a nivel de tejido en una muestra representativa del germoplasma de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *ex situ* en Cuba e identificar las accesiones más tolerantes para su empleo en los programas de mejoramiento genético. Para ello, se midió la viabilidad celular por reducción del cloruro de trifenil tetrazolio a formazán mediante la acción de enzimas deshidrogenadas en 122 accesiones de tomate, que se clasificaron por su tolerancia al calor atendiendo a tres controles de comportamiento conocido: Nagcarlang, Amalia y AN-104-1. Se pudo comprobar que en el germoplasma que se conserva *ex situ* en Cuba existen accesiones tolerantes al calor, fundamentalmente de *S. lycopersicum* variedad *Cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*, que pueden ser explotadas en los programas de mejoramiento genético, para obtener variedades e híbridos con buen comportamiento en estas condiciones.

Palabras clave: viabilidad celular, tolerancia al calor, tomate, evaluación

INTRODUCCIÓN

Las altas temperaturas afectan el desarrollo de las plantas de tomate, causando serios daños en las estructuras reproductivas, lo que trae como consecuencia deficiencias en el cuajado de los frutos y disminución de la producción (1). Es por ello que estas condiciones constituyen uno de los factores más importantes que inciden en la baja producción de tomate en ambientes tropicales (2), efecto que se multiplica si coincide con períodos lluviosos en los que se incrementa la incidencia de las enfermedades fungosas y el cáncer bacteriano (3).

La capacidad de adquirir termotolerancia en plantas ocurre en condiciones naturales y es un componente de la tolerancia al calor en condiciones de campo.

Dra.C. Marilyn Florido, Investigadora Auxiliar y Ms.C. Dagmara Plana, Investigadora Agregada, Dra.C. Marta Alvarez y Dr.C. C. Moya, Investigadores Titulares, Ms.C. Regla M. Lara, Especialista del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal; Dr.C. A. Caballero, Investigador Titular del departamento de Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal I, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ mflorido@inca.edu.cu

En los últimos años, varios ensayos relacionados con el estrés al calor han recibido atención considerable, para cuantificar el nivel de termotolerancia celular adquirida en plantas, siendo la prueba de la viabilidad celular (VC) una de las más estudiadas, medida por la reducción del 2,3,5 cloruro de trifenil tetrazolio (4, 5, 6).

Este método asocia la adaptación al estrés con la viabilidad celular y evalúa la cadena de transporte electrónico mitocondrial, basado en el principio de la reducción de la sal de tetrazolio a formazán por acción de las enzimas respiratorias deshidrogenasas. Este ha sido ampliamente utilizado como estimado de la termotolerancia celular en plantas. Así, ya se ha aplicado este procedimiento, para evaluar las diferencias en el grado de tolerancia al calor en accesiones de trigo, pitahaya y girasol (4, 6, 7). Igualmente, otros lo utilizaron para determinar la viabilidad en callos de caña de azúcar sometidos a estrés salino (8) y, además, para evaluar daños por sequía en maíz y algodón (9, 10). Sin embargo, no se han encontrado informes de su uso en el monitoreo de la tolerancia al calor en tomate.

Es por ello que se desarrolló el presente trabajo, con el objetivo de evaluar la tolerancia al calor mediante la valoración *in vitro* de la viabilidad celular, en una muestra representativa de germoplasma de tomate (*Solanum L.* sección *Lycopersicon*) conservado en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre una muestra de germoplasma de la colección de tomate (*Solanum L.* sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservado *ex situ* en el país, integrada por diferentes especies (Tabla I), donde se incluyeron variedades, líneas, prospecciones y especies silvestres, 48 de ellas procedentes de la colección de trabajo del INCA, 47 del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) y 27 de la colección de trabajo de la Estación Experimental "La Mayora" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España (CSIC). Estas accesiones representan el 14,28 % de las presentes en la colección nacional, pues en total se cuenta con 854 accesiones (11).

Para el análisis de VC por reducción del cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC), se tomaron muestras al azar de la segunda hoja verdadera de las diferentes accesiones en estudio y se les extrajeron tres discos de aproximadamente 45 mm de diámetro. Los discos de hojas se ubicaron en viales de 10 mL que contenían 100 μ L de agua destilada, para evitar la deshidratación del tejido. Se colocaron seis viales a 43°C durante 90 minutos en baño de María termostataado, mientras los seis viales controles se mantuvieron a 25°C.

Posterior al tratamiento térmico, a las diferentes muestras se les añadió 2 mL de solución de TTC (0,8 % m/v disueltos en tampón fosfato 0,05 M pH 7,4 y 0,5 mL.L⁻¹ de TWEEN-20), que fueron infiltrados en el tejido con ayuda de una bomba de vacío, aproximadamente durante dos minutos, considerándose infiltrados cuando permanecieron en el fondo del vial después de realizado el vacío. A continuación, estos se taparon y ubicaron en total oscuridad a 25°C toda una noche. Al día siguiente, la solución se drenó y los discos foliares se removieron y enjuagaron con agua destilada. Seguidamente, se les agregó 2,5 mL de etanol al 95 %, para extraer el formazán producido por reducción del TTC y los tubos se retornaron a la oscuridad por 24 h a 25°C.

Tabla I. Número de accesiones por especie y clasificación de la muestra de germoplasma estudiada de acuerdo con su procedencia

Especie	Total	Introducción	Hibridación	Selección	Colecta	Origen
<i>S. lycopersicum</i>	90	36	33	11	10	Cuba, España, EEUU, Taiwán, Canadá, Brasil, Italia, Irán
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>Cerasiforme</i>	17	10			7	Cuba, Perú, México, Ecuador, Bolivia, Filipinas
<i>S. pimpinellifolium</i>	11	10			1	Cuba, Perú, México, Ecuador
<i>S. habrochaites</i>	1	1				Perú
<i>S. peruvianum</i>	2	2				Perú
<i>S. pennellii</i>	1	1				Perú

Para su desarrollo, se pregerminaron semillas de las 122 accesiones de tomate en placas de Petri con agua destilada hasta la emergencia de las radículas. Posteriormente, estas se transfirieron a cepellones de 196 alveolos de 30 cm³ de capacidad, que contenían una mezcla de cachaza: zeolita y suelo Ferralítico Rojo compactado (12) en proporción 1:2:1, a razón de seis plantas por accesión, mediante un diseño completamente aleatorizado. Los cepellones se ubicaron en cuartos de crecimiento a temperatura controlada de 25 \pm 2°C, humedad relativa del 80 %, fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad e intensidad de luz de 200 μ mol fotones.m⁻².s⁻¹.

A los 15 días después de germinadas las plántulas, se tomaron al azar muestras de hojas que se transportaron al laboratorio para realizarles el análisis de viabilidad celular correspondiente. Para el análisis se escogió la temperatura que mejor diferenciación presentó en evaluaciones previas de VC, efectuadas con diferentes tratamientos de calor en los cultivares Nagcarlang y Campbell-28 (datos no mostrados). Estos ensayos se realizaron dos veces en el tiempo.

La cantidad de formazán se determinó en un espectrofotómetro a 530 nm (Zuzi UV 4200) y la VC por el porcentaje de reducción del TTC a formazán, utilizando la fórmula descrita a tal efecto (4):

$$VC (\%) = \frac{DO \text{ estrés} \times 100}{DO \text{ control}}$$

Donde:

DO estrés: densidad óptica de tratamientos de estrés (43°C durante 90 min.) a 530 nm

DO control: densidad óptica de tratamientos controles (25°C durante 90 min.) a 530 nm.

Los datos de VC (%) se procesaron tomando los valores promedio y el intervalo de confianza para cada accesión, que se clasificaron de acuerdo con las clases establecidas en base a los intervalos de confianza de tres controles de comportamiento conocido.

Como control tolerante se utilizó la accesión Nagcarlang, de reconocida tolerancia al calor por sus altos porcentajes de fructificación, la respuesta fisiológica a este estrés y sus elevados valores de viabilidad del

polen (13); como control intermedio se utilizó la variedad Amalia, obtenida por programa de mejoramiento genético en el INCA, la cual presenta tolerancia intermedia al calor, mientras la variedad AN-104-1, recientemente introducida, se empleó como control susceptible, por presentar poca adaptación al clima cubano, así como valores bajos de germinación y fertilización del grano de polen (3).

Se formaron tres clases, cuyos límites se establecieron según los intervalos de confianza correspondientes a los tres controles seleccionados y se adicionaron nuevas clases, para ubicar las accesiones cuyos valores quedaban fuera de los intervalos de confianza de los controles, lo que permitió realizar la clasificación de las 122 accesiones, ubicándolas de acuerdo con sus intervalos de confianza para el carácter VC en las clases pre-establecidas para estos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de VC por reducción del TTC mostró diferencias apreciables en las tres accesiones escogidas como controles (Nagcarlang, Amalia y AN-104-1), empleando sus intervalos de variación para la formación de las clases 1, 3 y 5 (Tabla II), y creándose tres clases nuevas (2, 4 y 6), con el fin de abarcar todo el rango de variación del carácter para las 122 accesiones en estudio.

Tabla II. Rango de variación de VC y número de accesiones en las diferentes clases formadas a partir de los controles utilizados

Controles	Rango de variación (%)	Clase	No. accesiones	Nivel de tolerancia
Nagcarlang	76,01-85,79	1	7	Tolerante
	70,66-76,00	2	45	Medianamente tolerante
Amalia	57,29-70,65	3	35	Intermedia
	54,92-57,28	4	21	Medianamente susceptible
AN-104-1	47,83-54,91	5	13	Susceptible
	Menor de 54,90	6	1	Muy susceptible

De acuerdo con los resultados, solo 24 accesiones no pudieron ser clasificadas estrictamente en una clase (Tabla III), ya que por sus intervalos de confianza abarcaron dos clases contiguas; en cambio, las 98 accesiones restantes (80,33 % de las evaluadas) presentaron una ubicación definida dentro de las seis clases establecidas.

Como se observa en la Tabla III, el análisis de VC por reducción del TTC mostró diferencias apreciables en el comportamiento de las accesiones. Este carácter varió entre 38,59-85,79 %, con un valor medio de 66,59 %, el cual se encuentra en el intervalo de confianza de la variedad Amalia.

Dentro de las clases formadas se destaca la número 1, compuesta por las accesiones de *S. lycopersicum* P-1073 y P-1896, Mex-12, P-1634 y P-531 de *S. lycopersicum* variedad *Cerasiforme* y BG-56 de *S. pimpinellifolium*, que presentaron porcentajes de VC en el rango de variación de la accesión Nagcarlang de reconocida tolerancia al calor (13).

La clase 2 quedó conformada por 45 accesiones, donde se incluyeron las de *S. lycopersicum* variedad *Cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*, así como algunas prospecciones realizadas en el país, que presentaron características intermedias entre las accesiones de las clases 1 y 3.

En la clase 3 se ubicaron conjuntamente con la variedad Amalia, 34 accesiones de *S. lycopersicum*, entre las que se encontraron Sapo Grande, variedad local de Holguín, así como A-32-1, L-10-3, Lignon, INCA-17, INCA-9(1) y Mariela, obtenidas en diferentes programas de mejoramiento genético del país y que presentan adaptación intermedia a las condiciones tropicales (3, 14, 15).

La clase 4 quedó representada por 21 accesiones, donde se incluyeron las variedades INCA-33, Campbell-28, HC-3880 y MP-1, mientras la clase 5 se formó por 13 accesiones con comportamiento similar a la AN-104-1. De igual forma, las variedades CC-2781, Ciudad Real, MP-1 y Santa Clara se ubicaron en esta clase, la que presentó susceptibilidad al calor evaluado por este método, solo superada por la accesión C-28, procedente de la Estación Experimental "La Mayora" de Málaga, España, que se ubicó en la clase 6, por presentar el más bajo valor de VC.

Es de destacar que el método de VC evaluado por la reducción del TTC a formazán, por acción de las deshidrogenasas, ha sido ampliamente utilizado, como un estimado de viabilidad del tejido en las células de las plantas, para evaluar la tolerancia al calor en cultivos como trigo, girasol y pitahaya (4, 6, 7), daños por frío en plántulas de arroz (16) y tolerancia a la salinidad en caña de azúcar (8); en cambio, no se han encontrado estudios de VC relacionados con el monitoreo de la tolerancia a estrés ambientales en tomate.

Estos resultados demuestran que la prueba de VC, medida a través del método de reducción del TTC, puede ser de gran ayuda en el monitoreo del germoplasma de tomate, para detectar accesiones con tolerancia al calor en el cultivo, siempre y cuando exista correspondencia entre estos y los estudios a nivel de planta completa, y confirmaron que existen aún fuentes de tolerancia al calor en el germoplasma de tomate, sobre todo en accesiones pertenecientes a *S. lycopersicum* variedad *Cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*, que no han sido explotadas para incrementar el grado de tolerancia al calor de las variedades comerciales que se utilizan actualmente.

Tabla III. Valores de VC en las 122 accesiones estudiadas

Accesión	C (%) ± IC			VC (%) ± IC			
P-531	83,87	± 1,92	1	CC-I-289-648	67,67	± 1,03	3
Mex-12	83,40	± 1,45	1	C-14	67,47	± 1,36	3
Nagcarlang	80,94	± 1,69	1	CC-1710	67,44	± 1,86	3
P-1634	80,28	± 1,53	1	Ac.1159	67,15	± 1,41	3
BG-67	79,27	± 1,16	1	Rosoll	66,95	± 1,31	3
P-1073	79,26	± 1,79	1	CC-395	66,84	± 1,87	3
P-1896	77,54	± 1,31	1	Inca-17	66,72	± 1,51	3
Mex-103	77,19	± 1,18	2*	Lignon	66,46	± 1,44	3
Tropical M-10	77,06	± 1,74	2*	Inca-9(1)	66,17	± 1,39	3
P-1441	76,80	± 1,96	2*	CC-692	66,12	± 1,68	3
P-809-B	76,14	± 1,12	2*	Summerset-VF	66,11	± 2,22	3
CL1131-0-0-38-4-0	75,93	± 1,71	2*	Placero-Chileno	65,86	± 2,10	3
CL11D-0-2-1	75,84	± 2,10	2*	C-47	65,60	± 2,50	3
PE-64	75,66	± 0,96	2	CC-1752	65,41	± 1,87	3
Ac.1000	75,41	± 1,22	2	A-32-1	65,16	± 2,03	3
CC-172	75,41	± 1,20	2	CC-370	64,76	± 1,34	3
<i>L. pimpinellifolium</i>	74,92	± 1,02	2	Amalia	64,52	± 1,88	3
Mex-121-A	74,61	± 1,37	2	Imperial	64,41	± 1,68	3
Cimarrón mejorado	74,52	± 0,81	2	CC-1788	63,90	± 2,01	3
West Virgin	74,49	± 1,22	2	Mariela	63,81	± 2,26	3
ES-90	74,43	± 1,21	2	Somaclón-37	63,79	± 1,36	3
P-1410	73,96	± 1,76	2	P-1030	63,46	± 2,05	3
BG-90	73,77	± 1,37	2	CC-86	63,33	± 1,56	3
CC-I-289-y-500	73,67	± 1,86	2	HC-7880	63,15	± 1,17	3
P-931	73,62	± 1,27	2	C-18	63,03	± 1,49	3
CL1131-0-0-7-2-9	73,48	± 1,40	2	Jumbo	62,35	± 1,69	4*
LA-2807	73,16	± 1,34	2	Floradel	62,10	± 1,43	4*
Cimarrón 3	73,07	± 1,06	2	Roma	61,88	± 1,94	4*
LA-2871	72,84	± 2,14	2	Tropic	61,67	± 1,34	4*
Cimarrón Inifat	72,84	± 1,43	2	Inca-33	61,38	± 2,24	4*
CC-521	72,70	± 1,79	2	C-53	60,55	± 3,26	4*
CC-85PA	72,61	± 1,78	2	3c	60,34	± 1,16	4
PE-2	72,55	± 1,02	2	CC-1926	60,21	± 1,18	4
P-1476	72,47	± 1,63	2	Campbell-28	59,90	± 1,45	4
CC-189	72,40	± 1,36	2	Criollo Quivicán	59,52	± 1,64	4
CC-283	72,23	± 1,53	2	HC-3880	59,39	± 1,31	4
CC-1611-c	71,83	± 1,01	2	C-26	58,98	± 2,30	4
Otawa-30	71,58	± 0,76	2	H-2653-91	58,06	± 1,84	4
Ciapan 31-5	71,28	± 0,61	2	AN-52-1	58,02	± 1,86	4
New Yorker	71,25	± 0,78	2*	C-63	57,83	± 2,44	4
Silvestre 4	71,18	± 0,80	2	L-35	57,51	± 1,27	4
PE-62	71,14	± 2,82	2*	1B	57,12	± 1,24	4
LA-716	70,97	± 1,14	2*	Melvis negro	56,52	± 1,46	4
PE-10	70,45	± 1,01	2*	Puro-812	55,86	± 0,92	4
P-306	70,37	± 1,23	2*	Sunny C	55,58	± 0,67	4
P-1216	70,26	± 2,22	2*	MP-1	53,89	± 1,34	4*
PE-15	70,26	± 1,55	2*	Ciudad Real	53,85	± 1,37	5
BG-140	70,17	± 1,03	2*	NC-NBR-2	53,27	± 1,28	5
P-271	70,10	± 1,39	2*	4A	53,15	± 1,55	5
CC-321	70,05	± 1,18	2*	Inifat-28	53,06	± 1,13	5
P-787	70,04	± 1,53	2*	Virginia	52,37	± 1,57	5
Placero-Habana	69,98	± 1,49	2*	AN-87-1	51,96	± 1,74	5
Rilia	69,73	± 1,16	3	CC-2781	51,55	± 1,02	5
Epcu-2	69,54	± 1,12	3	NC-NBR-1	51,36	± 1,32	5
Marmande verde	69,54	± 1,12	3	AN-104-1	50,97	± 1,20	5
Sapo Grande	69,50	± 1,16	3	Santa Clara	49,84	± 1,35	5
PE-39	69,39	± 1,25	3	Atlético	49,79	± 0,99	5
CC-310	69,09	± 1,31	3	C-27	49,57	± 1,05	5
CL143-0-10-3-0-1-10	68,76	± 1,68	3	9A	49,20	± 1,37	5
Ontario-7710	67,78	± 1,96	3	C-28	40,32	± 1,73	6
L-10-3	67,69	± 1,49	3	Media	66,59	± 1,17	3
Sub Artic Plenty	67,68	± 1,68	3				

Intervalo de confianza (IC): Nagcarlang (79,25-82,63 %); Amalia (62,64-64,52 %); AN-104-1 (49,77-52,17 %),

Nivel de Significación p<0,05

*: accesiones que pueden estar incluidas en dos clases contiguas de acuerdo a su IC

REFERENCIAS

1. Sato, S. y Peet, M. M. Effects of moderately elevated temperature stress on the timing of pollen release and its germination in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *J. Hort. Sci. & Biotech.*, 2005, vol. 80, no. 1, p. 23-28.
2. Abdelmageed, A. H.; Gruda, N. y Geyer, B. Effects of temperature and grafting on the growth and development of tomato plants under controlled conditions. *En: Rural Poverty Reduction through Research for Development and Transformation (2004 oct 5-7: Berlin)*. P. 1-5.
3. Álvarez, M.; Florido, M.; Plana, D. y Moya, C. Informe final del proyecto: Búsqueda y empleo de marcadores en tomate para la tolerancia al estrés de calor y a nematodos PNCT Biotecnología Agrícola. Código: 00300176. INCA. 2005. Cuba.
4. Fokar, M.; Nguyen, H. T. y Blum, A. Heat tolerance in spring wheat: I. Genetic variability and heritability of cellular thermotolerance. *Euphytica*, 1998, vol. 104, no. 1, p. 1-8.
5. Ibrahim, A. M. H., Quick, J. S. Heritability of heat tolerance in winter and spring wheat. *Crop Sci.*, 2001, vol. 41, p. 1401-1405.
6. Amutha, R.; Muthulaksmi, S.; Baby Rani, W.; Indira, K. y Mareeswari, P. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Genotypes for high temperature stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2007, vol. 3, no. 4, p. 245-251.
7. Pelah, D.; Kaushik, R. A.; Xerd, A. y Mizrahi, Y. Validity of *in vitro* viability test for predicting response of different vine cacti in the field to high and low temperatures. *J. Pacd.*, 2003, p. 65-71.
8. Patade, V. Y.; Suprasanna, P. y Bapat, V. A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. *Plant Growth Regulation*, 2008, vol. 55, no. 3, p. 169-173.
9. Duncan, D. R. y Widholm, J. M. Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures. *Journal of Plant Physiology*, 2004, vol. 161, no. 4, p. 397-403.
10. Burke, J. Evaluation of source leaf responses to water-deficit stresses in cotton using a novel stress bioassay. *Plant Physiology*, 2007, vol. 143, p. 108-121.
11. Shagarodsky, T. Caracterización de la variabilidad del germoplasma de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conservada *ex situ* en Cuba. Su presencia y distribución *in situ* (Tesis de Máster en Ciencias en Biología Vegetal). Universidad de La Habana: Facultad de Biología. 2006. 122 p.
12. Hernández, H. [et al.] Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana. MINAGRI. 1999. 107 p.
13. Anaïs, G. Tomato. *En: A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon, D. Nicolas (eds.) Tropical Plant Breeding*. CIRAD (Paris, France) & Science Publishers (Enfield, USA and Plymouth, UK). 2001. p. 524-553.
14. Álvarez, M.; Armas, G. de y Martínez, B. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1, p. 82.
15. González, M. C. Inca 9-1, nueva variedad de tomate para diferentes épocas de siembra. *Cultivos Tropicales*, 1997, vol. 18, no. 1 82.
16. Lee, T. M.; Lur, I. I. S. y Chu, C. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedling. II. Modulation of free polyamine leaves. *Plant Sci.*, 1997, vol. 126, p. 1-10.

Recibido: 12 de marzo de 2009

Aceptado: 31 de julio de 2009